



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACION
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL

UNIDAD OAXACA

**Optimización de métodos de extracción acelerados
mediante energías auxiliares y caracterización de la
fracción fenólica de *Prosthechea karwinskii* y
Prosthechea varicosa.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

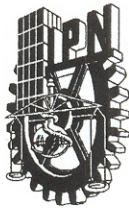
OSCAR FRANCISCO MIJANGOS RICARDEZ

Directores de Tesis:

Dra. Luicita Lagunez Rivera

Dr. Aniceto Rodolfo Solano Gómez

Junio de 2010



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 25 del mes de mayo del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA)** para examinar la tesis de grado titulada:
"Optimización de métodos de extracción con energías auxiliares y caracterización de la fracción fenólica de *Prosthechea karwinskii* y *Prosthechea varicosa*"

Mijangos

Apellido paterno

Ricardez

materno

Oscar Francisco

nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	3	5	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis

Dra. Lucita López Rivera

Dr. Aniceto Rodolfo Solano Gómez

Dra. María Dolores Luque de Castro

Dra. Mirna Petrócia Santiago Gomez

Dr. Juan Rodríguez Ramírez

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Juan Rodríguez Ramírez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 25 del mes mayo **del año 2010**, el (la) que suscribe Mijangos Ricardez Oscar Francisco alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **A080351**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Luicita Lagunez Rivera y cede los derechos del trabajo titulado: **"Optimización de métodos de extracción con energías auxiliares y caracterización de la fracción fenólica de *Prosthechea karwinskii* y *Prosthechea varicosa*"** al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradooax@ipn.mx ó osramin@hotmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Mijangos Ricardez Oscar Francisco



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.

Agradecimientos

Al Instituto Politécnico Nacional por haberme brindado las facilidades para la realización de este trabajo.

Al Centro Interdisciplinario para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR Unidad Oaxaca) por abrirme sus puertas y permitirme la superación y crecimiento académico.

A la COFAA por otorgarme la beca PIFI a través de los proyectos de investigación “Manejo y Conservación de las Orquídeas de la Reserva Comunal de Santa María Huitepec, Oaxaca” (clave SIP 20080292) y “Orquídeas en Riesgo del Estado de Oaxaca” (Clave SIP 2000393), ambos dirigidos por el Dr. Aniceto Rodolfo Solano Gómez.

Al CONACYT por la beca otorgada para estudios de maestría.

A la Dra. Luicita Lagunez Rivera y al Dr. Aniceto Rodolfo Solano Gómez por todo el apoyo brindado y por la aportación de sus experiencias.

A la Dra. María Dolores Luque de Castro por su asesoría y aceptarme para hacer una estancia en su laboratorio del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba, España.

A los integrantes del comité revisor: Dra. Luicita Lagunez Rivera, Dr. Aniceto Rodolfo Solano Gómez, Dra. María Dolores Luque de Castro, Dr. Juan Rodríguez Ramírez y Dra. Mirna Patricia Santiago Gómez.

Optimización de métodos de extracción acelerados mediante energías auxiliares y caracterización de la fracción fenólica de *Prosthechea karwinskii* y *Prosthechea varicosa*.

Resumen

Dos orquídeas *P. karwinskii* y *P. varicosa* fueron sujetas a una extracción con mezclas de etanol-agua sobrecalentado para cuantificar la extracción de sus analitos en la fracción fenólica. Las variables que afectan la extracción por líquido sobrecalentado son cinco: temperatura del horno cromatográfico (100 °C), velocidad de flujo de extractante (0.5 ml/min), composición de la mezcla extractante (50% v/v), tiempo de extracción estático 15 min y tiempo de extracción dinámico 15 min, estas se optimizaron utilizando el método espectrofotométrico de fenoles totales F-C. La separación y cuantificación de los compuestos presentes en los extractos se realizó por HPLC-UV. Para *P. karwinskii* los analitos con mayor concentración presentes son: hidroxitirosol (5706 µg/g), tirosol (5076 µg/g) y apigenina-7-glucósido (414 µg/g). Para el caso de *P. varicosa* los analitos más importantes en concentración son: apigenina-7-glucósido (4414 µg/g), hidroxitirosol (4306 µg/g) y tirosol (2076 µg/g). Este estudio es un primer paso para el conocimiento del metaboloma de estas dos orquídeas.

Palabras clave: *Prosthechea karwinskii*, *Prosthechea varicosa*, extracción con líquido sobrecalentado, fracción fenólica, energías auxiliares.

Abstract

Two orchids *P. karwinskii* and *P. varicosa* were subjected to extraction with ethanol-water mixtures for superheated to quantify the extraction of analytes in the phenolic fraction. The variables that affect the superheated liquid extraction are five: chromatographic oven temperature (100 °C), extractant flow rate (0.5 ml/min), composition of the extractant mixture (50% v / v), static extraction time 15 min and dynamic extraction time 15 min; these were optimized using the spectrophotometric method of total phenols F-C. The separation and quantification of the compounds present in the extracts was performed by HPLC-UV. For *P. karwinskii* analytes with higher concentrations present are: hydroxytyrosol (5706 mg / g), tyrosol (5076 mg / g) and apigenin-7-glucoside (414 mg / g). In the case of *P. varicose* most important analyte concentration is: apigenin-7-glucoside (4414 mg / g), hydroxytyrosol (4306 mg/g) and tyrosol (2076 mg/g). This paper is a first step for understanding the metabolome of these two orchids.

Keywords: *Prosthechea karwinskii*, *Prosthechea varicosa*, superheated liquid extraction, phenolic fraction, auxiliary energy.

INDICE

Resumen	Pág. iv
Abstract	v
Introducción	vi
Planteamiento del problema	viii
Objetivo general	ix
Objetivos específicos	ix
 Capítulo I. Marco Teórico	
I.1. Proceso Analítico en el tratamiento de muestras sólidas	1
I.1.1 Uso de ultrasonidos para la aceleración del tratamiento de muestras sólidas	3
I.2 Aspectos generales del fenómeno de cavitación	4
I.2.1 Tipos de dispositivos de ultrasonidos empleados en el tratamiento de muestras	6
I.2.2 Tratamientos para muestras asistidas por ultrasonidos	6
I.3 Extracción con disolventes a temperatura y presión altas	7
I.3.1 Parámetros que afectan a la extracción con disolventes a temperatura y presión altas	8
I.3.2 Etapas implicadas en un proceso de extracción con disolventes a alta presión y temperatura	14
I.3.3 Equipos de extracción	16
I.3.4 Aplicaciones de la extracción con disolventes a alta presión y temperatura	18
I.4 Uso de técnicas quimiométricas para el diseño y análisis de experimentos	18
I.4.1 Optimización del proceso analítico: diseños experimentales	19
I.5 Generalidades de la Familia Orchidaceae	20

I.5.1 Orquídeas en México	21
Capítulo II. Materiales y método	
II.1 Especies estudiadas	22
II.2. Aparatos e instrumentos	24
II.3 Método de extracción	25
II.3.1 Optimización del método de extracción	26
II.4. Técnica cromatográfica	28
Capítulo III. Resultados y discusión	
III.1. Extracción con líquido sobrecalentado	29
III.1.1. Análisis experimental	33
III. 2. Fracción Fenólica	37
Conclusiones	47
Anexo. <i>Heterotheca inuloides</i> (árnica mexicana)	
Resumen	48
Abstract	49
1. Introducción	50
2. Materiales y métodos	51
2.1. Método para la determinación del perfil de ácidos grasos	52
2.2. Método para la determinación del perfil de fenoles	53
3. Resultados	53
3.1. Caracterización de la fracción lipídica y fenólica	56
4. Conclusión	60
Referencias	61

Introducción

Como sabemos las plantas contienen compuestos bioactivos tales como lípidos, fitoquímicos farmacéuticos, sabores, fragancias y pigmentos. Estos compuestos son extraídos por diversos métodos como: destilación, asistida por ultrasonidos, fluido-líquido sobrecalentado, soxhlet, entre otros. Y a su vez estos extractos tienen usos en la industria de los alimentos, farmacéutica, cosmética y de perfumería.

Se sabe también que los compuestos fenólicos (flavonoides, antocianinas, flavononas, etc.) son de gran importancia en la industria alimentaria y farmacéutica por sus propiedades antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorias; así como su potencial uso como colorantes y saborizantes naturales.

Por otro lado, en los últimos años, el tratamiento de muestra se ha considerado como una etapa crítica dentro del proceso analítico debido a que las etapas precedentes a la introducción de la materia vegetal en el instrumento de medida; requiere diferentes etapas de muestreo, disolución, extracción de analitos, limpieza, preconcentración, separación individual, derivatización) que son fundamentales para asegurar la exactitud y reproducibilidad de los resultados. A pesar de los novedosos avances en instrumental analítico, muchos de los métodos que actualmente se utilizan para el tratamiento de muestra se basan en tecnologías del siglo XIX (lixiviación soxhlet, maceración), los cuales requieren tiempos largos de extracción y consumo de disolventes orgánicos tóxicos. Ante esta situación se han desarrollado dos aspectos clave para la mejora del tratamiento de

muestra que son la aceleración asistida por fuentes auxiliares de energía y la automatización parcial y total. Dentro de las fuentes auxiliares de energía se destacan la extracción asistida por microondas, asistida por ultrasonidos, con líquidos sobrecalentados, asistida por láser, que reducen de manera importante el consumo de disolventes orgánicos tóxicos, el tiempo de extracción y aumentan la variedad de analitos a analizar.

Otra herramienta fundamental en el tratamiento de muestra es el diseño experimental, ante lo cual la quimiometría es una disciplina que emplea estadística, matemáticas y lógica formal para diseñar procedimientos experimentales óptimos y proporciona la mayor información química relevante mediante el análisis de los datos químicos.

De esta forma en este trabajo se caracterizaron las moléculas fenólicas presentes en las orquídeas *Prosthechea karwinskii* y *Prosthechea varicosa*, partiendo de que actualmente no hay estudios científicos de dicha fracción en estas dos especies de orquídeas y además, no hay un método de extracción que permita el manejo de cantidades pequeñas de materia vegetal y disolventes, y acorte el tiempo de extracción en comparación con los métodos convencionales de extracción.

Planteamiento del problema

El estado de Oaxaca es el que cuenta con mayor riqueza de especies de orquídeas del país; estas representan una fuente potencial de ingresos adicionales para los habitantes de algunas comunidades rurales donde crecen éstas, donde llegan a ser colectadas y comercializadas para el mercado ilícito de plantas a nivel local, estatal y hasta nacional. Esto significa que los pobladores no tienen un programa de aprovechamiento de este recurso natural por lo que realizan una explotación que podría llevar a la extinción de algunas poblaciones de estas plantas a través de su sobrecolecta y venta inmoderada.

Siendo las orquídeas la familia más numerosa de plantas con flores (alrededor de 30 000 especies), éstas han sido vistas básicamente como elementos de ornato y pocas veces su aprovechamiento se ha dirigido a otros campos como el alimenticio, medicinal y cosmetológico. Por otro lado, los estudios que han evaluado aspectos fitoquímicos y farmacológicos en orquídeas han sido escasos, los pocos que se conocen se han realizado apenas en años recientes y hacen ver un panorama de aplicaciones muy amplias en la medicina. Algunas orquídeas analizadas son especies presentes en México, lo que hace suponer que estas aplicaciones podrían encontrarse en más orquídeas mexicanas. *Prosthechea karwinskii* y *P. varicosa* son dos especies de orquídeas comunes en bosques templados de México, para las cuales se desconoce su composición química, pero estas dos

especies de orquídeas son un potencial de aprovechamiento como recurso en la industria alimentaria, farmacéutica y de cosmetología.

Además, en los últimos años ha adquirido gran importancia el tratamiento de muestra, la etapa de extracción, ya que solo se han utilizados métodos convencionales que requieren tiempos de extracción largos y consumo de disolventes orgánicos tóxicos al ambiente y a la salud humana, y una solución es el uso de métodos de extracción con fuentes de energía auxiliares (asistidos por ultrasonidos, microondas, láser, líquidos sobrecalentados) que reducen el consumo de disolventes orgánicos y tiempo de extracción. Pero estas metodologías de extracción requieren también de un diseño experimental, que permita tener reproducibilidad y representatividad de la información obtenida del proceso analítico.

Objetivo general

Optimizar dos métodos de extracción acelerados mediante energías auxiliares (ultrasonidos y líquido sobrecalentado) y caracterizar la fracción fenólica en *Prosthechea karwinskii* y *Prosthechea varicosa*.

Objetivos específicos:

- a. Poner a punto un método rápido y eficaz de extracción de los analitos presentes en *Prosthechea karwinskii* y *Prosthechea varicosa*.
- b. Caracterizar fenólicamente los extractos obtenidos mediante cromatografía líquida.
- c. Optimizar el método de extracción acelerado mediante los ultrasonidos

- d. Optimizar el método de extracción acelerado a través de líquidos sobrecalentados.

Capítulo I. Marco Teórico

I.1 Proceso Analítico en el tratamiento de muestras sólidas

El proceso analítico para el tratamiento de muestras sólidas consta de varias etapas. Mientras que algunas de ellas —tales como la medida y transducción de las señales instrumentales y la recogida de datos— son comunes a todos los procesos analíticos, las etapas precedentes a la introducción de la muestra tratada en el instrumento de medida (p. ej. muestreo, disolución, limpieza, preconcentración, separación individual, derivatización), las cuales son críticas para asegurar la exactitud y reproducibilidad de los resultados, pueden variar mucho de un proceso a otro. Todos los métodos analíticos incluyen una etapa, más o menos laboriosa, de tratamiento de muestra. A pesar de los sorprendentes avances en instrumental analítico, muchos de los métodos que actualmente se siguen usando para el tratamiento de muestra se basan en tecnologías del siglo XIX. Por ejemplo, la extracción soxhlet convencional fue desarrollada hace más de 100 años [1] y actualmente se usa, e incluso constituye un método de referencia, en una amplia variedad de casos, así como otro gran número de técnicas de tratamiento de muestras, que se desarrollaron hace varias décadas y que prácticamente no han sufrido ningún tipo de mejora o modificación a lo largo de los años.

No obstante, en los últimos años, el tratamiento de muestra está experimentando una mayor evolución debida al desarrollo de equipos especializados, tal como ocurrió en el caso de la cromatografía y la espectroscopía. Por otro lado, numerosos esfuerzos realizados para introducir nuevos conceptos en el tratamiento de muestra se han visto frustrados debido al uso de métodos de tratamiento de muestra tradicionales que está asociado a diversos problemas como los relacionados con el empleo de disolventes orgánicos tóxicos y con el de métodos que requieren varias etapas, lo que puede dar lugar en muchos casos a la pérdida de parte de los analitos durante el tratamiento.

Otro factor importante a tener en cuenta es el tiempo; una extracción soxhlet, por ejemplo, suele requerir entre 12 y 48 horas, lo que implica una ralentización del proceso analítico significativa, así como un aumento de los costes del proceso analítico global. Entre los

Capítulo I. Marco Teórico

tratamientos de muestra previos a su introducción en el instrumento de medida existe una gran diferencia dependiendo de que se trate de muestras gaseosas, líquidas o sólidas. Mientras que las muestras gaseosas casi no requieren tratamiento previo, las muestras líquidas y sólidas suelen necesitarlo. De estas dos últimas, el tratamiento de muestras sólidas es, obviamente, mucho más complejo dado el alto número de matrices que pueden considerarse (p. ej. suelos, sedimentos, polímeros, materiales metalúrgicos, alimentos y tejidos biológicos). Además, en la mayoría de los casos, la primera etapa en el tratamiento de una muestra sólida es la de llevar los analitos a un medio líquido (mediante lixiviación, digestión, y todo lo que esto implica.) y, a partir de ahí, someter ese líquido a otro tratamiento similar a los que se realizan a las muestras líquidas (filtración, limpieza, dilución, preconcentración, todo lo que esto implica) [2]. Dos aspectos clave para la mejora de estos tratamientos de muestra son su aceleración y automatización parcial o total (**Figura 1**).

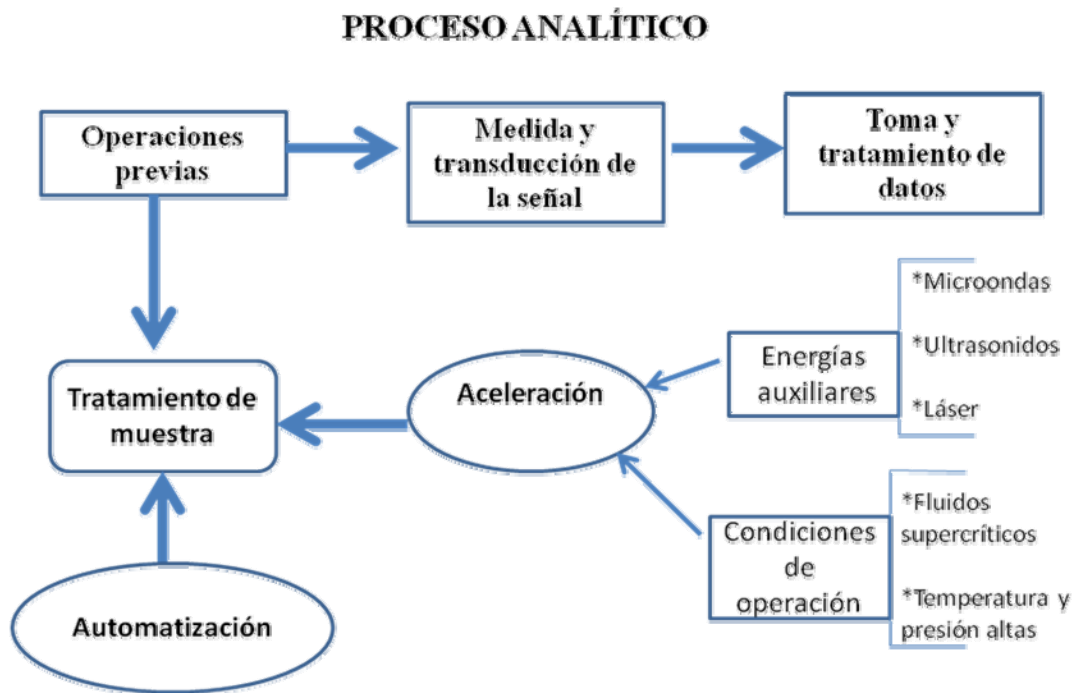


Figura 1. Alternativas para la aceleración de la preparación de la muestra.

Capítulo I. Marco Teórico

Para la aceleración de estos tratamientos de muestra, la mejor opción es el uso de alguna de las llamadas fuentes auxiliares de energía. De estas fuentes cabe destacar la energía microondas, los líquidos sometidos a altas presiones y temperaturas, los fluidos supercríticos, los ultrasonidos y la energía láser. Entre ellas, la extracción con fluidos supercríticos ha pasado a un segundo plano en los últimos años debido a que, si bien en un principio pareció una técnica muy prometedora, a lo largo de estos años ha ido perdiendo relevancia frente alternativas más baratas y con las que se obtienen mejores resultados en la mayoría de los casos, como son las basadas en el uso de disolventes a alta presión y temperatura, pero sin llegar a las condiciones supercríticas [3].

A continuación se describen los distintos métodos utilizados a lo largo del desarrollo experimental de la tesis: (a) (líquido sobrecalentado) y se caracterizó la fracción fenólica de dos especies de orquídeas (b) y como parte complementaria de este trabajo se caracterizó la fracción fenólica y lipídica (por ultrasonidos asistidos) de *Heterotheca inuloides*. En cada caso, se describen los fundamentos básicos de cada una de las energías empleadas, los equipos o dispositivos experimentales que se pueden utilizar, los parámetros implicados, así como las principales aplicaciones centradas en el campo de la extracción utilizadas.

1.1.1 Uso de ultrasonidos para la aceleración del tratamiento de muestras sólidas

Los ultrasonidos son simples sonidos con una frecuencia superior a la que el oído humano permite oír. En el hogar, los ultrasonidos se emplean típicamente en los silbatos de los perros y en alarmas antirrobo. En los hospitales, se usan para eliminar piedras en el riñón sin cirugía, para el tratamiento de daños en los cartílagos y para el desarrollo de imágenes fetales durante la gestación. Escalpelos ultrasónicos son utilizados por los cirujanos cuando es necesario cortar sin realizar ningún tipo de presión. En la industria, constituyen una herramienta muy efectiva para emulsificar cosméticos y alimentos, cortar aleaciones, pegar plásticos, degasificar y como sistemas de limpieza [2,3].

En 1927, Alfred Loomis descubrió el inusual efecto químico de la cavitación. El Dr. Kart Dussik, un psiquiatra del hospital de Bad Ischl, Austria, fue la primera persona en utilizar los ultrasonidos para localizar un tumor cerebral en 1942. La primera aplicación de los ultrasonidos a un sistema químico fue realizada en 1946 para medir la extensión de un

proceso de polimerización [4]. En los siguientes años, muchos otros químicos han explorado la sonoquímica, aumentando notoriamente el número y tipo de aplicaciones a partir de los años 80, cuando se empezaron a comercializar los equipos de laboratorio.

En sólo pocas décadas, la sonoquímica ha encontrado aplicaciones en diferentes áreas; desde el diagnóstico biomédico, pasando por la química de los materiales hasta la protección ambiental [2,4].

I.2 Aspectos generales del fenómeno de cavitación

Las ondas sonoras son vibraciones mecánicas en un sólido, un líquido o un gas. Los ultrasonidos tienen las mismas características, pero una frecuencia superior a la audible por los humanos (que comprende entre 1 Hz hasta 16 kHz). La frecuencia ultrasónica más baja se considera de 20 kHz. La más alta viene sólo limitada por la posibilidad de generarla [5].

Las ondas mecánicas son intrínsecamente diferentes a las ondas electromagnéticas, ya que las primeras —a las que pertenecen las ondas sonoras— sólo se transmiten a través de la materia, puesto que su transmisión implica ciclos de expansión y compresión. Los ciclos de compresión acercan las moléculas del medio en el que se transmiten, mientras que los de expansión las separan.

En un líquido, los ciclos de expansión producen presiones negativas que separan unas moléculas de otras. Si los ultrasonidos son suficientemente intensos, los ciclos de expansión pueden crear burbujas o cavidades en el líquido. Este es el caso cuando la presión negativa ejercida excede la fuerza de tensión local del líquido, lo que depende de su naturaleza y pureza. El proceso por el cual las burbujas se forman, crecen y explotan se conoce como “cavitación”. El proceso completo comprende un tiempo alrededor de los 400 μ s. Normalmente, la cavitación es un proceso nucleado, es decir, se produce en puntos débiles del líquido tales como grietas llenas de aire en material particulado en suspensión o microburbujas transitorias formadas en un proceso de cavitación previo. La mayoría de los líquidos están suficientemente contaminados con pequeñas partículas como para que el fenómeno de cavitación se produzca sin necesidad de ultrasonidos de alta intensidad [6].

Capítulo I. Marco Teórico

En 1894, Sir John Thornycroft and Sydney W. Barnaby describieron por primera vez el fenómeno de cavitación. Durante las pruebas de un nuevo barco de alta velocidad adjudicaron las fuertes vibraciones observadas así como la erosión producida en las aspas del motor a la formación de burbujas de cavitación. Aunque en este caso la causa de la cavitación fue una alta turbulencia, los ultrasonidos de alta intensidad causan efectos similares.

La importancia de la cavitación en sonoquímica no es tanto en cómo las burbujas se forman, sino en lo que ocurre cuando explotan. En algún momento, las burbujas no pueden absorber más energía eficazmente y, por tanto, explotan. La rápida compresión adiabática de gases y vapores en las burbujas o cavidades produce temperaturas y presiones extremadamente elevadas. Suslick y colaboradores [6], estimaron que la temperatura de estos puntos calientes (formados cuando las burbujas explotan) era alrededor de 5000 °C, una temperatura similar a la existente en la superficie del sol. La presión es de aproximadamente 1000 atmósferas, presión equivalente a la existente en las fosas marianas, el punto más profundo del océano. El tamaño de las burbujas es muy pequeño comparado con el volumen total del líquido, por lo que el calor que estas burbujas producen al explotar es rápidamente disipado sin que se produzca un cambio apreciable de las condiciones ambientales. El enfriamiento que sigue a la explosión de una burbuja cavitacional se produce a una velocidad de 10 billones de °C por segundo, lo que supone un enfriamiento un millón de veces más rápido que el producido cuando se mete una barra de hierro al rojo vivo en agua. La cavitación acústica, por tanto, constituye una interacción única entre energía y materia.

Las altas presiones y temperaturas alcanzadas producen la formación de radicales y otros compuestos. Cuando la cavitación ocurre en un líquido cercano a una superficie sólida, el proceso de explosión de la cavidad cambia drásticamente. En líquidos puros, la burbuja mantiene su forma esférica durante la explotación ya que el entorno que la rodea es uniforme. Sin embargo, cuando ésta se encuentra cerca de una superficie sólida, la burbuja explota de forma asimétrica produciendo pequeñas corrientes de líquido a alta velocidad. La energía potencial de una burbuja de expansión se transforma en energía cinética de la corriente de líquido que se mueve a través del interior de la burbuja y penetra la superficie

de una burbuja vecina. Se han observado corrientes de líquido con velocidades cercanas a los 400 km/h. El impacto de estas corrientes sobre una superficie sólida es obviamente muy fuerte. Estos impactos pueden dar lugar a daños importantes en el sólido produciendo, por tanto, nuevas superficies que quedan expuestas al efecto de los ultrasonidos [7].

I.2.1 Tipos de dispositivos de ultrasonidos empleados en el tratamiento de muestras

Los ultrasonidos pueden aplicarse a los sistemas químicos usando dos tipos de dispositivos: los baños y las sondas de ultrasonidos. Aunque los baños son más ampliamente usados, las sondas son más efectivas y no conllevan los dos problemas principales de los baños: (1) la falta de uniformidad en la transmisión de los ultrasonidos y, (2) la disminución de la potencia con el tiempo. Estas dos limitaciones hacen que la repetibilidad y reproducibilidad de las operaciones realizadas con baños ultrasónicos sea muy baja. Por esta razón, el uso de baños debería restringirse a operaciones simples como las de limpieza, eliminación de gases disueltos, disolución y todo lo que esto implica, para las que han sido diseñados.

Las sondas ultrasónicas (también llamadas sonotrodos) focalizan su energía en una zona específica, donde el fenómeno de cavitación se incrementa enormemente. Además, estas sondas son más flexibles en lo que se refiere a su construcción, permitiendo por tanto el diseño de sonotrodos para una aplicación determinada [7].

Las variables a tener en cuenta en un proceso asistido por ultrasonidos incluyen la dirección, la amplitud, la frecuencia de vibración en el punto de aplicación, el ciclo útil y el ensamblaje de las piezas de la sonda.

I.2.2 Tratamientos de muestra asistidos por ultrasonidos

Los ultrasonidos se han usado en los últimos tiempos en una gran variedad de aplicaciones para el tratamiento de muestras. Una de las más interesantes es la lixiviación asistida por ultrasonidos, tanto en sistemas continuos como discontinuos, empleando baños y sondas. Los ultrasonidos se han empleado en sistemas de muestreo tales como nebulizadores ultrasónicos, en muestreadores ultrasónicos de suspensiones empleados en espectroscopía

de absorción atómica con horno de grafito, como fuente de energía auxiliar en procesos analíticos, para desgasificar y en sistemas de filtración [8, 9].

I.3 Extracción con disolventes a temperatura y presión altas

En los últimos años, se ha desarrollado una modalidad de extracción basada en el uso de disolventes a temperatura y presión altas (pressurized hot solvent extraction, PHSE) sin llegar a alcanzar el punto crítico, con el fin de aumentar el grado de automatización, acortar los tiempos y reducir la cantidad de disolvente requerido para los procesos de lixiviación. Es de destacar el hecho de que, aunque del nombre de la técnica parece desprenderse que la presión es la variable clave, realmente es la temperatura la que le confiere sus principales características, ya que con la presión alta lo único que se persigue es mantener el lixivante en estado líquido por encima de su punto de ebullición. El uso de esta modalidad se ha ido extendiendo enormemente, siendo el área ambiental la más beneficiada, dado el potencial que la PHSE ha mostrado en ese campo debido a sus características tales como el bajo consumo de disolvente orgánico y la rapidez con que se llevan a cabo las lixivaciones [10]. Entendiéndose que en el presente trabajo se hablará de extracción con fluidos ó líquidos sobrecalentados de manera indistinta para facilitar la comprensión del lector.

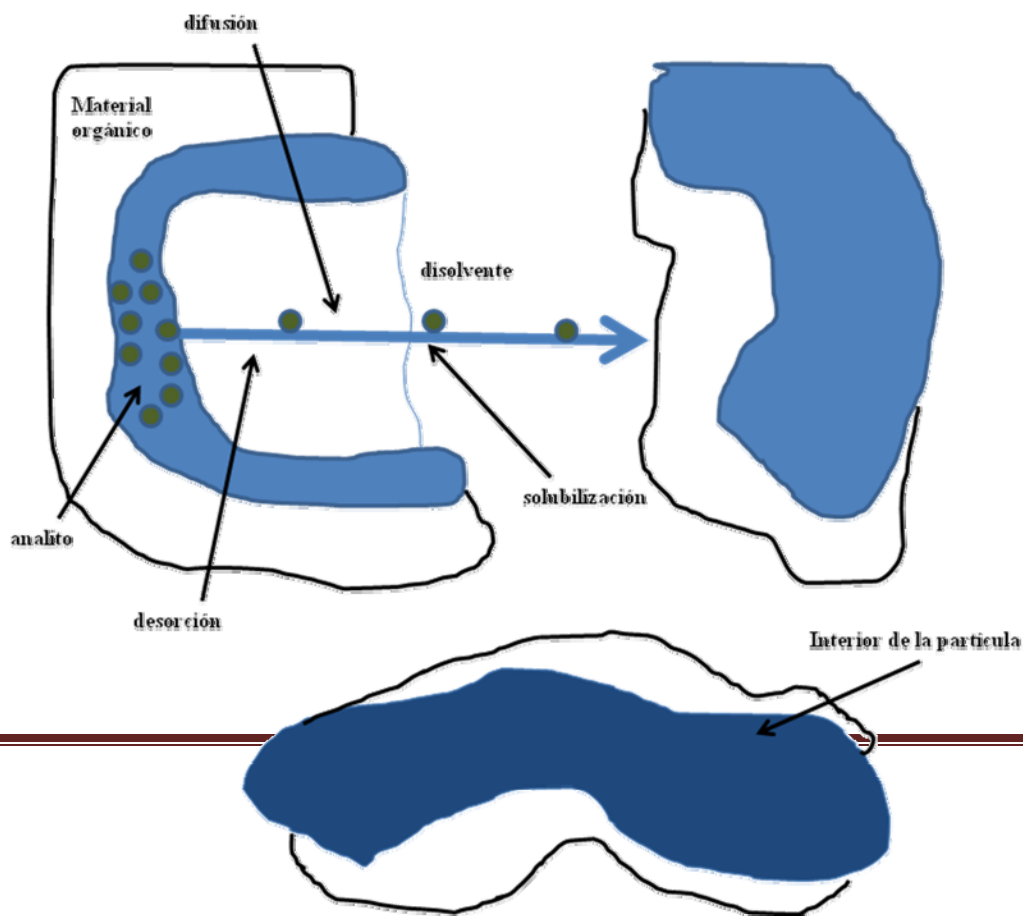
Este método ha recibido diferentes nombres, el más internacionalmente usado desde mediados de los 90 es el de extracción con disolventes a presión (pressurized solvent extraction, PSE). No obstante, a lo largo del tiempo, los autores han ido empleando otros términos tales como extracción acelerada con disolventes (ASE) [10], extracción con fluidos a presión (PFE), extracción con líquidos a presión (PLE), y todo lo que esto implica. El hecho de que los autores empleen diferentes nombres lleva a confusión, ya que puede parecer que se tratan de técnicas diferentes, cuando en realidad se trata siempre de lixiviación en condiciones de temperatura y presión altas.

Capítulo I. Marco Teórico

Este tipo de extracción puede llevarse a cabo en la modalidad estática, en la que un volumen determinado de extractante se mantiene en contacto con la muestra durante un tiempo concreto; en la modalidad dinámica, haciendo circular el extractante a través de la muestra, o realizando una combinación de ambas modalidades. Mientras que en la modalidad estática suele emplearse un disolvente orgánico, en la dinámica es común el uso de agua como agente lixivante, de ahí que algunos autores la denominen extracción con agua subcrítica.

I.3.1 Parámetros que afectan a la extracción con disolventes a temperatura y presión altas

El proceso de lixiviación se ve influenciado por una serie de parámetros que, a su vez, dependen del número de pasos implicados en el transporte de los analitos desde la matriz hasta el lixivante. La desorción de los analitos de muestras sólidas puede describirse mediante un modelo constituido por tres etapas, tal y como se muestra en la **Figura 2**: (1) *desorción* del analito de la partícula sólida, (2) *difusión* a través de la matriz de la muestra, (3) *solubilización* en la corriente del fluido. Cada etapa depende de una serie de factores



tales como la temperatura, la presión, el tipo, volumen y caudal del extractante, y la composición de la matriz de la muestra, cuyo efecto y potencial de manipulación deben estudiarse en cada caso [11].

Figura 2. Proceso de extracción de analitos de muestras sólidas.

Temperatura

La temperatura es el factor más importante en PHSE, afectando a la cinética de transferencia de materia o, lo que es lo mismo, a la eficacia de la extracción no sólo en PHSE, sino también en otros métodos de extracción. Así ocurre en la extracción con fluidos supercríticos (SFE), donde la constante dieléctrica del agente lixivante, y por tanto su potencial para extraer determinadas especies, varía considerablemente con los cambios de temperatura [11], y en el caso de la extracción asistida por microondas, donde la temperatura es un factor clave para que los métodos sean reproducibles [12].

El uso de elevadas temperaturas aumenta el poder de solubilización de los disolventes. El cálculo de la dependencia de la solubilidad de una disolución ideal con la temperatura permite conocer el incremento de dicha solubilidad para un incremento de temperatura previamente calculado. Es un hecho constatado que la solubilidad del agua en disolventes orgánicos aumenta con la temperatura [13]; lo que es de especial interés en aquellos casos en los que la eficacia de la extracción disminuye porque los disolventes orgánicos a bajas temperaturas y presiones son excluidos de los poros de la matriz de la muestra que contienen los analitos y que están protegidos por el agua. El incremento de la solubilidad del agua en disolventes orgánicos al aumentar la temperatura facilita la disponibilidad de estos poros protegidos y, en consecuencia, de los analitos en ellos contenidos.

El incremento de la temperatura tiene también un efecto positivo en la velocidad de difusión y, por tanto, en la eficacia de la extracción. Es difícil obtener una relación concreta entre el incremento de la temperatura y su efecto sobre la velocidad de difusión, especialmente para concentraciones finitas y sistemas multicomponentes. Se ha estimado

que, en la mayoría de los sistemas, la velocidad de difusión aumenta de manera irregular de 2 a 10 veces cuando se incrementa la temperatura de 25 a 150 °C [14].

Los cambios de temperatura influyen en el equilibrio superficial. Estos cambios modifican las interacciones que existen entre la matriz y el soluto debido a fuerzas de Van der Waals y a puentes de hidrógeno entre las moléculas de soluto y los sitios activos de la matriz, e incluso pueden conducir a alteraciones del equilibrio superficial como consecuencia de cambios positivos en la temperatura. La energía térmica puede romper cohesiones (soluto–soluto) y adhesiones (soluto–matriz) al disminuir la energía de activación requerida para el proceso de desorción. Además, los puentes de hidrógeno se debilitan al aumentar la temperatura, tal como indican Pimentel y Mc Cleman [14]. La viscosidad de los disolventes líquidos también se ve afectada, disminuyendo su valor al aumentar la temperatura y permitiendo así mejor penetración en la matriz y mejorando, por tanto, la extracción. Además, el incremento de la temperatura hace que la tensión superficial del disolvente, de los solutos y de la matriz también se reduzca, permitiendo así que el disolvente “moje” mejor la matriz de la muestra, favoreciendo de esta manera que los analitos se disuelvan más rápidamente [15].

El efecto negativo de esta modalidad de extracción es especialmente claro en los casos de especies termolábiles, pero también el aumento de temperatura conlleva la disminución de la densidad de los extractantes, lo cual puede repercutir en su poder extractante.

Presión

En PHSE se requiere una presión adecuada para mantener el extractante en estado líquido. El uso de altas presiones facilita aquellas extracciones en las que los analitos quedan atrapados en los poros de la matriz de la muestra. El aumento de presión permite al disolvente penetrar en zonas de la matriz en las que en condiciones atmosféricas normales no llegaría. El aumento de presión (junto con elevadas temperaturas y reducida tensión superficial del disolvente) obliga al disolvente a penetrar en el interior de los poros y ponerse así en contacto con los analitos. El aumento de la presión favorece la solubilización de burbujas de aire de manera que el disolvente entra más rápidamente en estrecho contacto con la matriz de la muestra [11].

Capítulo I. Marco Teórico

La sobrepresión tiene un efecto positivo en el tiempo requerido para llenar la célula de extracción con el disolvente, especialmente para muestras de pequeño tamaño de partícula [12]. En cambio, un incremento de presión puede generar cambios en la superficie de la matriz produciendo una disminución en la eficacia de la extracción de los analitos para algunos tipos de matrices [11].

Tipo de lixiviante

La correcta elección del disolvente es de gran importancia para el desarrollo óptimo de un proceso de lixiviación. Existe un amplio rango de lixiviantes que pueden utilizarse en PHSE, de los que se excluyen los que presentan una temperatura de auto ignición entre 40 y 200 °C (como es el caso del disulfuro de carbono, el éter dietílico y el 1,4-dioxano) y aquéllos con un marcado carácter no polar, tales como el hexano [12]. En general, debería evitarse el uso de bases y ácidos fuertes como disolventes, debido a que su carácter corrosivo aumenta considerablemente a altas presiones y temperaturas [11]. Generalmente, la conversión de las condiciones de lixiviación usadas en los métodos convencionales a métodos PHSE no requiere el cambio del disolvente; sin embargo, la técnica PHSE proporciona la oportunidad de usar una gran variedad de disolventes o mezcla de éstos, incluso aquéllos cuyo uso no sería efectivo en métodos convencionales.

En la modalidad estática predomina el uso indiscriminado de disolventes orgánicos como tolueno [11], metanol [12], acetona [12], y todo lo que esto implica, así como el de sus mezclas (generalmente en proporción 1:1) con disolventes no polares; tales como diclorometano–acetona, acetona–hexano, heptano–acetona, acetona–isohexano, metanol–agua [15], debido a que el parámetro de solubilidad de una mezcla binaria es proporcional a los parámetros de solubilidad de sus componentes en función de su relación de volúmenes [14].

El agua como extractante se ha usado en muy pocas ocasiones en la modalidad estática [14, 15] siendo, sin embargo, el extractante más usado en la modalidad dinámica para matrices tan variadas como suelos, alimentos, plantas, etc., y para analitos de muy diferente polaridad, desde herbicidas ácidos hasta aceites, PAHs, PCBs, carbamatos, etc.

Volumen del disolvente

Capítulo I. Marco Teórico

La cantidad de disolvente requerido en un proceso de extracción depende del modo usado. La extracción PHSE puede realizarse en modo estático, en modo dinámico o mediante una combinación de ambas modalidades. En el modo estático, la muestra se somete a extracción con el mínimo volumen de disolvente (<15 ml) sin flujo de éste [15]. Cuando la transferencia de masa alcanza el equilibrio, los analitos se recogen mediante un rápido desalojo de la célula de extracción con disolvente y gas inerte, pero en la matriz aún queda un porcentaje de la cantidad inicial del analito que será función del coeficiente de reparto. Cuando el equilibrio de partición se desplaza hacia la solubilización de los analitos en el extractante es necesario utilizar un mayor volumen de dicho extractante y, por tanto, de la célula de extracción empleada. Si el volumen empleado en la modalidad estática no es suficiente para extraer cuantitativamente los analitos problema es necesario realizar varios ciclos de extracción estática o bien emplear la modalidad dinámica. En el modo dinámico de PHSE —proceso al que sí se le puede asignar el nombre de lixiviación—, el extractante fluye continuamente a través de la célula que contiene la muestra; de esta manera el volumen de disolvente que se pone en contacto con el sólido depende directamente del caudal y del tiempo empleado para la extracción. Evidentemente, el modo dinámico requiere mayores volúmenes que el modo estático y es, por tanto, menos adecuado para el análisis de trazas, aunque existen diversas estrategias para minimizar el efecto de dilución.

Caudal de disolvente

El caudal al que el extractante circula a través de la muestra sólida es una variable característica del modo dinámico. El efecto que tiene sobre la eficacia y la rapidez de este tipo de extracción puede utilizarse para determinar si el proceso está limitado por la solubilidad del analito en el extractante, la difusión en las partículas y/o la transferencia desde la superficie de la partícula al disolvente. Si la eficacia de extracción no aumenta cuando el caudal se incrementa, la extracción no está limitada ni por la solubilidad ni por el equilibrio de transferencia de materia matriz–extractante; por lo tanto, el factor limitante será la difusión dentro de la partícula sólida. La velocidad de extracción debe aumentar en este caso incrementando la temperatura. Si el factor limitante es la solubilidad de los analitos, a doble caudal, doble cantidad de fluido y, por tanto, si los analitos experimentan

diferentes procesos de adsorción–desorción durante el proceso de elución en la cámara de muestra, un caudal doble duplicará la velocidad de extracción [11].

En la mayor parte de los métodos desarrollados, los caudales empleados están comprendidos entre 0.5–3.0 ml/min. El uso de caudales muy bajos (<0.5 ml/min) no es recomendable ya que esto puede conducir fácilmente a obturaciones del restrictor usado para mantener la presión del sistema, mientras que si se emplean caudales superiores a 3 ml/min el efecto de dilución de los analitos en los extractos aumenta, dificultando, por tanto, la posterior determinación de las especies extraídas [16].

Composición de la matriz

La composición de la muestra tiene un efecto determinante en la extracción. Las muestras sólidas pueden diferir significativamente en sus propiedades fisicoquímicas, en el tipo de compuestos que las constituyen y en la granulación (tamaño de partícula). Estos parámetros afectan a la desorción y a la retención de los analitos. La influencia del tamaño de partícula en los rendimientos de la extracción en PHSE depende de cuál sea el parámetro que controla el proceso de extracción. Es obvio que si la velocidad está limitada por la difusión de los analitos, la extracción se verá incrementada de manera significativa al disminuir el tamaño de partícula.

Otros aspectos que también deben tenerse en cuenta son: (1) el envejecimiento de la muestra (tiempo de vida útil de la muestra sólida). Se ha observado que en algunos casos la influencia del tipo de disolvente en la eficacia de la extracción cambia con el tiempo de envejecimiento de la muestra [16]. (2) la cantidad de agua de la muestra. Se recomienda trabajar con muestras secas o bien añadir un desecante junto con la muestra en la célula de extracción para eliminar así el posible efecto negativo que pueda ejercer el agua en la eficiencia de la extracción [14].

Cantidad de muestra

Generalmente se emplean tamaños de muestra entre 0.5 y 10 gramos. Es evidente que el tamaño de partícula debe ser el adecuado para asegurar la homogeneidad de la muestra y obtener suficiente sensibilidad en el análisis de trazas. Sin embargo, cuanto mayor es el

tamaño de muestra son necesarios mayores volúmenes de extractante para la extracción cuantitativa de los analitos y, por tanto, con más facilidad se produce el bloqueo del sistema o del restrictor [16]. Normalmente, es preferible una cantidad de muestra pequeña (< 5 g) para evitar su compactación en la cámara de extracción, sobre todo en la modalidad dinámica, donde el disolvente está circulando continuamente y es más fácil que la muestra se compacte a la salida de la cámara, pudiendo llegar a atascar el sistema causando una elevada sobrepresión y pudiendo llegar incluso a hacer que la cámara de extracción estalle. Por otra parte, cuanto menor es la cantidad de muestra, más volumen de la cámara puede ser ocupado por el extractante, mayor es la relación extractante–analito y más desplazado está el equilibrio de partición hacia la solubilización de los analitos, lo que favorece su extracción.

Tiempo de extracción

Los tiempos de extracción en la modalidad estática son muy cortos comparados con los que normalmente se requieren en los métodos basados en métodos de extracción sólido–líquido convencionales como son la extracción con agitación manual o la extracción soxhlet. El tiempo de extracción dependerá en todo caso del tipo de proceso que limita la velocidad de extracción. La modalidad de extracción dinámica es más efectiva, dado que la muestra se pone en contacto en todo momento con extractante limpio [16].

I.3.2 Etapas implicadas en un proceso de extracción con disolventes a alta presión y temperatura

Las etapas de un proceso de extracción con disolvente a temperatura y presión altas varían según la modalidad en la cual éste se lleve a cabo, si bien las primeras etapas son comunes a las tres modalidades (estática, dinámica o estática–dinámica). La **Figura 3** muestra un esquema de las distintas etapas implicadas dependiendo de la modalidad de extracción utilizada. Las etapas de introducción de la muestra en la cámara de extracción, el llenado y presurización del sistema con el extractante y el calentamiento del sistema son comunes a todas las modalidades. Una vez que se alcanza la temperatura deseada, comienza la extracción propiamente dicha. La extracción estática consiste en dejar un volumen de disolvente fijo en la cámara de extracción durante un tiempo determinado, transcurrido el

cual el extracto se recoge purgando el sistema con un gas (generalmente N_2). Se puede llevar a cabo un único ciclo de extracción o varios si son necesarios para la extracción cuantitativa de las especies de interés.

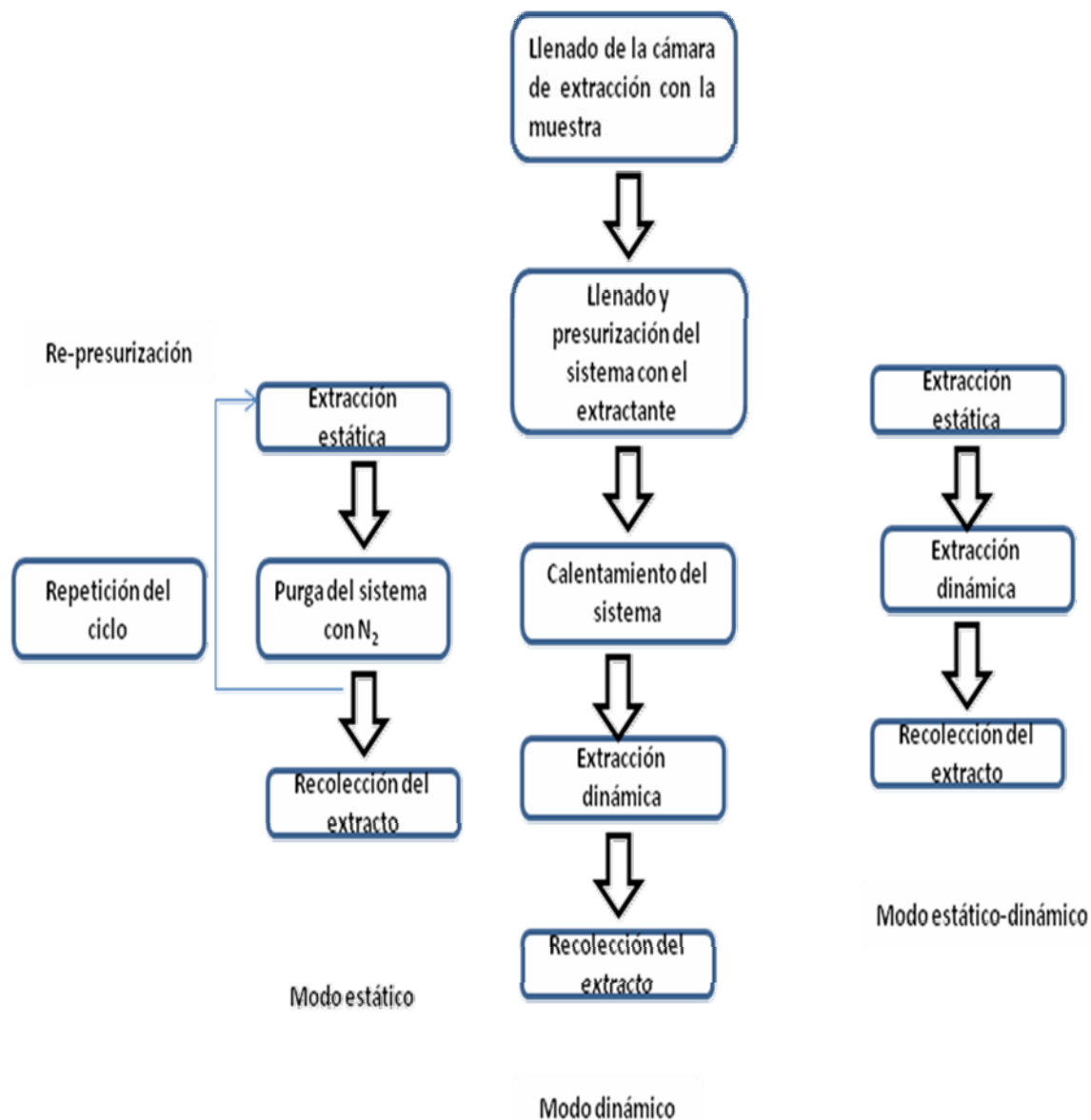


Figura 3. Etapas de un proceso de extracción con fluido a presión y temperatura altas.

Capítulo I. Marco Teórico

En la modalidad dinámica, una bomba de alta presión impulsa el disolvente continuamente a través del sistema a un caudal determinado durante el tiempo necesario para la extracción de los analitos. En este caso la purga del sistema al final de la extracción no es necesaria ya que el extractante está fluyendo continuamente a través del sistema. Esta segunda modalidad tiene la ventaja de que extractante limpio se pone en contacto continuamente con la muestra, por lo que se favorece el desplazamiento del equilibrio de los analitos entre la matriz y el extractante hacia la solubilización de aquéllos. El principal inconveniente de esta modalidad es la mayor dilución de los extractos.

En la modalidad estática–dinámica se comienza operando como en la modalidad estática, dejando un volumen de disolvente en contacto con la muestra durante un tiempo determinado y, posteriormente, en lugar de usar una corriente de gas para purgar el sistema, se bombea el propio disolvente a un caudal y durante un tiempo determinado. En muchos casos, la combinación de las dos modalidades ha permitido la extracción cuantitativa de los analitos en tiempos de extracción inferiores a los requeridos por una de las modalidades simples, y con una dilución menor que la proporcionada por la modalidad dinámica [16,17].

I.3.3 Equipos de extracción

A tenor de las etapas implicadas en cada modalidad de extracción, varían los dispositivos de los equipos utilizados, si bien tienen en común muchos de los elementos, como puede observarse en la **Figura 4**.

Mientras que la modalidad estática suele llevarse a cabo con un equipo comercial (equipos de la casa Dionex, ASE-200 y ASE-300), la modalidad dinámica y la estática–dinámica sólo se pueden realizar mediante un extractor fabricado en el laboratorio, ya que no existen equipos comerciales.

El esquema de un extractor para la modalidad dinámica se muestra en la **Figura 4**. Los elementos esenciales son: (1) una bomba de alta presión que permite llenar y presurizar el sistema con el lixivante; (2) una cámara de lixiviación que consiste en un cilindro metálico de acero inoxidable cerrado con dos conectores a ambos extremos que permiten la circulación del agente lixivante a través del sistema. En ambos extremos se colocan filtros metálicos que impiden que la muestra salga de la cámara; (3) un precalentador que consiste

en un bucle de tubo de acero o en una cámara similar a la de lixiviación, que se coloca delante de la cámara de muestra y que actúa como depósito de disolvente. La presencia de este precalentador asegura que el lixivante se encuentra a la temperatura de trabajo prefijada cuando se pone en contacto con la muestra; (4) un horno eléctrico en el cual se sitúa la cámara de lixiviación y el precalentador y que permite alcanzar la temperatura deseada del sistema; (5) un sistema de refrigeración situado a la salida del horno y que permite enfriar el lixiviado antes de su recogida; (6) una válvula de abierto-cerrado situada antes del sistema de enfriamiento y que permite mantener la presión necesaria en el sistema durante la extracción estática; (7) una válvula situada entre la bomba de alta presión y el horno, que permite la purga del sistema con N_2 después de la lixiviación [18].

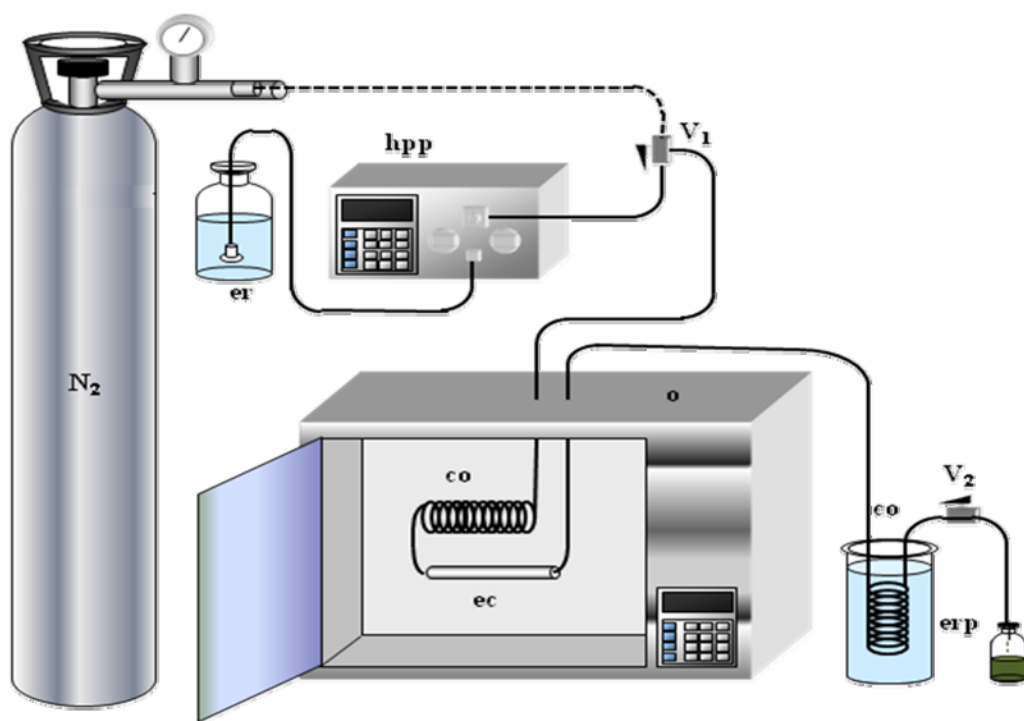


Figura 4. Equipo de lixiviación con líquido fluido sobrecalentado. **hpp** = bomba de alta presión, **er** = recipiente con extractante (entrada), **ph** = precalentador, **ec** = celda de extracción, **o** = horno, **co** = refrigerante, V_1 = válvula de selección, V_2 = válvula de restricción, **erp** = recipiente con extractante (salida).

La modalidad dinámica se lleva a cabo en un dispositivo similar al de la modalidad estática, pero con las siguientes modificaciones: (1) a la salida del horno se coloca una válvula para conseguir la presión necesaria al comienzo de la extracción; (2) al final del sistema de refrigeración se sitúa un restrictor con el objeto de mantener constante la presión del sistema durante toda la lixiviación; (3) la válvula de selección situada entre la bomba de alta presión y el horno se elimina, ya que en esta modalidad dinámica no se necesita purgar el sistema al final de la lixiviación.

En la modalidad estática–dinámica se utiliza el mismo extractor que para la modalidad dinámica, pero incluyendo una válvula entre la bomba de alta presión y el horno para llevar a cabo la etapa de extracción estática.

I.3.4 Aplicaciones de la extracción con disolventes a alta presión y temperatura

La modalidad estática ha sido aplicada de manera casi exclusiva en análisis ambiental. Sin embargo, en los últimos años, la modalidad estática se está aplicando con prometedores resultados en otros ámbitos analíticos como el farmacéutico, o el industrial, especialmente en la extracción de aditivos de polímeros [15,16, 17].

En el ámbito biológico, la modalidad estática se ha empleado con dos objetivos principalmente: para la extracción de especies contaminantes en alimentos y tejidos animales y para la de especies de interés de tejidos animales y plantas [17]. En el campo del análisis farmacéutico, también se ha usado con dos objetivos básicos: la extracción de sustancias farmacológicamente activas de plantas y, principalmente, para el control de calidad de tabletas y de alimentos suplementados con fármacos [12].

La modalidad dinámica se ha aplicado, al igual que la estática, al análisis ambiental, principalmente. En esta área, se ha empleado para la extracción de contaminantes tales como PAHs [12], PCBs, pesticidas, etc., de diversas matrices como suelos, sedimentos, cenizas, etc. En cuanto a la aplicación de la modalidad dinámica a materiales biológicos destaca la extracción de aceites esenciales de plantas como la extracción de los aceites de hinojo [16], mejorana [17], romero [18], orégano y eucalipto [18], y todo lo que esto implica. A diferencia de la hidrodestilación, la extracción con agua a presión y temperatura

altas permite manipular la composición del aceite a través de la modificación de los parámetros de extracción.

I.4 Uso de técnicas quimiométricas para el diseño y análisis de experimentos

La quimiometría es una disciplina que emplea la estadística, las matemáticas y la lógica formal para: (1) diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos; (2) proporcionar la máxima información química relevante mediante el análisis de los datos químicos; y (3) conocer los sistemas químicos [19].

Existe una amplia variedad de métodos quimiométricos que se utilizan con una gran variedad de objetivos (optimización de una etapa del proceso analítico, calibración multivariante, reconocimiento de pautas, etc.).

I.4.1 Optimización del proceso analítico: diseños experimentales

El término diseño experimental se usa en dos contextos. El primero es para describir el grupo de experimentos que se lleva a cabo con el fin de desarrollar un modelo, bien sea de calibración o ANOVA, ya que la calidad de este último está relacionada con la selección de dichos experimentos. El término se emplea también en el contexto de la optimización de productos o procesos: el diseño experimental se aplica para determinar de una forma eficaz los valores óptimos de las condiciones experimentales que afecten a la obtención de un determinado producto o al desarrollo de un proceso concreto.

En este sentido, a las condiciones experimentales que se van a optimizar se les llama factores, que se pueden definir como las variables que se cambian de manera controlada para estudiar el efecto que tienen (o pueden tener) en las características de interés del producto o procesos en estudio. Los factores pueden ser tanto cuantitativos como cualitativos. La definición se refiere a varios factores, ya que normalmente se estudian todas las posibles variables que se crea pueden afectar al sistema; por lo que el diseño experimental es una aproximación multivariante. Las características del producto o proceso que se quieran optimizar se llaman respuesta, mientras que el modelo que relaciona la respuesta con el efecto de los factores se llama función respuesta o superficie de respuesta.

Capítulo I. Marco Teórico

Mediante el diseño experimental se pretende poner de manifiesto el efecto de los factores y/o modelar la relación existente entre y y x con un mínimo de experimentos. En muchos casos se combinan ambos objetivos, de manera que se empieza determinando qué factores y en qué extensión afectan a la respuesta. El siguiente paso consiste en obtener un modelo que describa de forma cuantitativa dichos efectos. Finalmente, se define el conjunto óptimo de los valores que deben tener los factores para conseguir las mejores características del producto o proceso investigado. Es importante elegir apropiadamente el dominio experimental, es decir, los niveles extremos a los que se van a estudiar los factores.

Hay dos estrategias de optimización multivariante: secuencial y simultánea. Una estrategia secuencial consiste en llevar a cabo sólo unos pocos experimentos cada vez y usar éstos para determinar qué experimento se debe realizar a continuación. En una estrategia simultánea se planifican todos los experimentos que se van a llevar a cabo y después se evalúan [20].

I.5 Generalidades de la Familia Orchidaceae

El nombre orquídea aparece por primera vez registrado en el siglo III a.C. en un escrito de Teofrasto, en su obra “Investigación sobre las plantas” y el término deriva etimológicamente de *orkhis*=testículo por la forma de sus pseudobulbos. En la antigua Grecia se le atribuía propiedades curativas y afrodisiacas. En China se han encontrado registros de su cultivo de 1500 años de antigüedad [21].

Las orquídeas pueden vivir de manera terrestre, rupícola y epífita; siendo esta última la que se presenta con mayor frecuencia en ellas. Se cree que esta estrategia de vida dio como resultado adaptaciones particulares como: el velamen, una capa exterior en la raíz que permite la absorción de agua y nutrientes del medio; la presencia de pseudobulbos que actúan como órganos de reserva, raíces carnosas y hojas suculentas. Las flores de las orquídeas presentan una estructura básica formada por tres sépalos y tres pétalos, uno de ellos diferente a los otros dos y llamado labelo; sus estructuras reproductivas masculinas y femeninas se encuentran fusionadas en un solo órgano llamado columna que se localiza en el centro de la flor (ver **Figura 5**).

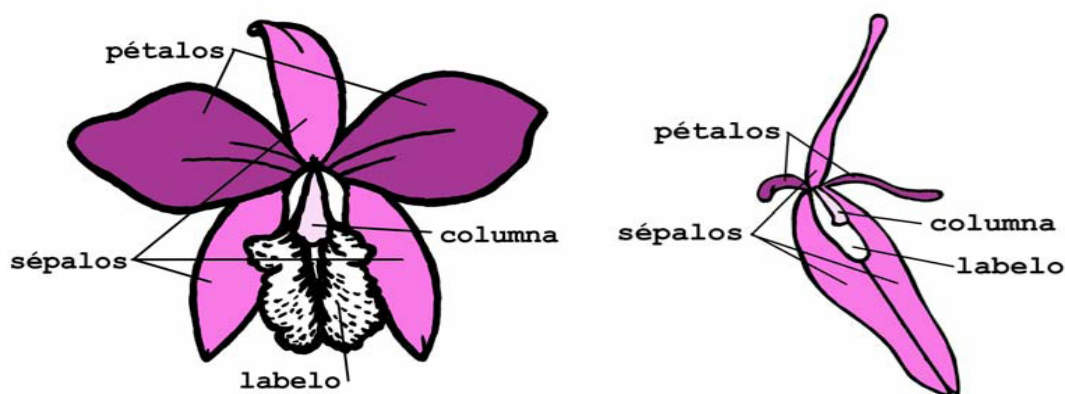


Figura 5. Estructura básica de las flores de orquídeas.

I.5.1 Orquídeas en México

México cuenta con más de 1200 especies de orquídeas descritas [22], de las cuales la mayor parte se encuentran creciendo entre 1000 y 2000 m s.n.m., en las zonas montañosas que se concentran en la parte sur del país; principalmente en los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Veracruz.

Del total de especies descritas, 444 especies son endémicas, lo que equivale al 40% del país. Oaxaca es el estado con mayor riqueza de orquídeas en el México y en él han sido registrados 144 géneros, 692 especies y 4 subespecies [23], que representa un poco más de la mitad de orquídeas conocidas en México. De esta riqueza, 62 especies son conocidas únicamente dentro de los límites del estado [24].

Si bien en México las orquídeas han sido un grupo bien estudiado y conocido, ha sido en áreas como taxonomía, etnobotánica y conservación donde se ha generado más conocimiento sobre el grupo. Por el contrario, hay una notable carencia de estudios sobre demografía, genética, medicina y farmacología. Para algunas orquídeas que han tenido usos en la medicina tradicional mexicana desde tiempos prehispánicos [25-28], sus aplicaciones han sido corroboradas recientemente y, mediante un enfoque quimiosistemático, se ha descubierto que otras orquídeas tienen potencial medicinal y farmacológico [29-38]. Pero aún existen muchas orquídeas que no cuentan con una caracterización química que nos permita corroborar los usos tradicionales que en diversas comunidades de México se les ha

Capítulo I. Marco Teórico

dado por varios años e inclusive dicha caracterización abriría el camino en el desarrollo de nuevos principios activos para fármacos, colorantes naturales, saborizantes o compuestos aromáticos.

Capítulo II. Materiales y método

II.1 Especies estudiadas

Prosthechea karwinskii. Esta orquídea es endémica de México, se distribuye en los estados de Michoacán, Morelos, Guerrero, Puebla y Oaxaca, donde crece entre 2000 a 2600 m de elevación, en bosques de encino y pino encino. Las plantas son epífitas en árboles de encino donde crecen en forma colgante (ver **Figura 6**); las flores son de color amarillo, fuertemente fragantes, con un aroma cítrico que desaparece por la noche y es más intenso a la luz solar directa [39], alógamas, es decir, no se autopolinizan [40] por lo que necesitan un polinizador que realice la transferencia de polen; su época de floración se presenta entre marzo y mayo. Esta orquídea ha sido una de las plantas más utilizadas desde la época prehispánica hasta la actualidad para uso ornamental, religioso, medicinal y artesanal [41]. Recientemente se ha reportado su uso para la preparación de alfeñiques en la temporada de muertos y como analgésico [39], además de su empleo como planta ornamental que se vende en los mercados de las ciudades de México, Morelia y Oaxaca. En algunas comunidades de Oaxaca se le da un uso ceremonial en la celebración de la Semana Santa, adornando las fachadas de los templos, mientras que en la Mixteca en la misma época la gente acostumbra remojar las flores en agua para diluir su fragancia (agua de gloria) y luego llevarla en las procesiones del Sábado Santo o bien, aromatizar casas e iglesias [40].



Figura 6. *Prosthechea karwinskii*.

Prosthechea varicosa. Es una especie que está ampliamente distribuida y se conoce desde Tamaulipas hasta Veracruz y desde Jalisco hasta Michoacán, así como en Guatemala, El Salvador y Honduras. Crece en los bosques de neblina y de pino-encino húmedo, entre 2000 y 2900 m elev., se trata de una hierba que crece como epífita, terrestre o rupícola, sus flores son pequeñas [42], con sépalos y pétalos pardo-rojizo oscuros, labelo crema-verdoso o crema-amarillento con rayas y/o puntos de color vino (ver **Figura 7**). Su periodo de floración se presenta desde junio hasta diciembre [43] [44]. Las plantas epífitas suelen tener flores que producen una fragancia muy agradable y en algunas zonas de su distribución, como en la Sierra Mixe de Oaxaca, la gente corta las inflorescencias para tenerlas como arreglos florales en sus casas.



Figura 7. *Prosthechea varicosa*.

Obtención del material vegetal. Para las dos especies el material vegetal se recolectó en sitios de Oaxaca donde crecen poblaciones naturales de ellas. Para *Prosthechea karwinskii* fueron dos localidades: el poblado de Roagia, municipio de San Lorenzo Albarradas,

Capítulo II. Materiales y método

distrito de Tlacolula, 2230 m. elev., el cual se visitó en agosto 2009; la otra fue el poblado La Cumbrita, municipio San Miguel Sola de Vega, distrito de Sola de Vega, 2179 m. elev., visitado en marzo 2009. Para *P. varicosa* la localidad de recolección fue el poblado de Santa María Huitepec, municipio de Totontepec Villa de Morelos, 2080 m elev., que se visitó en noviembre de 2008. En cada localidad de recolección se preparó un espécimen de respaldo que fue depositado en el herbario OAX del CIIDIR Unidad Oaxaca.

Tratamiento del material vegetal. Se utilizó la planta completa para los análisis; el material recolectado de cada especie fue deshidratado durante 14 días en un cuarto de temperatura (25–26 °C), posteriormente fue molido, tamizado (60 μ m) y fue conservado a 4 °C para su posterior uso.

II.2. Aparatos e instrumentos

La extracción con líquido sobrecalentado fue diseñada con el modelo de equipo que se muestra en la **Figura 8**, que consiste de las siguientes unidades:

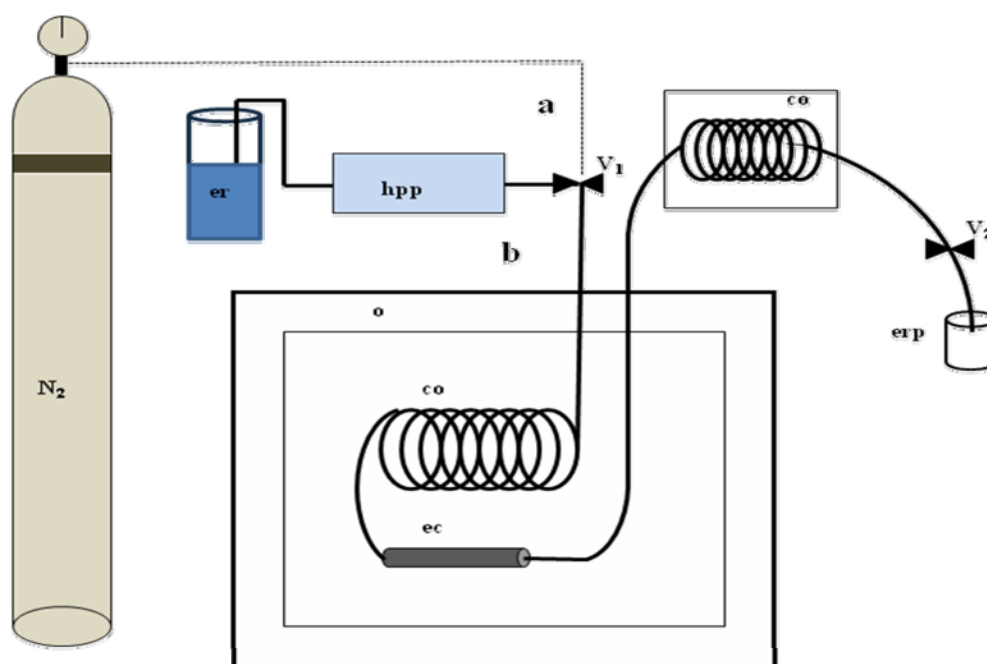


Figura 8. Extracción asistida por líquido sobrecalentado. (a) Modo estático. (b) Modo estático-dinámico.

(a) un recipiente contenedor de extractante; (b) una bomba de alta presión (Shimadzu LD-AC10), la cual bombea el extractante a través del sistema (c) una válvula de selección (V_1) localizada después de la bomba, la cual permite regular la entrada del extractante o bien el lavado del sistema con N_2 ó bien son una solución de acetona (d) un refrigerante de extractante para que al entrar a la cámara de extracción se tenga ya la temperatura de trabajo en el líquido, (e) una cámara de extracción cilíndrica de acero inoxidable (200mm x 10mm d.i., 15 ml volumen interno) donde la materia vegetal se coloca. Esta cámara es cerrada por ambos extremos con tapones roscados de acero inoxidable conteniendo en su interior dos filtros de forma de plato de acero inoxidable (1 mm de grueso, 12 mm de diámetro), cuyo fin es evitar que la materia vegetal sea arrastrada por el extractante, (f) una válvula de restricción, V_2 , que mantiene la presión óptima en el sistema, (g) un refrigerante de serpentín de acero inoxidable que está sumergido en agua a temperatura ambiente (0.5 m de longitud, 0.4 mm de d. i.), (h) una horno de cromatografía de gases (Konix, Cromatix KNK-2000) donde la cámara de extracción se coloca y es calentada.

La absorbancia de los extractos fenólicos, después de la derivatización por Folin-Ciocalteu (F-C), fue medida por espectrofotómetro de UV-visibles Thermo Spectronic, Helios gamma (Inglaterra). El cromatógrafo líquido fue un sistema ProStar (Varian, Palo alto, California, USA), que consiste en una bomba (ProStar 240, donde se realiza la mezcla de las fases móviles), un detector de diodos (ProStar 330) y un automuestreador (ProStar 410), un acondicionador de columna cromatográfica a temperatura ambiente, y un bucle de 0.2 ml de muestra.

La optimización de variables se realizó con el software Statgraphics plus v.5.1., para Windows (Stat Point, Inc., Herndon, VI).

II.3 Método de extracción

Extracción asistida por líquido sobrecalentado. Se propuso el siguiente protocolo para la lixiviación de la fracción fenólica mediante líquido sobrecalentado (ver **Figura 8**). Se empleó una cantidad de 0.5 g de material vegetal molido y deshidratado de cada especie, el

Capítulo II. Materiales y método

cual se colocaron en una célula de extracción dentro de un horno cromatográfico de gases (Konix, Cromatix KNK-2000). La velocidad de flujo se estableció en 0.5 ml/min para llenar la célula (3 min). Se realizó en este orden con la finalidad de evitar la presencia de aire en el sistema, la válvula V_2 se abrió hasta que apareció la primera gota de extractante después de pasar por el refrigerante. En ese momento, se cerró la válvula V_1 , la bomba se paró y se encendió el horno. Cuando se alcanzó una temperatura y presión de 100 °C y 5 Mpa, respectivamente, se mantuvieron estas condiciones durante 15 min (tiempo de extracción estática), al final del cual se abrieron simultáneamente las válvulas V_1 y V_2 para conservar la presión en el sistema, previamente se había puesto en marcha la bomba (tiempo dinámico) durante 15 min. Cuando el tiempo de extracción finalizó, el horno se apagó y la válvula V_2 se abrió completamente a fin de drenar el sistema. La purga del sistema se realiza con gas N_2 o con el extractante. El extracto fue aforado a 25 ml en un matraz volumétrico para determinar la concentración de fenoles totales por el método Folin–Ciocalteu.

Método para la determinación de fenoles totales Folin–Ciocalteu (F-C). La cantidad de fenoles totales fue medida por el método Folin–Ciocalteu, utilizando ácido gálico como estándar. Una curva de calibración se realizó usando soluciones 100, 200, 300, 400, 500 and 600 mg/l de ácido gálico ($y = 0.002x + 0.075$, $R^2 = 0.9931$). Una alícuota de 0.5 ml de extracto (todos los extractos son diluidos con agua destilada para ajustar la absorbancia con los límites de calibración), 10 ml de agua destilada, 1 ml de reactivo F–C y 3 ml de Na_2CO_3 (20% w/v) son mezclados en este orden, después se afora a 25 ml con agua destilada y se calienta a 50°C por 5 min. Después de 30 minutos, se mide la absorbancia a 765 nm contra un blanco preparado de forma similar pero conteniendo agua destilada en vez del extracto. La medida espectrofotométrica se realiza por triplicado para cada extracto y el valor medio es interpolado en la curva de calibración de ácido gálico y la concentración total de fenoles se expresó como μg de ácido gálico por g de materia vegetal ($\mu g/g$).

Método para la determinación del perfil de fenoles. El método aplicado fue propuesto por Girón [31], para la determinación de compuestos fenólicos en alperujo y se adaptó para la determinación de estos compuestos en los extractos de *P. karwinskii* y *P. varicosa*.

II.3.1 Optimización del método de extracción

Capítulo II. Materiales y método

Las tres variables que potencialmente influyen en la etapa de extracción (temperatura, velocidad de flujo de extractante y composición del extractante) se optimizaron utilizando como variable de respuesta la concentración total de fenoles expresada en μg de ácido gálico por g de material vegetal ($\mu\text{g/g}$) determinada mediante el método de Folin-Ciocalteu (F-C). Se realizó un diseño factorial de 2 niveles con tres grados de libertad y tres puntos centrales (un total de 11 experimentos) con la finalidad de conocer cómo afectan estas variables al proceso de extracción. Los valores extremos de cada variable fueron seleccionados de acuerdo con la bibliografía y estudios previos [12-16].

La mezcla etanol-agua resultó significativa y negativa, es decir a valores mayores de 60% no existe más extracción de analitos pero a valores inferiores de dicho valor se supone la extracción óptima, por tanto, había que estudiar valores inferiores a 60% etanol-agua. La velocidad de flujo también fue significativa y negativa, a valores inferiores de 0.5 ml/min se supondría una mejor extracción de los analitos presentes en la fracción fenólica, en el caso de valores superiores no es necesario el estudio pues no afecta de manera importante la obtención de los analitos de interés, se baja el rango de estudio hasta 0.1 ml/min. La temperatura no fue significativa y quedó fija en 100 °C, por lo que se hizo necesario realizar un segundo cribado (ver Análisis experimental-Capítulo III).

En el segundo cribado se utilizó un diseño “estrella” de 2^2 con dos puntos centrales y se concluyó que el valor óptimo para la velocidad de flujo y composición de extractante fue 0.5 ml/min y 50% etanol en agua, respectivamente, (ver Análisis experimental-Capítulo III).

Estudios cinéticos. Se realizó una doble cinética para estudiar tanto el régimen estático como el dinámico. En la cinética dinámica se fijó un tiempo de 10 min de extracción, mientras que para la cinética estática se fijaron tiempos de 3.5, 7, 15, 20 y 25 min de extracción. Para el régimen dinámico, ya con el tiempo estático óptimo (15 min) se cambió el tiempo dinámico (5, 10, 15, 20, 25 y 30 min), resultando el valor óptimo también en este caso de 15 min. La cinética estática consiste en quitar el flujo de extractante, cerrando las válvulas V_1 y V_2 de manera simultánea y conservando la temperatura del horno cromatográfico. Mientras que la cinética dinámica consiste en pasar flujo de extractante (se

Capítulo II. Materiales y método

abren de manera simultánea las válvulas V_1 y V_2) a la materia vegetal contenida en la celda de extracción de manera continua.

II.4. Técnica cromatográfica

HPLC-DAD. La columna analítica usada fue de fase reversa Inertsil ODS-2 (250 x 4.6 mm i.d. 5 μ m), el volumen de inyección de 20 μ l, y una mezcla binaria con gradiente de concentración (agua, 0.066% ácido fosfórico) y B (1:1 metanol–acetonitrilo). El gradiente de elución fue el siguiente:

Tabla 1. Se muestra el gradiente de concentración y tiempos de elución en HPLC

Tiempo (min)	Sol. A (%)	Sol B (%)	Velocidad de flujo (ml/min)
0-5	96-50	4-50	1
5-15	50-40	50-60	1
15-20	40-0	60-100	1
20-30	0-0	100-100	1
30-40	0-96	100-4	1
40-45	96-96	4-4	1

Los extractos se inyectaron directamente (antes se filtraron por 20 μ m) en el cromatógrafo y el seguimiento de la elución se realizó a 260, 280, 320 y 360 nm (tiempo de elución, 45

Capítulo II. Materiales y método

min). Se utilizó como estándar externo o-glicol que fue adicionado al extracto antes de ser inyectado en el cromatógrafo líquido.

.

Capítulo III. Resultados y discusión

III.1. Extracción con líquido sobrecalentado

Como se muestra en la **Tabla 2** se hicieron dos cribados experimentales con tres variables fundamentales: (a) temperatura del horno cromatográfico, (b) velocidad de flujo del extractante y (c) composición de la mezcla de extractante. Se determinó que la temperatura no presentó diferencias significativas durante el proceso de extracción, por lo que fue fijada en 100°C. Pero como se muestra en la **Figura 9**, la variable correspondiente a mezcla etanol-agua, influyó de manera significativa (esto representa que por debajo del primero rango diseñado se debió probar) y la variable de velocidad de flujo del extractante influye también de manera negativa pero en menor grado (esto representa que se tomaría como óptimo el valor de 0.5 ml/min que es límite inferior del primer diseño); ante esto se decidió realizar un segundo cribado experimental como se muestra en la **Tabla 2**.

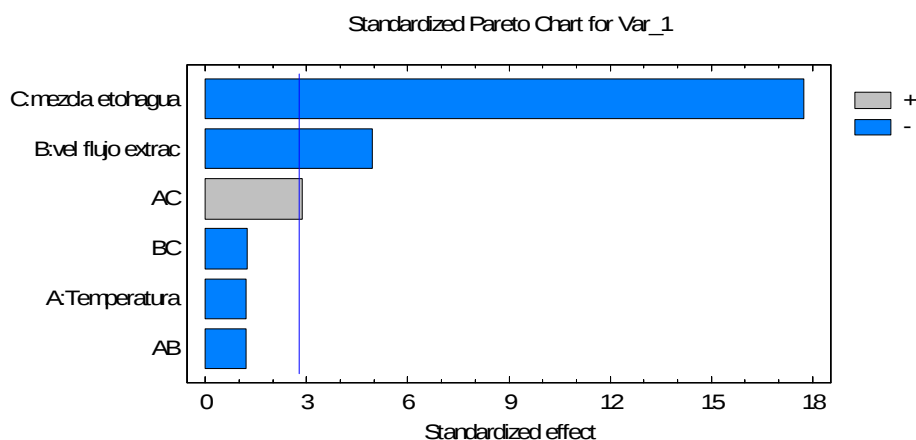


Figura 9. Diagrama de Pareto-cribado experimental 1- donde se muestra la influencia de las tres variables que afectan la extracción por líquido sobrecalentado en *P. karwinskii* y *P. varicosa*. (AC, BC y AB es la interacción entre las tres variables analizadas en el momento de la extracción).

Capítulo III. Resultados y Discusión

Para el caso del segundo cribado experimental, como se muestra en la **Figura 10**, se observa que la mezcla a 50% etanol-agua como extractante fue el óptimo para realizar la extracción de las orquídeas; en el caso de la variable de flujo de extractante es de suponer que a menor velocidad de flujo se tendrá el óptimo de la variable, pero nos encontramos con el inconveniente que el equipo de extracción sufre taponamiento de la tubería por lo que se toma como óptimo el valor de 0.5 ml/min que no es significativa (no afecta al proceso de extracción). Adicionalmente si se tomarán valores mínimos como velocidad de flujo la tendencia de extracción sería el régimen solamente estático y no se obtendrían representatividad en la extracción de analitos fenólicos.

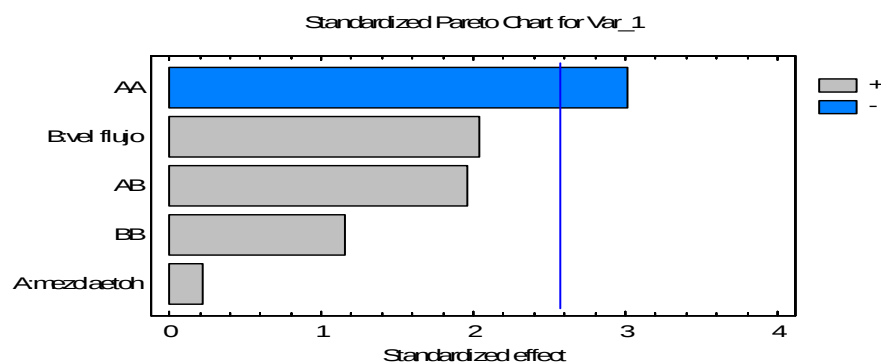


Figura 10. Diagrama de Pareto-cribado experimental 2-

donde se muestra la influencia de las tres variables que afectan en la extracción por líquido sobrecalentado en *P. karwinskii* y *P. varicosa*. (AA, AB y BB es la interacción entre las dos variables analizadas en el método de extracción).

Así, se tienen los óptimos de las tres variables: 100 °C de temperatura del horno cromatográfico, 0.5 ml/min de velocidad de flujo de extractante y 50% de etanol-agua como mezcla de extractante.

Se pasó así a la optimización del tiempo en régimen estático y dinámico; anteriormente de acuerdo a la literatura consultada de otros trabajos con extracción líquida sobrecalentada para material sólido vegetal [46-48], se tomaron los tiempos de 7 y 10 min en régimen estático y dinámico, respectivamente.

Tabla 2. Optimización de la extracción por líquido sobrecalentado de la fracción fenólica de *P. karwinskii* y *P. varicosa*

Variable	Rango probado		Valor óptimo
	Primer diseño	Segundo diseño	
Temperatura del horno ($^{\circ}\text{C}$)	100-200	100	100
Velocidad de flujo del extractante (ml/min)	0.5-1.5	0.1-0.5	0.5
Etanol en la mezcla de extractante (%)	60-100	30-50	50
Tiempo de extracción estático (min)	*	5,10,15,20,25	15
Tiempo de extracción dinámico (min)	*	5,10,15,20,25	15

*Se realiza la optimización de los tiempos de extracción al establecer las tres variables del proceso.

El procedimiento fue simple ya habiendo obtenido los valores óptimos para las tres variables de los dos cribados experimentales, se realizaron las correspondientes cinéticas de extracción (ver **Tabla 2**).

Para el régimen estático se observa (ver **Figura 11**) que al tiempo de 15 minutos se obtiene el punto de extracción óptimo, pues después de ese tiempo la extracción tiene un comportamiento estable hasta los 20 minutos para después decrecer. En estas cinéticas se comparó el tiempo de extracción con respecto a la concentración total de fenoles obtenidos por el método F-C (descrito en el apartado de materiales y método).

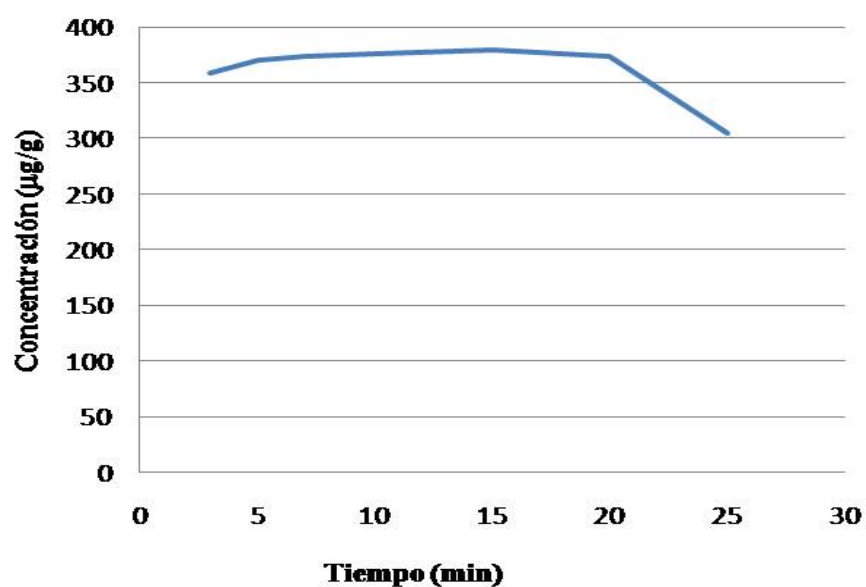


Figura 11. Cinética de extracción en régimen estático para las dos especies de orquídeas.

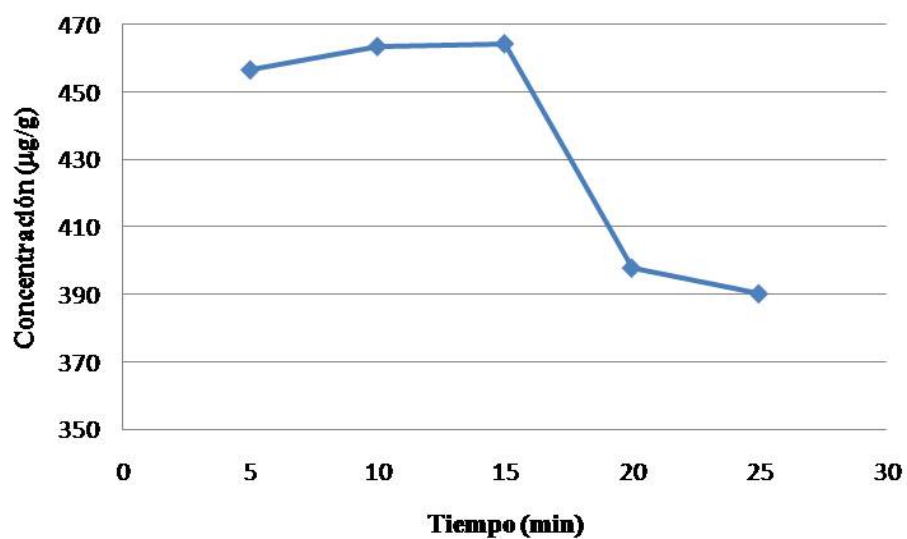


Figura 12. Cinética de extracción en régimen dinámico para las dos especies de orquídeas.

Capítulo III. Resultados y Discusión

Para la extracción en régimen dinámico (ver **Figura 12**) se observa claramente que al tiempo de 15 minutos se alcanza el máximo rendimiento de extracción y después los analitos muestran una degradación importante debido fundamentalmente al tiempo de exposición con la temperatura y el tiempo de contacto de la muestra vegetal, aunado a la presión que se genera dentro de la cámara de extracción.

Al igual que en la extracción a régimen estático, se comparó el tiempo de extracción con respecto a la concentración total de fenoles obtenidos por el método F-C; para el caso de extracción en régimen estático el contenido total de fenoles fue de 372.5 µg/g y en el caso de extracción en régimen dinámico el contenido total de fenoles fue de 462.4 µg/g, entendiéndose que al optimizar el tiempo en régimen dinámico se tiene las cuatro variables también optimizadas (velocidad de flujo de extractante, temperatura del horno cromatográfico, composición de la solución de extractante y tiempo en régimen estático).

III.1.1. Análisis Experimental

Primer cribado experimental. Por medio del programa estadístico Statgraphics plus v.5.1., para Windows (Stat Point, Inc., Herndon, VI) se calcularon los efectos estimados para el primer cribado experimental:

Tabla 3. Se muestra los efectos estimados y sus interacciones para el primer cribado experimental

<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error estándar</i>	<i>V.I.F.</i>
Promedio	274.507	5.69542	
A:Temperatura	-16.1822	13.3569	1.0
B:vel flujo extrac	-65.9402	13.3569	1.0
C:mezcla etoh-agua	-236.863	13.3569	1.0
AB	-16.0464	13.3569	1.0
AC	38.2927	13.3569	1.0
BC	-16.4466	13.3569	1.0

En la **Tabla 3**, También se muestra el error estándar de cada uno de los efectos, que mide su error de muestreo. Se tiene en cuenta también que el Factor de inflación de varianza (VIF) es igual a 1.0. Para un diseño ortogonal, todos los factores son igual a 1. Los factores

Capítulo III. Resultados y Discusión

de 10 o más grandes se interpretan como indicadores de confusión entre los efectos graves de las variables.

A continuación se aplicó el ANOVA para probar la significancia estadística de los efectos de las variables y se obtuvo:

Tabla 4. Se muestra el análisis de varianza obtenido para el primer cribado experimental

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media cuadrada	Tasa F	Valor P
A:Temperatura	523.726	1	523.726	1.47	0.2924
B:vel flujo extrac	8696.21	1	8696.21	24.37	0.0078
C:mezcla etoh-agua	112208.	1	112208.	314.47	0.0001
AB	514.972	1	514.972	1.44	0.2959
AC	2932.66	1	2932.66	8.22	0.0456
BC	540.979	1	540.979	1.52	0.2857
Total error	1427.26	4	356.816		
Total (corr.)	126844.	10			

R-cuadrada = 98.8748 %

R-cuadrada (ajustada para d.f.) = 97.187 %

Error estándar de estimación = 18.8896

Error medio absoluto = 10.3144

En la **Tabla 4** se muestra que son tres los valores que tienen efectos de p menores de 0.05 lo que indica que son significativamente diferentes de cero en el nivel de confianza de 95% (B, C y AC). Finalmente se realiza por medio del programa estadístico una optimización teórica para saber entre que valores se deberá realizar el segundo cribado experimental:

Tabla 5. Se muestra la optimización de las variables del método de extracción en el primer cribado

Factor	bajo	alto	Óptimo
Temperatura ($^{\circ}$ C)	100.0	130.0	100.0
vel flujo extrac. (ml/min)	0.5	1.5	0.5
mezcla etoh-agua (%)	60.0	100.0	60.0

Capítulo III. Resultados y Discusión

Como se demostró en la **Tabla 4**, las variables que faltan por optimizar son velocidad de flujo del extractante y mezcla de extractante.

Segundo cribado experimental. De igual manera se realiza el análisis estadístico para el segundo cribado experimental obteniéndose los siguientes estimados experimentales:

Tabla 6. Se muestra los efectos estimados y sus interacciones para el segundo cribado experimental

Efecto	Estimado	Error estándar	V.I.F.
Promedio	403.874	6.37176	
A:mezclaetoh	1.7602	7.80378	1.0
B:vel flujo	15.918	7.80378	1.0
AA	-28.0189	9.28836	1.0947
AB	21.6579	11.0362	1.0
BB	10.6735	9.28835	1.0947

En la **Tabla 6**, se tiene en cuenta también que el Factor de Inflación de Varianza (VIF) es igual a 1.0947. Para un diseño ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Los factores con valor de 10 o más grandes se interpretan como indicadores de confusión entre los efectos graves de las variables.

A continuación se aplicó el ANOVA para probar la significancia estadística de los efectos de las variables y se obtuvo:

Capítulo III. Resultados y Discusión

Tabla 7. Se muestra el análisis de varianza obtenido para el segundo cribado experimental

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media cuadrada	Tasa F	Valor P
A:mezclaetoh	6.1966	1	6.1966	0.05	0.8305
B:vel flujo	506.765	1	506.765	4.16	0.0969
AA	1108.32	1	1108.32	9.10	0.0295
AB	469.065	1	469.065	3.85	0.1070
BB	160.832	1	160.832	1.32	0.3025
Total error	608.99	5	121.798		
Total (corr.)	3252.23	10			

R-cuadrada = 81.2747 %

R-cuadrada (ajustada para d.f.) = 62.5494 %

Error estándar de estimación = 11.0362

Error medio absoluto = 5.88129

En la **Tabla 7** se muestra que un valor tiene efectos de p menores de 0.05 lo que indica que son significativamente diferentes de cero en el nivel de confianza de 95% (AA). Se realiza la optimización teórica por medio del programa estadístico:

Tabla 8. Se muestra la optimización de las variables del método de extracción en el primer cribado

Factor	Bajo	alto	Óptimo
Mezcla etoh-agua	23.7868	66.2132	53.6641
Vel. Flujo (ml/min)	0.0171573	0.582843	0.582843

Así, como se muestra en la **Tabla 1** se tienen ya las tres variables optimizadas y los tiempos de extracción se explicaron anteriormente como se optimizaron.

III. 2. Fracción Fenólica

Al tenerse los valores óptimos de extracción líquida sobrecalentada, utilizando el método de fenoles totales F-C, se hizo necesario utilizar un método de separación cromatográfico y el método usado para la detección-separación de fenoles individuales fue el propuesto por el Consejo Internacional del Aceite, el método se adecuó para la obtención de fenoles en tejidos de [49]. La identificación de fenoles presentes en *P. karwinskii* y *P. varicosa* es la siguiente : hidroxitirosol, tirosol, , apigenina-7-glucósido, ácido cafeico, vainillina, ácido p-cumárico y ácido ferúlico, siendo estos siete compuestos comunes a las dos orquídeas, y ácido o-cumárico, oleuropeína y luteolina-7-glucósido solo se encuentran en *P. varicosa*. La identificación de los fenoles estuvo basada en la comparación de los tiempos de retención y el espectro UV-Vis obtenido a partir de soluciones estándar. La longitud de máxima absorbancia y los factores experimentales de retención de cada analito se muestran en la **Tabla 9 y 10**.

En la **Figura 13 y 14** se muestran los cromatogramas de *P. karwinskii* y *P. varicosa*. Las rectas de calibrado de los diez analitos identificados se construyeron utilizando estándares comerciales y el área de pico en función de la concentración del estándar de cada compuesto. Las ecuaciones de calibración, los coeficientes de regresión y los rangos lineales dinámicos se muestran en la **Tabla 9 y 10**. El límite de detección (LOD) de cada analito se expresó como la concentración de cada analito que proporciona una señal que es 3σ veces la señal del blanco (siendo σ es la desviación estándar de la señal del blanco). Los valores de LODs estuvieron entre 0.02 y 0.10 $\mu\text{g/ml}$ para todos los analitos. El límite de cuantificación (LOQ), se expresó como la concentración de analito que proporciona una señal que es 10σ veces la señal de blanco, y sus valores estuvieron entre 0.09 y 0.35 $\mu\text{g/ml}$ para todos los analitos. Ambos límites se estudiaron para los extractos de orquídeas (**Tabla 9 y 10**).

En la **Tabla 9** se observa que en la separación cromatográfica los compuestos identificados en *Prosthechea karwinskii*, de acuerdo a su comparación con los tiempos de retención de los estándares analizados y a las concentraciones obtenidas a través de sus rectas de calibrado, fueron hidroxitirosol (5706 µg/g), tirosol (5076 µg/g), apigenina-7-glucósido (414 µg/g) y el resto de fenoles se encontraba en el rango de 294 µg/g (vainillina) –79 µg/g (ácido cafeico).

De los fenoles identificados en *Prosthechea karwinskii* (ver **Figura 13**) el hidroxitirosol representa un antioxidante muy potente al cual estudios realizados en los últimos años le atribuyen el sabor amargo del aceite de oliva extra virgen [50]; también se halla en el aceite de hígado de bacalao, el cual actúa en la inhibición de la oxidación lipídica con los mismos efectos que otros compuestos altamente antioxidantes como es el ácido gálico [51].

Otro fenol de importancia encontrado en esta especie, el tirosol, también tiene funciones como antioxidante [52], ya que protege a las células del daño ocasionado por el proceso de oxidación. En estudios recientes se ha descubierto la presencia de tirosol en el vino blanco y se le ha atribuido un efecto como cardioprotector [53].

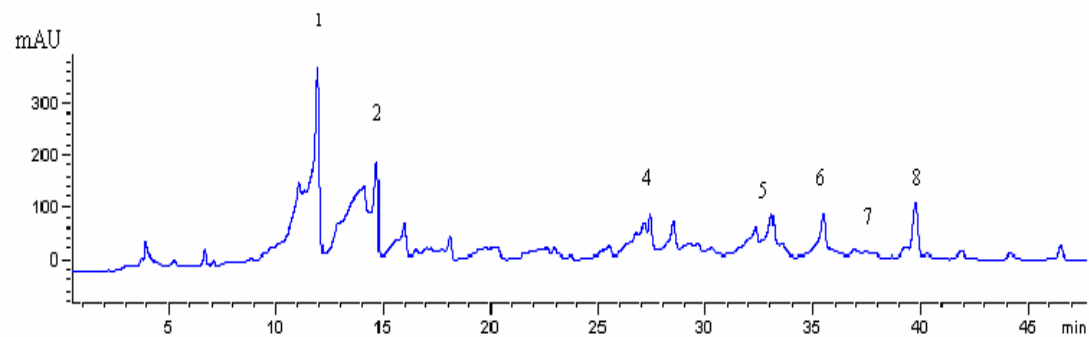


Figura 13. Cromatograma del extracto de *P. karwinskii* (320 nm); picos identificados: 1, hidroxitirosol; 2, tirosol; 4, apigenina-7-glucosido; 5, ácido cafeico; 6, vainillina; 7, ácido p-cumárico y 8, ácido ferúlico.

Capítulo III. Resultados y Discusión

	Compuesto	Curva de calibración	R ²	LOD	LOQ	Longitud de onda (nm)	Concentración (µg/g±SD)
				(µg/g)	(µg/g)		
1.	Hydroxitirosol	Y=215.01(6.78)+26.03(0.12)	0.997	0.02	0.09	320	5706±0.55
2.	Tirosol	Y=235.60(12.35)+30.34(0.13)	0.998	0.04	0.15	320	5076±0.73
4.	Apigenina-7-glucosido	Y=309.35(29.91)+63.50(0.55)	0.996	0.02	0.07	320	414±0.65
5.	Ácido cafeico	Y=523.74(47.01)+91.57(0.86)	0.995	0.05	0.19	320	79±0.22
6.	Vainillina	Y=84.76(34.15)+56.16(0.32)	0.996	0.05	0.19	320	294±0.54
7.	Ácido p-Cumarico	Y=56.81(35.92)+87.05(0.58)	0.995	0.05	0.19	320	101±0.88
8.	Ácido Ferulico	Y=918.79(78.50)+83.59(0.84)	0.994	0.10	0.35	320	210±0.65

Tabla 9. Límites de detección (LODs), límites de cuantificación (LOQs), monitoreo de longitud de onda y concentraciones de fenoles encontrados en *Prosthechea karwinskii*.

Capítulo III. Resultados y Discusión

Para el caso de la apigenina, éste es un flavonoide para el cual se ha reportado que tiene efectos ansiolíticos [54], antiespasmódicos, antiinflamatorios y antitumorales [55], su propiedad antioxidante ha provocado en los últimos años se le asocie como un posible principio activo en el tratamiento de la leucemia [56].

El resto de fenoles identificados —ácido cafeico, vainillina, ácido p-cumárico y ácido ferúlico—se encuentran en pequeñas cantidades pero se sabe que tienen aplicaciones importantes. El caso del ácido ferúlico es interesante debido a que es utilizado como precursor en la producción a escala industrial de vainillina [57], además es un componente activo de los bloqueadores solares [58], tiene propiedades antiinflamatorias [59] y se encuentra de manera abundante en la pared celular, por lo que, es responsable de la rigidez de la estructura de las plantas y actúa como protector contra el ataque de microorganismos [60].

Por otro lado la vainillina, es utilizada ampliamente como agente saborizante en alimentos y bebidas [61]; la vainillina también se utiliza en la industria de la fragancia [62] y para enmascarar olores o gusto desagradables en medicinas y productos de la limpieza [63]. El ácido p-cumárico y ácido cafeico tienen propiedades antioxidativas y antiinflamatorias [64]; el ácido cafeico en diferentes estudios ha demostrado que inhibe la carcinogénesis [65].

En la **Tabla 10** se detallan las curvas de calibración y las concentraciones de los diferentes fenoles en *Prosthechea varicosa*, los cuales fueron identificados por cromatografía líquida en referencia a sus tiempos de retención y la concentración de acuerdo a los estándares preparados en una solución multipatrón de 15 ppm. Los fenoles hallados en esta especie fueron: apigenina-7-glucósido (4414 µg/g), hidroxitirosol (4306 µg/g), tirosol (2076 µg/g), ácido ferúlico (1130 µg/g), ácido p-cumárico (1001 µg/g) y el resto de fenoles se encontraba en el rango de 894 µg/g (vainillina) –35 µg/g (oleuropeína).

Prosthechea karwinskii y *P. varicosa* comparten la presencia de los compuestos fenólicos siguientes: apigenina, hidroxitirosol, tirosol, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, vainillina y ácido cafeico; pero la oleuropeína, ácido o-cumárico y luteolina-7-glucósido solo están presentes en *P. varicosa*. La oleuropeína, que hasta ahora es conocido por su

Capítulo III. Resultados y Discusión

presencia en las aceitunas y en las hojas del olivo, se sabe también que es el responsable de otorgarle el sabor amargo al aceite de oliva extra virgen [66], tiene propiedades de antioxidante, reduce la presión arterial y dilata las arterias coronarias (previene infartos al miocardio) [67].

Por su parte, la luteolina, que es un flavonoide de gran importancia, desempeña un papel como antioxidante y captor de radicales libres [68], antiinflamatorio y promotor del metabolismo de los carbohidratos. Debido a estas características se cree que la luteolina desempeña una función importante en la prevención del cáncer [68]. En la mayoría de los casos la luteolina se encuentra en las hojas y corteza de diversas plantas como el apio, tomillo, diente de león, flor de trébol, pimienta verde, manzanilla [69].

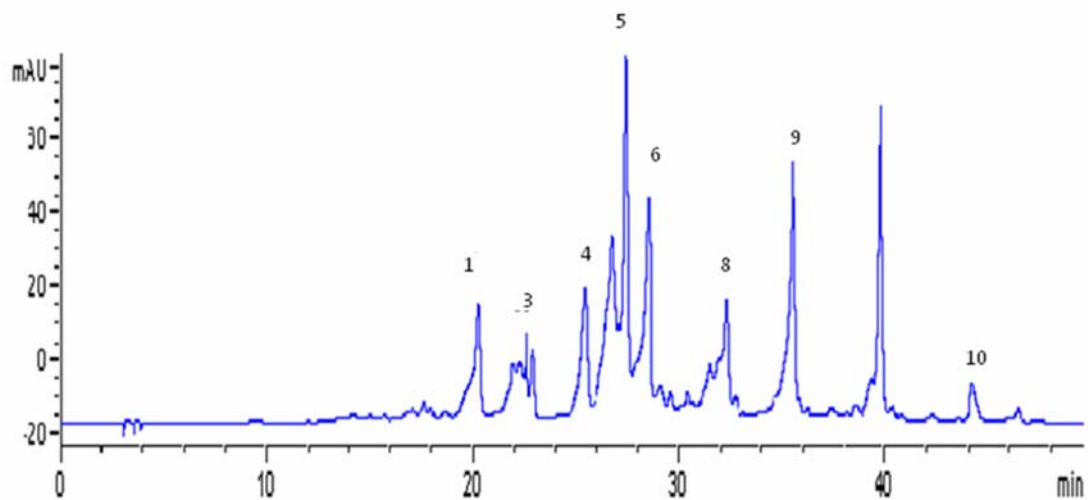


Figura 14. Cromatograma del extracto de *P. varicosa* (360 nm); picos identificados: 1, hidroxitirosol; 3, oleuropeina; 4, apigenina-7-glucósido; 5, ácido cafeico; 6, vainillina; 7, ácido p-cumárico; 8, ácido ferúlico; 9, ácido o-cumárico y 10, luteolina-7-glucósido.

Capítulo III. Resultados y Discusión

	Compuesto	Curva de calibración	R ²	LOD	LOQ	Longitud de onda (nm)	Concentración (µg/g±SD)
				(µg/g)	(µg/g)		
1.	Hidroxitirosol	Y=215.01(6.78)+26.03(0.12)	0.997	0.02	0.09	360	4306±0.55
2.	Tirosol	Y=235.60(12.35)+30.34(0.13)	0.998	0.04	0.15	360	2076±0.73
3.	Oleuropeina	Y=43.66(15.60)+45.18(0.29)	0.995	0.10	0.35	360	35±0.76
4.	Apigenina-7-glucosido	Y=309.35(29.91)+63.50(0.55)	0.996	0.02	0.07	360	4414±0.65
5.	Ácido cafeico	Y=523.74(47.01)+91.57(0.86)	0.995	0.05	0.19	360	279±0.22
6.	Vainillina	Y=84.76(34.15)+56.16(0.32)	0.996	0.05	0.19	360	894±0.54
7.	Ácido p-Cumarico	Y=56.81(35.92)+87.05(0.58)	0.995	0.05	0.19	360	1001±0.88
8.	Ácido Ferulico	Y=918.79(78.50)+83.59(0.84)	0.994	0.10	0.35	360	1130±0.65
9.	Ácido o-Cumarico	Y=58.95(33.88)+85.98(0.62)	0.996	0.05	0.19	360	164±0.44
10.	Luteolina-7-glucosido	Y=239.71(21.63)+51.80(0.39)	0.997	0.04	0.15	360	254±0.67

Tabla 10. Límites de detección (LODs), límites de cuantificación (LOQs), monitoreo de longitud de onda y concentraciones de fenoles encontrados en *Prosthechea varicosa*.

Tabla 11. Comparación de concentraciones de fenoles encontrados en las dos especies de orquídeas

Analito	<i>P. Karwinskii</i> conc. (µg/g)	<i>P. varicosa</i> conc. (µg/g)
1. Hidroxitirosol	5706	4306
2. Tirosol	5076	2076
3. Apigenina-7-glúcosido	414	4414
4. Ácido cafeico	79	279
5. Vainillina	294	894
6. Ácido p-cumárico	101	1001
7. Ácido ferúlico	210	1130

En el caso de *P. karwinskii* los fenoles hallados en mayor concentración fueron el hidroxitirosol, tirosol y apigenina, mientras que en *P. varicosa* lo fueron la apigenina-7-glúcosido, hidroxitirosol y tirosol. Por su parte, el compuesto de menos concentración en ambas especies fue el ácido cafeico, en *P. varicosa* dicho compuesto tuvo hasta tres veces la concentración que presentó en *P. karwinskii*.

En los últimos años se han desarrollado trabajos con importancia quimiotaxonómica relevante dentro de las orquídeas; tal es el caso de Yang *et al.* [70] quienes estudiaron *Dendrobium aurantiacum* y a partir de la caracterización química de sus compuestos volátiles (triterpenos), concluyeron que esta especie comparte kaemferol, gigantol, naringenina y axerol con otras especies de *Dendrobium* reportadas en la literatura [70].

Otro estudio referente a la caracterización de carotenoides y antocianinas (fenoles) fue realizado por Tatsuzawa [71] con una orquídea del género *Disa*; obteniendo como resultado que el analito pelargonidina contenido en especies de este grupo puede contribuir al estudio en quimiotaxonomía y filogenética del mismo.

Fossen y Ovstedal [72] realizaron la caracterización química de las flores de *Dracula chimaera* y *D. cordobae* a partir de extractos metanólicos, encontrando altas proporciones de antocianinas que contienen rutinosa y cianidina disacáridos, concluyendo los autores que la quimiotaxonomía es importante para entender las relaciones entre estas especies con otras orquídeas como *Dendrobium* sp., *Cattleya walkeriana* y *Bletilla striata*, en las cuales se han encontrado antocianinas similares [72].

Finalmente, es interesante notar la similitud de compuestos entre *P. karwinskii* y *P. varicosa*, ya que al ser un primer estudio de caracterización dan la pauta para entender la semejanza en estas dos orquídeas en lo que se refiere a sus compuestos fenólicos, por lo que podría ser una fuente de caracteres químicos de utilidad para evaluar las relaciones filogenéticas dentro del género *Prosthechea*. Por otro lado, amplía el potencial de estas orquídeas, no solo por su valor como plantas de ornato, sino como una fuente de compuestos fenólicos con altas aplicaciones farmacológicas, cosmetológicas y en la industria de los alimentos por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, fragantes y de sabores. Será necesario también en posteriores estudios de caracterización química la evaluación de las fracciones lipídica (no polar) y la fracción volátil (terpenos) a fin de tener un metaboloma integral de dichas orquídeas e integrar estos conocimientos al uso de energías auxiliares en la etapa de extracción de sus analitos, a fin de abaratar costos y ocasionar el menor daño al ambiente.

Anexo

Extracción asistida por ultrasonidos de las fracciones polar (fenoles) y no polar (lipídica) en *Heterotheca inuloides*

Resumen

Heterotheca inuloides, también conocida como “árnica”, es usada en la medicina tradicional en México. En esta investigación, la asistencia por ultrasonidos es usada para la extracción acelerada de los compuestos—fenoles y lípidos—de esta planta y reduce el uso de disolventes orgánicos comparado con los métodos convencionales. Un diseño multivariante fue realizado para los procesos de extracción de las fracciones fenólica y lipídica, obteniéndose las siguientes condiciones óptimas: ciclos de la sonda de ultrasonidos 0.5 s, amplitud del convertidor 50%, poder aplicado 225 W, y temperatura del baño 35 °C. Bajo estas condiciones, 9 y 55 min fueron necesarios para completar la extracción de las fracciones lipídica y fenólica, respectivamente, usando hexano y una mezcla etanol-agua como extractantes. Veintitrés ácidos grasos fueron separados individualmente, identificados y cuantificados en la fracción lipídica por cromatografía de gases—espectrometría de masas después de la derivatización de sus ácidos grasos metil ésteres. Entre los que se encontraron con altas concentraciones en *H. Inuloides* fueron los ácidos eicosatetraenoico n3 (24.6 µg/g), *cis*-9-hexadecenoico n7 (23.1 µg/g), exacosanoico (22.67 µg/g) and *cis*-9-octadecenoico (21.32 µg/g); y los restantes se encontraron en el rango de 7.65 µg/g (*trans*-9 ácido octadecenoico) – 1.30 µg/g (*cis*, *trans*-ácido octadecadienoico), los cuales corresponden a la concentración total de 173.04 µg/g. la fracción polar contenía 19 fenoles, la determinación total fue determinada por el método Folin-Ciocalteu y fueron separados individualmente por cromatografía líquida y cuantificada por espectrometría de diodos en fila. Las principales concentraciones de fenoles en esta fracción fueron guaiacol (41.50 µg/g), catequina (38.70 µg/g) ácido elágico (35.90 µg/g), ácido carbólico (24.20 µg/g) and ácido *p*-cumaric (19.50 µg/g); el resto de fenoles se encontró en el rango de 5.15 µg/g (pirocatecol) – 0.47 µg/g (ácido vainillico), con una concentración total de 190.13 µg/g. Esta información constituye una primera aproximación del “metaboloma de “*H. inuloides*”.

Palabras clave: *Heterotheca inuloides*, extracción asistida por ultrasonidos, ácidos grasos, fenoles

Fast ultrasound-assisted extraction of polar (phenols) and non polar (lipids) fractions in *Heterotheca inuloides*

Abstract

Heterotheca inuloides, also known as “arnica”, is used in traditional medicine in Mexico. In this research, ultrasound assistance is used to accelerate extraction of the target compounds—phenols and lipids— from this plant and reduce the use of organic solvents as compared with conventional methods. A multivariate approach for optimization of the extraction procedures for the lipidic and phenolic fractions provided the following optimal working conditions: duty cycle of the ultrasonic probe 0.5 s, output amplitude 50% of the converter, applied power 225 W, and water-bath temperature 35 °C. Under these conditions, 9 and 55 min were necessary to complete extraction of the lipidic and phenolic fractions, respectively, using hexane and a 40:60 ethanol–water mixture as extractants. Twenty-three fatty acids were individually separated, identified and quantified in the lipidic fraction by gas chromatography–mass spectrometry after derivatisation into fatty acid methyl esters. Between them, those with the highest concentrations in *H. Inuloides* were acids eicosatetraenoic n3 (24.6 µg/g), *cis*-9-hexadecenoic n7 (23.1 µg/g), exacosanoic (22.67 µg/g) and *cis*-9-octadecenoic (21.32 µg/g); meanwhile the rest were in the range 7.65 µg/g (*trans*-9 octadecenoic acid) – 1.30 µg/g (*cis*, *trans*-octadecadienoic acid), which correspond to an overall concentration of 173.04 µg/g. The polar fraction contained 19 phenols, which were overally determined by the Folin–Ciocalteu method and individually separated by liquid chromatography and quantified by diode-array spectrophotometry. The most concentrated phenols in this fraction were guaiacol (41.50 µg/g), catechin (38.70 µg/g) ellagic acid (35.90 µg/g), carbolic acid (24.20 µg/g) and *p*-cumaric acid (19.50 µg/g); meanwhile the rest were in the range 5.15 µg/g (pyrocatechol) – 0.47 µg/g (vanillic acid), with an overall concentration of 190.13 µg/g. This information constitutes a first approach to the “*H. inuloides* metabolome”.

Keywords: *Heterotheca inuloides*, ultrasound-assisted extraction, fatty acids, phenols

1. Introducción

En México existen varias especies de plantas que se agrupan bajo el nombre común "árnica" y que comprenden las siguientes: *Mentzelia conzatti*, *Zexmenia pringlei*, *Haplopappus spp*, *Heterotheca inuloides*, entre otras [73]. La *Heterotheca inuloides* (Asteraceae), la especie más abundante, comúnmente conocida como árnica mexicana, acahual, cuauteteco o xochihuepal, se usa en medicina tradicional para el tratamiento de contusiones, heridas y lesiones de la piel [74]. Se trata de una especie con un alto valor que se usa en diversas partes de México, siendo algunos de sus usos similares a los de la *árnica montana*.

Heterotheca inuloides es una planta pilosa, con flores amarillas (**Figura 15**); con el involucre graduado y de brácteas angostas, pecíolos largos en las hojas basales, tamaño de 50–70 cm hasta 1 m de altura, de tallo erecto, generalmente no muy ramificado por debajo de la inflorescencia, estriado, con pubescencia piloso–hispida, de ± 2 mm (o más) de largo, además de otros pelos mucho más cortos, que incluyen pelos glandulosos. Se trata de una planta perenne, su hábitat es ruderal y arvense, pastizales perturbados y claros en bosques [75].



Figura 15. *Heterotheca inuloides*.

2. Materiales y métodos

Recolección de *Heterotheca inuloides*. Fue colectada en el cerro de Monte Albán perteneciente al municipio de Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México (17°3'43"N, 96°43'18"W) en los meses de julio a septiembre de 2008. Las muestras (flores) fueron transportadas al Laboratorio de Alimentos del CIIDIR Unidad Oaxaca, IPN.

Tratamiento de muestra. Las plantas fueron identificadas y autenticadas por el taxónomo Dr. R. Solano, y un espécimen se depositó en el herbario del CIIDIR. Las flores fueron separadas manualmente de la planta, se deshidrataron durante 14 días en un cuarto de temperatura (25–26 °C) y se transportaron a la Universidad de Córdoba, España, donde se molieron, tamizaron (60 µm) y se conservaron a 4 °C para su posterior uso.

Extracción asistida por ultrasonidos. Se propuso el siguiente protocolo para la extracción asistida por ultrasonidos, tanto para la fracción lipídica como para la polar (**Figura 16**).

Fracción lipídica. Se colocaron 0.5 g de flores en cada tubo de prueba y se adicionaron 10 ml de hexano. Un total de ocho tubos se colocaron en un contenedor de acero inoxidable, que se sumergió en un baño de agua, donde los ultrasonidos se aplicaron en las condiciones de trabajo óptimas —ciclo útil 50%, potencia aplicada 225 W, posición de la sonda 1 cm desde el fondo del baño, temperatura del agua de baño 35 °C y tiempo de irradiación 3 min. Después de la extracción, el extracto (fracción lipídica) se centrifugó durante 5 min a 3000 rpm y el sobrenadante se separó y guardó en frascos ámbar. El ciclo se repitió dos veces más —el tiempo total de extracción fue de 9 min. El hexano del extracto se evaporó hasta sequedad a 35 °C.

Fracción fenólica. Se colocaron 0.5 g de flores en cada tubo de prueba y se adicionaron 5 ml de una mezcla etanol–agua 40:60. En un contenedor de acero inoxidable se colocaron un total de ocho tubos y se sumergió en un baño con agua, donde la sonda, situada en el centro del recipiente para la recepción homogénea de los ultrasonidos por todos los tubos, trabajó en las siguientes condiciones óptimas: ciclo útil 50%, amplitud 50%, potencia aplicada 225 W, posición de la sonda 3 cm desde el fondo del baño, temperatura del baño 35 °C y tiempo de irradiación de 11 min. Después de la extracción, el extracto (fracción fenólica) se centrifugó durante 5 min a 3000 rpm para depositar en el fondo las partículas en suspensión

y el sobrenadante se separó y guardó en frascos ámbar. El ciclo se repitió 4 veces más — tiempo total de extracción, 55 min—y se llevó a un matraz volumétrico de 25 ml aforando con la mezcla de extractante. Para la determinación de polifenoles totales se aplicó el método de Folin-Ciocalteu.

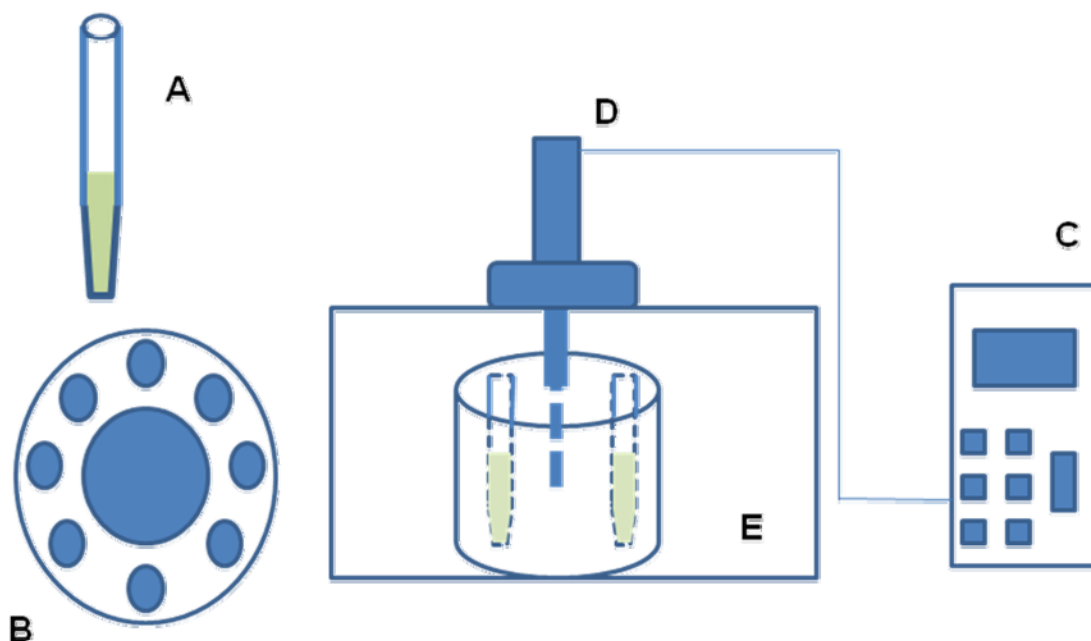


Figura 15. Dispositivo para la lixiviación asistida por ultrasonidos: A) Tubo de muestra (materia vegetal y lixivante), B) baño de agua, C) módulo de control digital, D) sonda de ultrasonidos y E) cámara de extracción.

2.1. Método para la determinación del perfil de ácidos grasos

La separación individual de esteres metilados de ácidos grasos (FAMES) se realizó por GC, mientras que la detección y cuantificación se llevó a cabo mediante por espectrometría de masas MS usando el método GC–MS desarrollado por Sánchez-Ávila *et. al.*, 2007, [76] modificando la etapa de inyección (volumen inyectado 1.0 μ l y régimen isotérmico del inyector en modo *splitless* a 250 °C durante el desarrollo).

Los extractos de FAMEs se analizaron utilizando el siguiente programa de temperaturas para el horno: temperatura inicial 70 °C (mantenido durante 1.2 min), incrementándose a 25 °C/min hasta 120 °C y a continuación un segundo gradiente de 2 °C/min hasta 243 °C y, finalmente, se incrementó a 40 °C/min hasta 270 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 5 min. El espectrómetro de masas operó en modo EI y el modo de preparación del ión fue μ _Selected Ion Storage (μ _SIS, similar a *Selected Ion Monitoring*). El colector, la trampa y las temperaturas lineales de transferencia se mantuvieron a 60, 170 y 200 °C, respectivamente. Se utilizó helio como gas portador con un flujo constante de 1 ml/min.

2.2 Método para la determinación del perfil de fenoles

El método aplicado fue propuesto por Ferreira-Vera, 2009, [77] para la determinación de compuestos fenólicos en residuos de vino, y se adaptó para extractos de *H. inuloides*.

La columna analítica fue de fase reversa Inertsil ODS-2 (250 x 4.6 mm i.d., 5 μ m), el volumen de inyección de 20 μ l, y la fase móvil una mezcla binaria con gradiente de concentración (agua, 0.2% ácido fosfórico) y B (1:1 acetonitrilo: metanol). El gradiente fue el siguiente: 0-20 min, 96-82 % A y 4-18% B, velocidad de flujo 1 ml/min; 20-40 min, 82-0% A y 18-100% B, velocidad de flujo 1 ml/min; 40-84 min, 82-74% A y 18-26% B, velocidad de flujo 1ml/min; 84-93 min, 74-50% A y 26-50% B, velocidad de flujo 1 ml/min. Los extractos se inyectaron directamente en el cromatógrafo y el seguimiento de la elución se realizó a 260, 280, 320 y 360 nm (tiempo de elución 93 min).

3. Resultados

Optimización del método de extracción

Fracción lipídica. Las variables que se optimizaron en la etapa de extracción fueron siete: posición de sonda, amplitud de la radiación de ultrasonidos, fracción de segundo de exposición a ultrasonidos cada segundo (ciclo útil), tiempo de irradiación, temperatura del

baño de agua, volumen de extractante y número de ciclos. La variable respuesta se expresó como peso total de la fracción lipídica determinada por gravimetría.

Se utilizó un diseño Plackett-Burman 27 x 3/32 tipo III con cuatro grados de libertad y 12 experimentos con tres puntos centrales para realizar el estudio de cribado (*screening*). La conclusión de este estudio fue que la máxima fracción lipídica que puede extraerse en ser extraída es bajo las siguientes condiciones óptimas: posición de prueba 1 cm desde el fondo del baño de agua, 50% amplitud de radiación de ultrasonidos, 50% de exposición de ultrasonidos (ciclo útil), 3 min tiempo de irradiación, 35 °C temperatura del baño de agua, 10 ml de volumen de extractante y 3 ciclos.

Finalmente, un estudio cinético bajo las condiciones óptimas fue realizado para conocer el número de ciclos necesarios para la extracción completa. Resultando 3 ciclos para la extracción completa de la fracción lipídica en árnica para el método propuesto de extracción asistida por ultrasonidos (**Tabla 12**).

Fracción fenólica. Las variables fueron las mismas que para la extracción de la fracción lipídica, solo se incluyo para este caso la composición del extractante (mezclas etanol-agua). La variable respuesta fue expresada como la concentración total de fenoles dada como µg de ácido gálico por g de árnica (µg/g) como fue calculado por el método de Folin-Ciocalteu.

Un diseño Plackett-Burman 27x 3/32 tipo III se utilizó con cuatro grados de libertad y se diseñaron 12 experimentos con tres puntos centrales para realizar el estudio de cribado y conocer qué factores influyen mayormente en el proceso de extracción.

Tabla 12. Optimización de extracción asistida por ultrasonidos de la fracción lipídica de *H. inuloides*

Variable	Rango probado	Valor óptimo
Posición de prueba (cm) ^a	1–3	1
Amplitud de radiación ultrasónica (%)	10–50	50
Porcentaje de exposición ultrasónica (duty cycle) (%)	10–50	50
Tiempo de irradiación (min)	3–7	3
Temperatura del baño de agua (°C)	15–35	35
Volumen de extractante (ml)	5–10	10
Número de ciclos	1–4	3

^a desde el fondo del baño

La conclusión de este estudio de cribado fue que la posición de prueba, la temperatura del agua del baño, la amplitud de radiación, el volumen de extractante, y el ciclo útil son factores que no influyen estadísticamente con los rangos de estudio. Sin embargo, los resultados mostraron alta eficiencia de extracción con valores bajos para el volumen de extractante (5 ml) y valores altos para la posición de prueba (3 cm), amplitud de la radiación de ultrasonidos 50%, ciclo útil 50% y la temperatura del agua del baño 35 °C. Tiempo de irradiación, número de ciclos y porcentaje de etanol en la mezcla de extractante fueron factores que influyen en el rango de estudio. El primero y segundo factor tienen una influencia positiva en el proceso y la influencia de la tercera fue negativa. El segundo cribado involucró altos valores para el tiempo de irradiación y el número de ciclos y valores

bajos para el porcentaje de etanol en la mezcla de extractante, el resto de variables se mantuvo bajo las condiciones óptimas (**Tabla 13**). Como resultado se obtuvo que el número de ciclos fue el factor que más influye; esto fue estudiado por un estudio univariante fijando el resto de las variables en sus valores óptimos (porcentaje de etanol en el extractante 40% y un tiempo de irradiación de 11 min). Se diseñaron los ciclos de extracción de 1 a 6. Los resultados obtenidos muestran que la eficiencia de la extracción se incrementa con 5 ciclos.

Table 13. Optimización de la extracción asistida por ultrasonidos de la fracción fenólica de *H. inuloides*

Variable	Rango probado		Valor óptimo
	Primer diseño	Segundo diseño	
Posición de prueba (cm) ^a	1–3	3	3
Amplitud de radiación ultrasónica (%)	10–50	50	50
Porcentaje de exposición ultrasónica (duty cycle) (%)	10–50	50	50
Tiempo de irradiación	3–7	7–11	11
Temperatura del baño de agua (°C)	15–35	35	35
Etanol en la mezcla de extractante (%)	50–80	20–50	40
Volumen de extractante (ml)	5–10	5	5
Número de ciclos	1–3	3–6	5

^a desde el fondo del baño

3.1. Caracterización de la fracción lipídica y fenólica

Fracción lipídica. Los ácidos grasos en la fracción lipídica fueron analizados por GC-MS. La separación completa se dio en 78 min. El ácido metil nonadecenoato (C19:1) fue usado como estándar interno debido a sus características físicas y químicas similares a los analitos derivatizados y su ausencia en las muestras analizadas.

Los analitos con altas concentraciones en *H. inuloides* (**Tabla 14**) fueron los ácidos eicosatetraenoico n3 (24.6 µg/g), cis-9-hexadecenoico n7 (23.1 µg/g), exacosanoico (22.67 µg/g) y cis-9-octadecenoico (21.32 µg/g); el resto de analitos se encuentra en el rango de 7.65 µg/g (*trans*-9 ácido octadecenoico) – 1.30 µg/g (*cis, trans*-ácido octadecadienoico). En este trabajo se obtuvo también el porcentaje de ácidos grasos por las familias más importantes en la fracción total lipídica, llamados: ácidos grasos monosaturados 37.18% y ácidos grasos insaturados 71.83% (dentro de estos están los ácidos grasos *trans* 16.26%, omega 3 17.49% y omega 6 27.61%).

Fracción fenólica. Debido a la complejidad de la matriz de *H. inuloides*, la cuantificación de los analitos fue basada en la adición de un estándar al método. Los resultados muestran altos contenidos de compuestos fenólicos —específicamente 190.13 µg/g. Estos valores son bajos a los obtenidos por el método espectrofotométrico de F-C, el cual da una concentración de 226.4 µg/g; esto se debe a que los fenoles presentes en el extracto no coinciden con el ácido gálico usado como estándar e interferencias han sido detectadas en el método F-C causadas por SO₂ y los compuestos conteniendo nitrógeno tales como aminoácidos y proteínas, causando un error por exceso.

Las concentraciones en esta fracción (ver **Tabla 15**) fueron guaiacol (41.50 µg/g), catequina (38.70 µg/g), ácido elágico (35.9 µg/g), ácido carbólico (24.20 µg/g) y ácido cumárico (19.50 µg/g); el resto de fenoles se encuentra en el rango de 5.15 µg/g (pirocatecol) – 0.47 µg/g (ácido vainillico). Esta fracción contiene cantidades significativas de antioxidantes, donde su acción ha sido ampliamente estudiada por la medicina. Tal es el caso del ácido elágico que tiene propiedades antiproliferativas y antioxidantes [78]. la catequina es un flavonoide que actúa como antioxidante en el metabolismo de las plantas [79], el siringaldehído es un aldehído aromático en plantas, el fenol tiene propiedades

antisépticas [80], el guaicol es un expectorante, antiséptico y anestésico [81], y el ácido cumárico tiene propiedades antioxidantes y anticancerígeno[82]. Todos estos compuestos están presentes en el extracto obtenido por el método propuesto, las concentraciones de las fracciones lipídica y fenólica y su cuantificación individual no han sido calculados en estudios previos de *H. inuloides*, siendo solo la fracción volátil motivo de estudio.

Tabla 14. Curva de calibración, coeficiente de regresión, límites de detección y cuantificación (LOD and LOQ), y concentración de cada analito por GC-MS para la fracción lipídica de *H. inuloides*

Compuesto	Curva de calibración	R ²	LOD ^a	LOQ ^a	Concentración ^a
C9	y=0.068x+0.00289	0.995	0.2	0.66	3.34±0.40
C12	y=0.0251x+0.00264	0.997	0.01	0.033	5.31±0.82
C16:0	y= 0.0487x+0.00522	0.991	0.17	0.561	2.43±0.31
C16:1 n7	y=0.0232x-0.00134	0.994	0.008	0.0264	23.1±2.53
C17	y=0.08716x-0.00105	0.998	0.002	0.0066	4.72±0.44
C17:1 n10	y=0.0296x-0.00867	0.993	0.005	0.0165	6.56±0.63
C18	y=0.0868x-0.00704	0.997	0.01	0.033	5.74±0.50
C18:1n9 t	y=0.0225x+0.00472	0.999	0.004	0.0132	7.65±0.61
C18:1n9	y=0.0278x+0.00151	0.995	0.004	0.0132	21.32±2.44
C18:1n7	y=0.0364x-0.00597	0.995	0.004	0.0132	5.71±0.58
C18:2 t9,t12	y=0.0147x-0.00104	0.998	0.09	0.297	3.45±0.89
C18:2 c, t	y=0.0602x-0.0082	0.997	0.095	0.3135	1.30±0.17
C18:2 t, c	y=0.0555x-0.00341	0.999	0.07	0.231	1.82±0.19
C18:2 c, c	y= 0.08802x-0.00724	0.997	0.01	0.033	4.52±0.45
C18:3 t, t, c	y=0.0123x-0.00187	0.998	0.08	0.264	1.57±0.16
C18:3 c, t, t	y=0.0117x-0.00672	0.986	0.06	0.198	5.78±0.83
C18:3 c, t, c	y=0.0143x-0.00106	0.993	0.006	0.0198	2.45±0.22
C18:3 t, c, c	y=0.0269x-0.0042	0.992	0.004	0.0132	4.12±0.35
C18:3 c, c, c	y=0.0109x-0.0044	0.965	0.006	0.0198	3.60±0.29
C20:3 n6	y=0.0833x-0.00628	0.999	0.03	0.099	5.61±0.87
C20:4n3	y=0.04232x+0.001514	0.965	0.005	0.0165	24.61±2.61
C20:5 n3	y=0.0140x-0.00167	0.989	0.006	0.0198	5.66±0.88
C26:0	y=0.0240x-0.00104	0.998	0.002	0.0066	22.67±2.35

^a como µg/g

Tabla 15. Curva de calibración, coeficiente de regresión, límites de detección y cuantificación (LOD and LOQ), y concentración de cada analito por HPLC-DAD para la fracción fenólica de *H. inuloides*.

Compuestos	Curva de calibración	R ²	LOD ^a	LOQ ^a	Longitud de onda	Concn. ^a
Catechina	y=234.5x+31.23	0.997	6.50	21.52	280	38.7 ± 5.3
Vainillina	y=255.1x+35.7	0.998	3.25	10.79	320	1.2±0.23
Siringaldehído	y=87.34x+23.3	0.999	5.60	18.71	320	1.31±0.26
Coniferaldehído	y=345.8x+43.9	0.994	4.33	14.29	320	0.55±0.28
Sinapaldehído	y=556.71x+87.5	0.987	3.27	10.80	360	0.77±0.29
Acetovanillona	y=44.56x+28.9	0.998	6.44	21.26	320	3.4±0.87
Acetosiringona	y=467.3x+79.7	0.999	2.65	8.74	360	2.7±0.50
Pirogallol	y=212.5x+12.89	0.995	4.23	13.96	360	1.1±0.30
Pirocatechol	y=346.9x+65.4	0.997	6,56	21.65	360	5.15±0.76
Ácido carbólico	y=457.7x+78.9	0.99	4.38	19.45	280	24.2±2.91
Guaicol	y=292.4x+55.4	0.99	4.43	22.62	320	41.5±5.6
Ácido gallico	y=77.98x+33.5	0.99	3.40	11.22	320	4.9±1.9
Ácido protocatechuico	y=377.6x+93.4	0.986	3.96	13.07	320	3.1±1.2
Ácido p-Hydroxibenzoico	y=586.32x+88.6	0.99	2.69	8,88	360	0.67±1.9
Ácido Siringico	y=422.7x+75.4	0.996	2.07	6.82	360	2.78±4.3
Ácido p-Coumarico	y=341.3x+58.6	0.997	3.35	17.75	280	19.5±0.99
Ácido Ferulico	y=76.57x+32.14	0.99	3.35	11.06	280	2.7±0.64
Ácido Ellagico	y=51.22x+26.2	0.99	5.60	16.88	320	35.9±3.89
Ácido Vanílico	y=88.7x+44.3	0.99	3.48	11.50	320	0.47±1.8

^a como µg/g

4. Conclusión

El método de extracción asistida por ultrasonidos es el propuesto y optimizado para obtener la fracción lipídica y fenólica de *H. inuloides*.

La aplicación de ultrasonidos favorece la extracción total del contenido de ácidos grasos y fenoles de plantas en un tiempo más corto que el requerido en el método de extracción Soxhlet y maceración para la fracción lipídica y fenólica, respectivamente, reduciendo considerablemente el tiempo de extracción (de 24 h a 9 min para la fracción lipídica y de 24 h a 55 min para la fracción fenólica) y aumentando el rendimiento. El volumen de disolvente orgánico usado en el método aquí propuesto también se reduce considerablemente (30 ml de hexano y 25 ml de etanol-agua para la extracción completa de la fracción lipídica y fenólica, respectivamente *versus* 100 ml requeridos por los métodos convencionales).

La caracterización de la composición de ambas fracciones se realizó y esta información constituye una primera aproximación al “metaboloma de árnica” para un completo conocimiento de esta planta para justificar su uso en la medicina tradicional en México y otras ciudades con alta producción de esta planta.