



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Estudio comparativo de la extracción de perezona, del
especimen *Acourtia platyphylla*, empleando bióxido de
carbono supercrítico y ultrasonido**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA

PRESENTA:

ANDREA KAREN VÁZQUEZ CABAÑAS

ASESOR: **Dr. René Miranda Ruvalcaba**

COASESOR: **Dr. Julián Cruz Olivares**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

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



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

Estudio comparativo de la extracción de perezona, del espécimen *Acourtia platyphylla*, empleando bióxido de carbono supercrítico y ultrasonido.

Que presenta la pasante: Andrea Karen Vázquez Cabañas
Con número de cuenta: 410028128 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Química

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de Marzo de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. René Miranda Ruvalcaba	
VOCAL	Dr. José Luis Arias Téllez	
SECRETARIO	Dr. Gabriel Arturo Arroyo Razo	
1er. SUPLENTE	Dr. Benjamín Velasco Bejarano	
2do. SUPLENTE	Dra. María Olivia Noguez Córdova	

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

El presente trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. René Miranda Ruvalcaba en el Laboratorio de Estudios sobre Química Verde L-122 de la Sección de Química Orgánica del Departamento de Ciencias Químicas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México.

DEDICATORIA

A Dios por ponerme en la familia indicada, también porque cada día bendice mi vida con la hermosa oportunidad de estar y disfrutar al lado de las personas que más amo.

A mi madre gracias por darme la vida, gracias por estar a mi lado y dedicar tu vida a tu familia.

Para ti mi padre adorado, recuerdo aquella carta que escribiste con la ilusión y la alegría de que llegara a tu vida, espero que la vida me permita regresarte al menos un poco de todo lo que tú me has entregado día a día desde que yo llegue a tu vida. Gracias por entregar tus fuerzas para que toda tu familia tenga bienestar.

Padres lo que soy es gracias a ustedes.

A mi hermano Erick, a mis hermanas Isela y Raquel, porque los amo.
A Sergio por la ilusión.

A mi tío Raúl por ser un apoyo incondicional.

A mi abuelita Carmen y mi abuelito Serafín gracias por el apoyo, por los consejos y enseñanzas que siempre estarán en mi mente y mi corazón, son parte de mis más preciados recuerdos, todas las cosas buenas que me sigan sucediendo en parte serán por todo lo que me han enseñado.

Dedico este manuscrito a los profesores que han contribuido a mi formación profesional en especial al Dr. René Miranda Ruvalcaba, al Dr. Julián Cruz Olivares, al Dr. Benjamín Velasco Bejarano, a la Dra. Olivia Noguez Córdoba, al Dr. Gabriel Arturo Arrollo Razo y al Dr. José Luis Arias Téllez, por el conocimiento brindado.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de la manera más sincera:

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por haberme permitido formarme y en ella, por el apoyo, conocimiento y las herramientas que me han brindado para desarrollarme como una buena profesionista.

Al proyecto PAPIIT-UNAM IN221514 sin cuyo apoyo no hubiera sido posible este trabajo.

Agradezco al Dr. René Miranda Ruvalcaba por ser un mentor para entrar en el mundo de la química, gracias por compartir sus conocimientos

Al Dr. Julián Cruz Olivares por abrirnos las puertas de su laboratorio de fluidos supercrítico y brindar el apoyo para los estudios realizados

Al Dr. Benjamín Velasco Bejarano gracias por el apoyo brindado para realizar esta tesis, a la Dra. Olivia Noguez Córdoba, al Dr. Gabriel Arturo Arrollo Razo y al Dr. José Luis Arias Téllez quienes fueron un apoyo al compartir sus conocimientos durante el desarrollo del manuscrito.

Al C. a Dr. Rene Gerardo Escobedo por el apoyo y cada detalle dedicado para aclarar cualquier tipo de duda que me surgiera.

Al Dr. Juan Nava Serrano, por su apoyo en la recolección del espécimen.

Al Dr. David Corona Becerril por y a la M.C. María de las Nieves Zavala Segovia por el apoyo en el Laboratorio de RMN del CCIQS UAEM-UNAM.

A Armando Martínez por el apoyo y ser un buen compañero

CONTENIDO

1 SINOPSIS	1
1.1 Resumen	1
1.2 Abstract	1
1.3 Introducción	2
1.4 Índice de Figuras	3
1.5 Índice de Tablas	5
1.6 Índice de Gráficas.....	6
2 ANTECEDENTES	7
2.1 Química Verde.....	7
2.1.1 <i>Los Doce Principios</i>	7
2.1.2 <i>Medios Alternos de Reacción</i>	9
2.1.2.1 <i>Fluidos Supercríticos</i>	10
2.1.2.1.1 Bióxido de Carbono Supercrítico	15
2.1.3 <i>Métodos Alternos de Activación</i>	18
2.1.3.1 <i>Tratamiento Térmico</i>	19
2.1.3.2 <i>Ultrasonido</i>	19
2.2 Perezona.....	23
2.2.1 <i>Distribución y Descripción del Género Acourtia</i>	24
2.2.2 <i>Producción de Perezona</i>	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo General.....	26
3.2 Objetivos Particulares.....	26
4 HIPÓTESIS	26

5 PARTE EXPERIMENTAL	27
5.1 Recolección e Identificación del Espécimen Vegetal.....	28
5.1.1 <i>Identificación Taxonómica del Espécimen Vegetal</i>	29
5.2 Tratamiento del Espécimen Vegetal.....	31
5.3 Metodología para la Extracción de Perezona	32
5.3.1 <i>Extracción Clásica (calentamiento convencional a reflujo)</i>	32
5.3.2 <i>Extracción con Ultrasonido</i>	33
5.3.3 <i>Extracción con Bióxido de Carbono Supercrítico</i>	35
5.4 Metodología para la Cuantificación de Perezona Presente en el Extracto.....	40
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
6.1 Análisis Mediante Cromatografía de Líquidos Acoplada a Espectrometría de Masas	41
6.2 Análisis Espectroscópico de RMN ¹ H.....	43
6.3 Análisis Estadístico.....	46
6.4 Análisis Comparativo del Consumo Energético de los Métodos Extracción de Perezona.....	58
7 CONCLUSIONES	59
8 REFERENCIAS	61
9 APENDICE	63
9.1 Condiciones experimentales.....	63
9.2 Espectros de RMN ¹ H.....	65

1 SINOPSIS

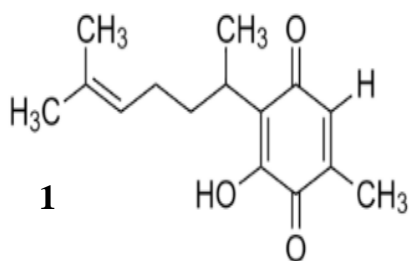
1.1 Resumen

En el presente trabajo se estudió al espécimen *Acourtia platyphylla* con un enfoque basado en la química verde, para obtener mediante extracciones a partir de su raíz a la perezona, principal metabolito de manera selectiva. En detalle es importante resaltar que se realizó un estudio comparativo entre la extracción con calentamiento térmico convencional (mantilla de calentamiento) y dos métodos de activación alternos: la extracción con bióxido de carbono supercrítico y ultrasonido. La perezona contenida en los extractos se cuantificó mediante Resonancia Magnética Nuclear de protón con el método de patrón interno utilizando 1,4-dinitrobenceno; de los resultados obtenidos se desprende que el ultrasonido a 60 °C durante 30 minutos implica el mejor método.

1.2 Abstract

In the present work, the *Acourtia platyphylla* specimen was studied with a green approach in order to isolate by extractions the main metabolite known as perezona from the corresponding roots. It is worth noting that a comparative study was made between various modes for the extraction: conventional mantle thermal heating and two alternative activation methods, supercritical carbon dioxide and ultrasound. The perezona contained in the extracts was quantified by proton Nuclear Magnetic Resonance using the internal standard method, 1,4-dinitrobenzene. Finally, the obtained results are indicative that ultrasound at 60 °C during 30 minutes was the most convenient procedure.

1.3 Introducción



La perezona, o ácido pipitzoico (**1**), una sesquiterpen-quinona, es el primer metabolito secundario aislado en América en 1852 por el Dr. Leopoldo Río de la Loza (**2**) a partir de la raíz de pipitzáhuac,^[1] la cual presenta excelente actividad biológica relacionada a su asombrosa reactividad química,^[2,3] fue empleada desde

el México prehispánico para usos medicinales debido a que posee propiedades curativas.^[4] Se ha usado en la medicina tradicional mexicana como purgante, astringente, regenerativo, diurético y analgésico; asimismo, ha sido objeto de investigación en un número considerable de investigaciones.



Por otro lado, la Química Verde (QV),^[5] protocolizada por *doce principios* implica una nueva forma de hacer química, pero con el objetivo principal de minimizar y de ser posible eliminar la producción de la contaminación, “**es una química preventiva de la contaminación**”. Tiene como objetivo el diseño de productos o procesos que reduzcan o eliminen el uso o la producción de sustancias peligrosas para el ser humano y el ambiente, ésta, ofrece alternativas de mayor compatibilidad ambiental, comparadas con los productos o procesos disponibles actualmente cuya peligrosidad es mayor y que son usados tanto por el consumidor como en aplicaciones industriales.

Desde su nacimiento, a principios de la década de 1990, este paradigma ha adquirido relevancia como una filosofía científica.^[6] El empleo por primera vez del término "Química Verde" ha sido asignado a Paul Anastas en 1991.^[1] Es conveniente mencionar que, en la mayoría de los procesos químicos, se utilizan fuentes de energía térmica que se originan a partir de combustibles fósiles. En consecuencia, resulta importante resaltar los siguientes *principios*, **5** (disolventes seguros, las sustancias auxiliares deben resultar innecesarias en lo posible y, cuanto menos deben ser inocuas.) y **6** (eficiencia energética, las necesidades energéticas deben ser consideradas en relación a sus impactos ambientales y económicos, buscando minimizar su consumo) del protocolo de la Química Verde.

En relación a lo antes mencionado, surge la importancia y por ende el objetivo principal de este trabajo de tesis: realizar un estudio comparativo de la extracción de perezona del espécimen, *Acourtia platyphylla*, evaluando un método alternativo de activación como lo es el ultrasonido (US) y a otro proceso que implica un medio alternativo de extracción, utilizando bióxido de carbono supercrítico (CO₂SC) de manera comparativa con el tratamiento térmico de extracción clásica con mantilla de calentamiento a reflujo (MC), el extracto obtenido se analizó por cromatografía de líquidos acoplada espectrometría de masas para su identificación y la cuantificación de la perezona presente en el extracto se realizó por RMN ¹H, obteniendo como resultado que el mejor método fue el ultrasonido.

1.4 Índice de Figuras

Figura 1. Molécula de perezona.....	2
Figura 2. Dr. Leopoldo Río de la Loza.....	2
Figura 3. Diagrama de fases sólido-líquido-gas-fluido supercrítico.....	10
Figura 4. Diagrama de fases del bióxido de carbono.....	15
Figura 5. Gráfico del estudio de la extracción de la perezona en CO ₂	16
Figura 6. Gráfico de cinéticas de la solubilidad de perezona en CO ₂ SC.....	17
Figura 7. Gradiente de temperatura del calentamiento convencional	19
Figura 8. Espectro de frecuencias de ondas sonoras.....	19
Figura 9. Ciclo de cavitación	20
Figura 10. Ciclo de presión.....	21
Figura 11. Ciclo de crecimiento de la burbuja y desarrollo de la cavitación.....	21
Figura 12. Diagrama de la metodología general para la extracción de perezona.....	27
Figura 13. Vista de los municipios con los que colinda la sierra de Guadalupe.....	28
Figura 14. Vista de la sierra de Guadalupe.....	28
Figura 15. Ecosistema otras especies presentes.....	28
Figura 16. Ecosistema en la sierra.....	28
Figura 17. Ladera, sierra de Guadalupe.....	28
Figura 18. Sierra de Guadalupe donde se recolecto el espécimen.....	28
Figura 19. Ecosistema alrededores de la cima en la sierra de Guadalupe.....	28
Figura 20. Especimen de <i>Acourtia</i>	29
Figura 21. Especimen de <i>Acourtia</i> seco.....	29
Figura 22. Especimen recolectado de <i>Acourtia</i>	29
Figura 23. Dictamen de la identificación del espécimen.....	30
Figura 24. Secado de la raíz del espécimen <i>Acourtia platyphylla</i> a) y b)	31
Figura 25. Trituración de la raíz a) y b)	31

Figura 26. Diagrama para la extracción térmica convencional.....	32
Figura 27. El equipo de extracción convencional o clásica.....	33
Figura 28. Extracción clásica.....	33
Figura 29. Cristales de extracción clásica.....	33
Figura 30. Diagrama de la extracción por ultrasonido.....	34
Figura 31. Extracción con ultrasonido.....	34
Figura 32. Sonicación.....	34
Figura 33. Filtración del extracto de perezona.....	35
Figura 34. Cristales de extracción US.....	35
Figura 35. Equipo de fluidos supercríticos.....	36
Figura 36. Diagrama esquemático del sistema para fluidos supercríticos.....	36
Figura 37. Diagrama para la extracción con CO ₂ supercrítico.....	37
Figura 38. Cámara isotérmica del equipo de fluidos supercríticos.....	38
Figura 39. Tapa del reactor y tubo inyector de CO ₂	38
Figura 40. Obtención de perezona en forma de finas agujas.....	38
Figura 41. Celda de rejilla contenedora de la raíz.....	38
Figura 42. Formación de cristales dentro del reactor cilíndrico.....	38
Figura 43. Cristales de perezona recuperados con disolvente a) y b).....	39
Figura 44. Cristales de perezona obtenidos con CO ₂ SC ₂ a) b) y c).....	39
Figura 45. Muestras para RMN ¹ H.....	40
Figura 46. Equipo varían para RMN ¹ H.....	40
Figura 47. Cromatograma del extracto de perezona.....	41
Figura 48. Espectro de masas de la perezona determinado por ESI.....	42
Figura 49. Espectro de RMN ¹ H de perezona reportado en la literatura.....	43
Figura 50. Espectro de RMN ¹ H del extracto de perezona con patrón interno.....	44

1.5 Índice de Tablas

Tabla 1. Importancia del uso de disolventes en los procesos químicos.....	9
Tabla 2. Características generales de los fluidos supercríticos.....	10
Tabla 3. Condiciones críticas de varios disolventes.....	11
Tabla 4. Propiedades físico-químicas de los gases y los líquidos en comparación con las del dióxido de carbono supercrítico.....	12
Tabla 5. Ventajas de la extracción con FSC.....	12
Tabla 6. El poder para disolver de los FSC depende de dos efectos.....	13
Tabla 7. Factores que aumentan y disminuyen la solubilidad de un FSC.....	14
Tabla 8. Elección de un fluido supercrítico.....	14
Tabla 9. Ventajas y desventajas de los FSC más comúnmente utilizados.....	15
Tabla 10. Energías de activación y tipo de excitación.....	18
Tabla 11. Rango de frecuencias del ultrasonido.....	20
Tabla 12. Ventajas del ultrasonido.....	22
Tabla 13. Otras propiedades curativas.....	23
Tabla 14. Ionización por electro spray (ESI).....	43
Tabla 15. Tratamiento, condiciones y nomenclatura para cada método.....	46
Tabla 16. Resultados de la extracción con Reflujo 1.- 3 h.....	47
Tabla 17. Resultados de la extracción con US 1.- 1 h.....	47
Tabla 18. Resultados de la extracción con US 2.- 30 m.....	47
Tabla 19. Resultados de la extracción con CO ₂ SC 1.- 6 h.....	48
Tabla 20. Resultados de la extracción con CO ₂ SC 2.- 10 h.....	48
Tabla 21. Resultados de la extracción con CO ₂ SC 3.- 12 h.....	48
Tabla 22. Resultados de la extracción con CO ₂ SC 4.- 24 h.....	48
Tabla 23. Cuantificación y rendimientos de la extracción con Reflujo 1.- 3 h.....	49
Tabla 24. Cuantificación y rendimientos de la extracción con US 1.- 1 h.....	49

Tabla 25. Cuantificación y rendimientos de la extracción con US 2.- 30 m.....	49
Tabla 26. Cuantificación y rendimientos de la extracción con CO ₂ SC 1.- 6 h.....	49
Tabla 27. Cuantificación y rendimientos de la extracción con CO ₂ SC 2.- 10 h.....	50
Tabla 28. Cuantificación y rendimientos de la extracción con CO ₂ SC 3.- 12 h.....	50
Tabla 29. Cuantificación y rendimientos de la extracción con CO ₂ SC 4.- 24 h.....	50
Tabla 30. Cálculo de error estándar para perezona en el extracto.....	50
Tabla 31. Porcentaje de perezona en el extracto.....	51
Tabla 32. Análisis de varianza de un factor para perezona en el extracto.....	52
Tabla 33. Análisis de varianza para perezona en el extracto.....	52
Tabla 34. Valores para prueba de Tukey para perezona en el extracto.....	52
Tabla 35. Valores de diferencias entre cada método para perezona en el extracto.....	53
Tabla 36. Diferencias significativas para la prueba de Tukey de la perezona presente en el extracto.....	53
Tabla 37. Cálculo de error estándar para perezona en la raíz.....	54
Tabla 38. Porcentaje de perezona en la raíz.....	54
Tabla 39. Análisis de varianza de un factor para de perezona en la raíz.....	55
Tabla 40. Análisis de varianza para perezona en la raíz.....	56
Tabla 41. Valores para Prueba de Tukey para perezona en la raíz.....	56
Tabla 42. Valores de diferencias entre cada método para perezona en la raíz.....	56
Tabla 43. Diferencias significativas para la prueba de Tukey de la perezona contenida en la raíz.....	57
Tabla 44. Comparación del consumo energético de los diferentes métodos.....	58

1.6 Índice de Gráficas

Gráfica 1. Porcentaje de la extracción perezona en el extracto para cada método.....	51
Gráfica 2. Porcentaje de la extracción perezona en la raíz para cada método.....	55

2 ANTECEDENTES

2.1 Química Verde

La química es una ciencia que contribuye a la mejora de la calidad de vida de manera trascendente, puesto que esta ciencia avanza constantemente generando nuevos beneficios contribuyendo así al bienestar del hombre actual y al desarrollo de la sociedad.

Por consiguiente, es importante el diseño novedoso de sustancias que realizan las mismas funciones que otras ya existentes, pero con un impacto ambiental mucho menor. También se han desarrollado procesos que utilizan materias primas renovables y que reducen la energía necesaria para llevarlos a cabo.

Por ello nace la QV, la cual “se ocupa del diseño de productos y procesos que reducen o eliminan la producción y el uso de sustancias peligrosas tóxicas.” Esta debe de ser entendida como una estrategia global que debe de impregnar y conducir la actividad de los químicos.

El objetivo marcado es la sustitución de las sustancias peligrosas usadas en la industria y la mejora de los métodos de producción ya existentes, para minimizar el impacto ambiental.

La Química Verde se ha ido conformando, a lo largo de los últimos años, como una forma viable de abordar el desarrollo de la química. La aplicación de los *doce principios* de la QV en la industria e investigación ya sea pura o aplicada, así como en la docencia va avanzando, debido al enorme interés por las distintas líneas de trabajo.^[5] Por todo ello, se hace necesario una mayor difusión e incorporación de estos contenidos y directrices, como parte de la formación académica de los futuros profesionales de la química. "La Química Verde representa los pilares que mantendrán nuestro futuro sostenible. Es imprescindible enseñar el valor de la Química Verde a los químicos del mañana"; en resumen, es una **química preventiva**.

Finalmente es importante señalar que con la aplicación de los doce principios básicos de la química verde se puede contribuir a la reducción o eliminación de los productos contaminantes generados durante las reacciones químicas, así como reemplazar reactivos que dañan el medio.^[5]

2.1.1 *Los Doce Principios*

Los Principios de la Química Verde escritos por P.T. Anastas y J.C. Warner, en su libro *Green Chemistry: Theory and Practice*,^[6] recogen las ideas básicas que propicia la QV. Estos autores sistematizaron los campos de actuación y los objetivos hacia los que dirigir el esfuerzo de investigadores e ingenieros, si se quiere hacer de la Química una actividad menos agresiva con el ambiente.

Los *Doce Principios* se presentan de manera resumida a continuación:

1. Prevención: Es mejor prevenir, desde el principio y en cualquier proceso, la generación de residuos que eliminarlos una vez que se han creado.

2. Economía Atómica: El concepto de economía atómica fue introducido en 1991 como una medida de la eficiencia de una reacción. La idea se basa en el diseño de métodos sintéticos en los que la incorporación al producto final de todos los materiales usados en la síntesis sea la mayor posible. Esto provoca que los pasos necesarios para la obtención de una sustancia sean lo más selectivos posibles y se minimice la formación de subproductos y, por tanto, de residuos.

3. Uso de tecnologías más seguras: Siempre que sea posible, los métodos de síntesis deberán diseñarse para utilizar y generar sustancias que tengan poca o ninguna toxicidad, tanto para el hombre como para el medio ambiente.

4. Diseño de productos químicos más seguros: Los productos químicos deberán diseñarse para efectuar la función deseada, reduciendo al mínimo su toxicidad.

5. Uso de disolventes y productos auxiliares más seguros: El uso de las sustancias auxiliares, como, por ejemplo, disolventes, agentes de separación, grupos protectores, etc., deberán reducirse e incluso, si es posible, eliminarse. En caso de ser necesarios, deberán ser lo menos agresivos con el medio ambiente.

6. Eficiencia energética: Los requerimientos energéticos deberán clasificarse por su impacto medioambiental y económico, reduciéndose en todo lo posible la incidencia en el medio ambiente y los costes de producción. Se intentarán llevar a cabo los métodos de síntesis a temperatura ambiente y presión atmosférica.

7. Uso de materias primas renovables: Las materias primas deben ser preferentemente renovables en lugar de no renovables, siempre que, desde el punto de vista técnico y económico, sea posible.

8. Reducción de derivados: La formación de derivados debe ser reducida al mínimo o, si es posible, evitarla, porque esto requiere reactivos y disolventes adicionales que generan más residuos.

9. Catálisis: Es preferible potenciar el uso de catalizadores lo más selectivos posible, frente al empleo de reactivos en cantidades estequiométricas.

10. Materias primas renovables: Los productos químicos deberán diseñarse de modo que en el final de su vida útil no persistan en el medio ambiente y se degraden de forma controlada.

11. Análisis en tiempo real: Se desarrollarán al máximo los procedimientos y metodologías analíticas que permitan dar seguimiento y controlar en tiempo real la formación de sustancias potencialmente peligrosas.

12. Reducción del potencial de accidentes químicos: Se elegirán las sustancias para la realización de los procesos químicos de forma que se minimicen los riesgos de accidentes químicos, incluidas las emanaciones, explosiones e incendios.

Partiendo de estos **principios**, es posible marcar los objetivos generales que permitan hacer "verdes", es decir, reducir el impacto ambiental de las condiciones de reacción y las tecnologías aplicadas para desarrollarlas;^[7] dicho de otra manera, **prevenir** la contaminación.

2.1.2 *Medios Alternos de Reacción*

Al surgir la vertiente de la Química Verde han surgido o resurgido otras formas de trabajar experimentalmente, considerando el empleo de disolventes alternativos, la ausencia de ellos, o bien el acoplamiento de técnicas con diferentes disolventes. Lo cual proporciona un panorama general de estas nuevas formas de trabajar con disolventes alternos bajo el contexto de la Química Verde.

Muchos de los disolventes de uso general en cualquier proceso químico son compuestos orgánicos volátiles (**VOCs**), considerados agentes peligrosos y contaminantes, flamables, y/o tóxicos al ambiente. El *principio 5* de Química Verde explica al respecto “el uso de las sustancias auxiliares (disolventes, agentes de separación, etc.) descritas en la Tabla 1, se deben considerar innecesarios hasta donde sea posible y cuando sean utilizados deben ser inofensivos”.^[6] Las sustancias auxiliares, aunque sean necesarias como medios de reacción, no se deben incorporar al producto final.^[8]

Tabla 1. Importancia del uso de disolventes en los procesos químicos

- Disuelven sustancias
- Permiten crear dispersiones homogéneas
- Permiten un transporte de masa eficaz
- Pueden modificar la reactividad química
- Permiten la deposición de sólidos

Cabe resaltar que los factores más importantes son los relacionados con la solubilidad y capacidad dispersante; de hecho, la mayor cantidad de disolventes se usa en la industria de las pinturas, mientras que las aplicaciones relacionadas con la reactividad química suponen menos del 10% del uso total de disolventes.

Tradicionalmente la selección del disolvente adecuado para un determinado proceso, se hacía teniendo en cuenta su eficacia como tal y su capacidad de contribuir a que los procesos tuvieran lugar en condiciones óptimas de eficiencia, seguridad y rapidez.

Así dentro de la filosofía de la QV y de lo anteriormente mencionado, destaca el evitar en lo posible el uso de disolventes orgánicos y cuando la supresión de estos no sea factible, se deben hacer esfuerzos para optimizarlos, reducirlos al mínimo y reciclarlos, con la finalidad de desarrollar procedimientos sintéticos más benignos, pero siempre estar enfocados en que lo mejor es no emplearlos.

Con el afán de reducir el uso de disolventes, han surgido varios procedimientos que se han implementado para tal fin, inclusive se ha evitado el uso de los disolventes orgánicos como medio de reacción siendo este el proceso químico ideal, pero también se pueden emplear, a los fluidos supercríticos, líquidos iónicos, el agua, disolventes fluorados y el empleo de soportes sólidos, todos estos son conocidos como medios alternos de reacción en la Química Verde. Siendo la base de muchas de las tecnologías químicas más limpias y las cuales han alcanzado un gran desarrollo comercial, tanto a niveles académicos como industriales.

2.1.2.1 Fluidos Supercríticos

Por arriba de su presión y temperatura crítica los compuestos se encuentran en una fase que no es líquida ni gaseosa, sino que comparte las propiedades de ambas fases: fluye como un gas y es capaz de disolver sustancias como un líquido. En la Figura 3 se presenta el diagrama de fases clásico, las curvas de fusión, sublimación y vaporización muestran las zonas de coexistencia de dos fases. Tan solo hay un punto de coexistencia de tres fases, el llamado punto triple (**PT**). Un cambio de fase se asocia a un cambio brusco de entalpía y densidad, pero por encima del punto crítico (**PC**) esta situación no se presenta; por tanto, podríamos definir el PC como aquel por encima del cual no se produce licuefacción al presurizar, ni gasificación al calentar. Un fluido supercrítico (**FSC**) es aquel que se encuentra por encima de dicho punto.^[9]

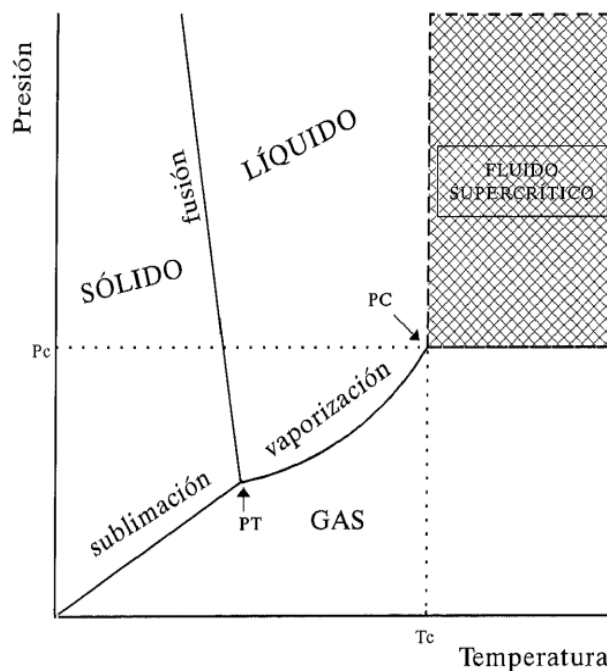


Figura 3. Diagrama de fases sólido-líquido-gas-fluido supercrítico. PT=punto triple, PC=punto crítico, P_c =Presión crítica, T_c =temperatura crítica^[9]

Se define a un fluido supercrítico como aquel que está sometido a condiciones de presión y temperatura por encima del punto crítico, siendo éste el punto designado por una temperatura crítica (T_c) y una presión crítica (P_c), por encima del cual no puede haber una licuefacción al elevar la presión o vaporización al aumentar la temperatura. La Figura 2 representa un diagrama de fases donde se destaca la existencia de la región supercrítica sobre el punto crítico. Tanto el punto triple como el punto crítico son característicos de cada sustancia. La densidad en el punto crítico se denomina densidad crítica (ρ_c). Punto crítico corresponde a las condiciones de temperatura y presión, para gas o vapor, por encima de las cuales la sustancia ya no puede someterse a licuefacción por incremento de presión.

Las características básicas de mayor utilidad de los fluidos supercríticos (**FSC**) se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características generales de los fluidos supercríticos

- No existe interfase gás-líquido
- La compresibilidad isotérmica se hace infinitamente positiva
- La entalpía de vaporización es cero
- Si la densidad se mantiene constante e igual a la densidad crítica la capacidad calorífica a volumen constante tiende al infinito

La región supercrítica también tiene propiedades que la hacen peculiar se enlistan a continuación:

- **Densidad:** La densidad por encima del punto crítico depende básicamente de la presión y la temperatura, pero está más cercana a la de los líquidos que a la de los gases. La densidad aumenta si lo hace la presión a temperatura constante y si disminuye la temperatura a presión constante.
- **Baja viscosidad:** La viscosidad es mucho más baja que la de los líquidos normales, lo que le confiere propiedades hidrodinámicas muy favorables a los líquidos en esa región
- **Muy baja tensión superficial:** Se presenta una bajísima tensión superficial que permite una alta penetrabilidad a través de sólidos porosos y lechos empacados.
- **Alta difusividad:** Se tiene mayores coeficientes de difusión que en líquidos por lo que la transferencia de materia es más favorable.

Adicionalmente las propiedades de la fase líquida y/o vapor son las mismas, es decir no hay diferenciación visible ni medible entre gas y líquido.

La sustancia más empleada es el CO₂ que en estas condiciones presenta baja viscosidad, baja tensión superficial, alto coeficiente de difusión (10 veces más que un líquido normal), que conlleva a un alto contacto con la superficie del material y puede penetrar a pequeños poros y rendijas de este lo que asegura una buena eficiencia en la extracción en un corto tiempo. En la parte final del proceso hay una remoción total del solvente y se realiza a una temperatura baja, se disminuye la pérdida de sustancias volátiles y se evita la formación de sabores y olores extraños.

El CO₂ no es tóxico, ni explosivo, ni incendiario, es bacteriostático y es clasificado por la administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos, FDA (Food and drug administration) por sus siglas en inglés, como GRAS es decir generalmente reconocido como seguro (Generally Recognized As Safe). La temperatura y presión críticas para el CO₂ son P_c 73 bar y T_c 31°C. La Tabla 3 presenta las condiciones críticas de varios de los solventes más utilizados.^[10]

Tabla 3. Condiciones críticas de varios disolventes

Compuesto	CClF ₃	CO ₂	SF ₆	C ₅ H ₁₂	H ₂ O
T _c (°)	28.8	31.1	45.5	196	347.2
P _c (MPa)	21.48	7.20	3.80	3.29	21.48
p _c	0.58	0.47	-	0.23	0.23

Un método analítico de separación, idealmente debería ser rápido, sencillo y barato; debería producir recuperaciones cuantitativas de los analitos sin pérdidas o degradaciones y pocos o nulos productos de desecho.

La densidad del fluido supercrítico es de 100 a 1000 veces mayor que la de un gas y comparable a la de un líquido. En consecuencia, las interacciones moleculares pueden ser fuertes permitiendo acortar las distancias intermoleculares. Como resultado, las propiedades de solvatación son similares a las de los líquidos, pero con viscosidades significativamente más bajas y coeficientes de difusión más altos. Al ser de 10 a 100 veces más bajos los valores de viscosidad y de 10 a 100 veces más altos los coeficientes de difusión respecto a los de los líquidos hacen que la transferencia de masa de solutos en extracciones con FSC sea significativamente más alta que la de extracciones con líquidos, hay que resaltar que la variación de la densidad no es lineal respecto a la variación de temperaturas y presiones sobre el punto crítico.^[10]

Como se observa en la Tabla 4, los fluidos supercríticos poseen unas propiedades físico-químicas intermedias entre las de los líquidos y los gases.

Tabla 4. Propiedades físico-químicas de gases y líquidos en comparación con las del dióxido de carbono supercrítico

		Densidad (g/mL)	Viscosidad (g/cm ³)	Coefficiente de Difusión (cm/s)
Gases		(0.1-2)10 ⁻³	(1-3)10 ⁻⁴	0.1-.04
CO ₂ SC	T _c , P _c	0.47	3x10 ⁻⁴	7x10 ⁻⁴
	T _c , 6P _c	1	1x10 ⁻³	2x10 ⁻⁴
Líquidos		0.6-1.6	(0.2-3) 10 ⁻²	(0.2-2) 10 ⁻⁵

A mediados de la década de los ochenta se empezaron a utilizar los fluidos para la separación de analitos de la matriz de muchas muestras para la industria debido a que este tipo de sustancias evita muchos problemas. En la Tabla 5 se describen las ventajas de la extracción con fluidos supercríticos (**SFE**) en comparación con otros tipos de extracción.

Tabla 5. Ventajas de la extracción con FSC

- Menores tiempos de extracción, la velocidad de transferencia de masa entre la matriz de la muestra y el fluido de extracción (de 10 a 60 min.)
- El poder disolvente de la **SFE**
- Las recuperaciones de los analitos son sencillas
- Uso, generalmente, de un fluido no tóxico, no inflamable o no corrosivo.
- Extracción a temperaturas sin afectación de compuestos termolábiles.
- Fácil separación de los solutos del fluido supercrítico. Esto no es posible en las extracciones convencionales, ya que en muchos casos, se crean contaminaciones indeseables del producto.
- Alta pureza del disolvente
- Posibilidad de realizar fraccionamientos.
- Posibilidad de seleccionar el tipo de extracción eligiendo la polaridad del fluido, su densidad y la utilización o no de modificadores.
- Bajo coste del disolvente, algunos fluidos son baratos, inertes y no tóxicos se les puede eliminar fácilmente dejándolos a temperatura ambiente

La extracción con fluidos supercríticos es una técnica que estudia las propiedades solvatantes de un fluido por encima de su punto crítico. La habilidad de un fluido supercrítico para solubilizar sólidos. Sin embargo, hasta los años cincuenta no aparecen estudios sobre aplicaciones industriales, su empleo para eliminar las fracciones ligeras del residuo de la destilación del crudo, surge a partir de la década de los setentas.^[10]

Las ventajas de la extracción con fluidos supercríticos provienen de las propiedades antes comentadas y de la compresibilidad. Los grandes cambios de densidad del fluido y, en consecuencia, el poder de solvatación (Tabla 6), pueden ser realizados mediante pequeños cambios en la presión a temperatura constante al haber una gran compresibilidad si se trabaja a temperaturas próximas a la crítica.^[10]

Al depender la fuerza solvatante de un fluido supercrítico de su densidad, la posibilidad de solvatación de un fluido supercrítico hacia una sustancia en particular puede ser modificada fácilmente cambiando la presión de extracción y, en menor medida, la temperatura. Esto hace que la extracción con fluidos supercríticos sea selectiva. Además, con la propiedad de que la transferencia de masa está mejorada, el uso de la extracción con fluidos supercríticos proporciona tiempos de extracción más breves y una eficiencia de extracción mejorada por una mejor penetración en la matriz, el poder de disolver de un fluido supercrítico no podía ser explicado exclusivamente desde el aumento de densidad.^[10]

Tabla 6. El poder para disolver de los FSC depende de dos efectos

- Efecto de estado, que depende del estado físico del fluido supercrítico y su principal variable es la densidad.
- Efecto químico, que define la interacción entre el fluido supercrítico y el soluto. Es diferente para cada soluto y depende de su polaridad, propiedades ácido-básicas y de la formación de puentes de hidrógeno.

En general, un incremento de la presión a temperatura constante produce un incremento en la solubilidad del compuesto, pero disminuye la selectividad.^[10] El efecto de la temperatura sobre la solubilidad es más complejo, ya que ésta puede aumentar, disminuir o permanecer invariable con el aumento de temperatura a presión constante. Este comportamiento viene dado por un factor predominante, que puede ser la presión de vapor del soluto o la densidad del disolvente.

A bajas presiones, la solubilidad disminuye ligeramente con el aumento de temperatura; a altas presiones, aumenta marcadamente. En la Tabla 6 se indican dos efectos de los que depende el poder para disolver de los FSC, el primer efecto se debe a la disminución de la densidad, el segundo se debe a que hay un importante aumento de la presión de vapor del soluto frente a la pequeña variación de la densidad del disolvente en esta zona de altas presiones. Con una densidad determinada, la solubilidad aumenta con la temperatura. La estructura química del soluto también es un factor para tener en cuenta a la hora de mejorar su selectividad.

Algunos factores que aumentan y disminuyen la solubilidad un FSC se presentan en la Tabla 7, de modo esquemático se pueden citar los siguientes grupos funcionales de los solutos y su efecto beneficioso o adverso sobre su solubilidad en CO₂ SC:

Tabla 7. Factores que aumentan y disminuyen la solubilidad de un FSC

Aumentan la solubilidad:	Disminuyen la solubilidad:
<ul style="list-style-type: none">• Saturaciones• Ramificaciones• Esterificaciones	<ul style="list-style-type: none">• Aromaticidad• Hidroxilos• Carboxilos• Aumento del Peso Molecular• Aminas• Halógenos• Nitroderivados

Normalmente, el fluido supercrítico es utilizado a una temperatura poco mayor a su temperatura crítica y a una presión significativamente mayor a su presión. Se ha estudiado una gran variedad de fluidos supercríticos para la extracción que cubre un amplio rango de temperatura y presión críticas, pesos moleculares y polaridad.^[9] Sin embargo para la elección de un fluido supercrítico se debe de tomar en cuenta las propiedades descritas en la Tabla 8.

Tabla 8. Elección de un fluido supercrítico

- La polaridad del soluto
- Poder disolvente y selectividad requeridos
- Estabilidad térmica del compuesto a extraer a la temperatura de operación
- Limitaciones instrumentales, asociadas a la P_c de algunos fluidos
- Toxicidad del fluido supercrítico

El dióxido de carbono es el más usado por tener una presión crítica moderada (7,2 MPa o 1044.27144 psi) y baja temperatura crítica (31°C), siendo de elección para la extracción de compuestos termolábiles. Sin embargo, el CO₂ también tiene sus limitaciones, sobre todo para la extracción de compuestos polares.

Actualmente, un tema de gran interés es la correlación y predicción de equilibrios de fases a alta presión. Aunque de la misma forma que para los equilibrios líquido-líquido y líquido-sólido, para los sistemas ternarios o más complejos se comprueba que los FSC son disolventes específicos que permiten realizar una extracción selectiva o un fraccionamiento.

La Tabla 9 enlista una serie de FSC usuales con sus ventajas e inconvenientes, el agua no es usada por las dificultades técnicas que supone trabajar a presiones por encima de su punto crítico. Podemos observar que el CO₂ SC presenta mayores ventajas para utilizarse como medio alterno de reacción, en relación con otros FSC.

Tabla 9. Ventajas y desventajas de los FSC más comúnmente utilizados

Propiedades	Inorgánicos				Orgánicos		
	CO ₂	NH ₃	H ₂ O ^a	N ₂ O	CFCs	HC	Alcoholes
Toxicidad	V	D	V		V	V	D
Inflamabilidad	V	D	V		V	D	D
Coste	V	D	V		V	V	D
Reactividad	V	D	D	D	V	V	D
Facilidad de alcanzar condiciones supercríticas	V	D	D	V	V	V	D
Agresividad ambiental	V		V		D		
Gas en condiciones ambientales	V		D	V	V	V	D
Compatibilidad con detectores	V					D	
Polaridad	D	D		V	V	D	V

^a En la práctica no se usa como fluido supercrítico.

CFCs = clorofluorocarbonos; HC= hidrocarburos V = ventaja; D = desventaja

2.1.2.1.1 Bióxido de Carbono Supercrítico

El bióxido de carbono es el más apropiado para usarse como disolvente en la extracción con fluidos supercríticos. Sus condiciones críticas son 31.1°C (304.2 K) y 72.8 bar las cuales lo hacen muy atractivo para la extracción de compuestos termolábiles, Figura 4. ^[10]

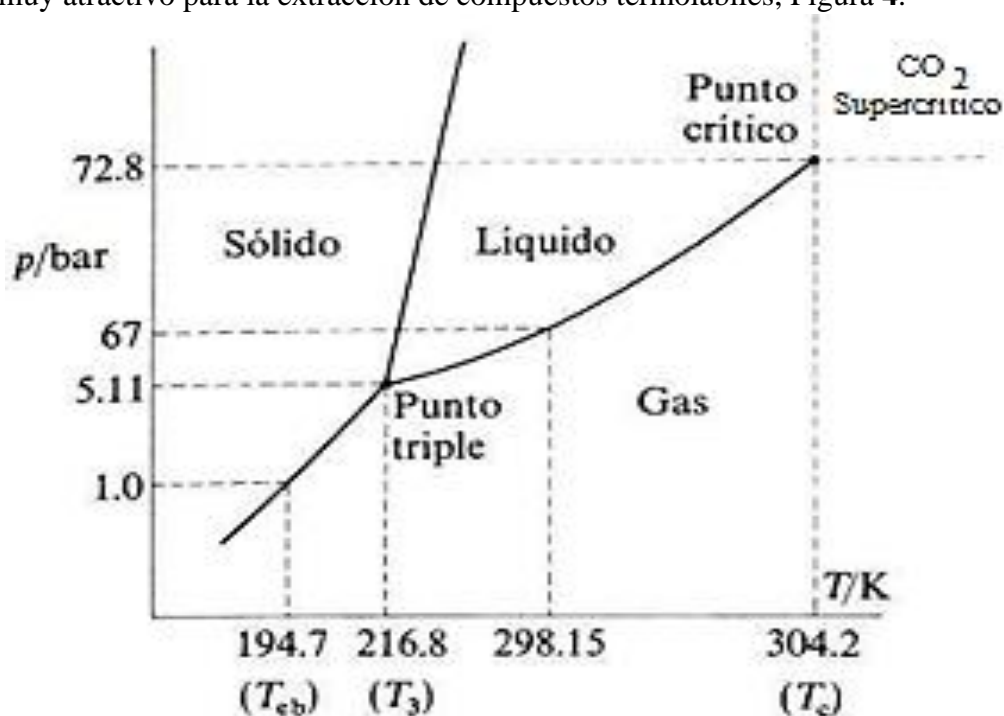


Figura 4. Diagrama de fases del bióxido de carbono ^[10]

Adicionalmente es un disolvente inerte, no inflamable, no explosivo, sin olor ni color y no es costoso. Su alta densidad hace que la tasa de extracción sea mayor que la de métodos convencionales como la extracción por arrastre de vapor o hidroextracción.

La solubilidad es uno de los parámetros termofísicos más importantes en la aplicación de la tecnología de fluidos supercríticos en los procesos de extracción supercrítica utilizando CO₂. En general, la solubilidad depende de la temperatura y la presión del sistema, además de la naturaleza química del soluto, así como las propiedades fisicoquímicas como el peso molecular, polaridad y la presión de vapor de los solutos; los cuales están relacionados con las interacciones intermoleculares.^[9]

La extracción requiere condiciones de presión y temperatura máximas. La temperatura máxima de operación generalmente dependerá de las propiedades fisicoquímicas del sustrato a extraer, mientras la presión máxima de operación vendrá limitada por el diseño del equipo extractor.^[9]

Aquí, el CO₂ tiene más ventajas sobre otros disolventes gaseosos o líquidos por las causas citadas anteriormente. El CO₂ SC es preferible al líquido ya que las sustancias a ser extraídas son mucho más solubles, la relación de extracción sería de 2,5 veces más alta dada la mayor difusividad en las condiciones supercríticas, además hay un mayor rango de posibles temperaturas para operar.

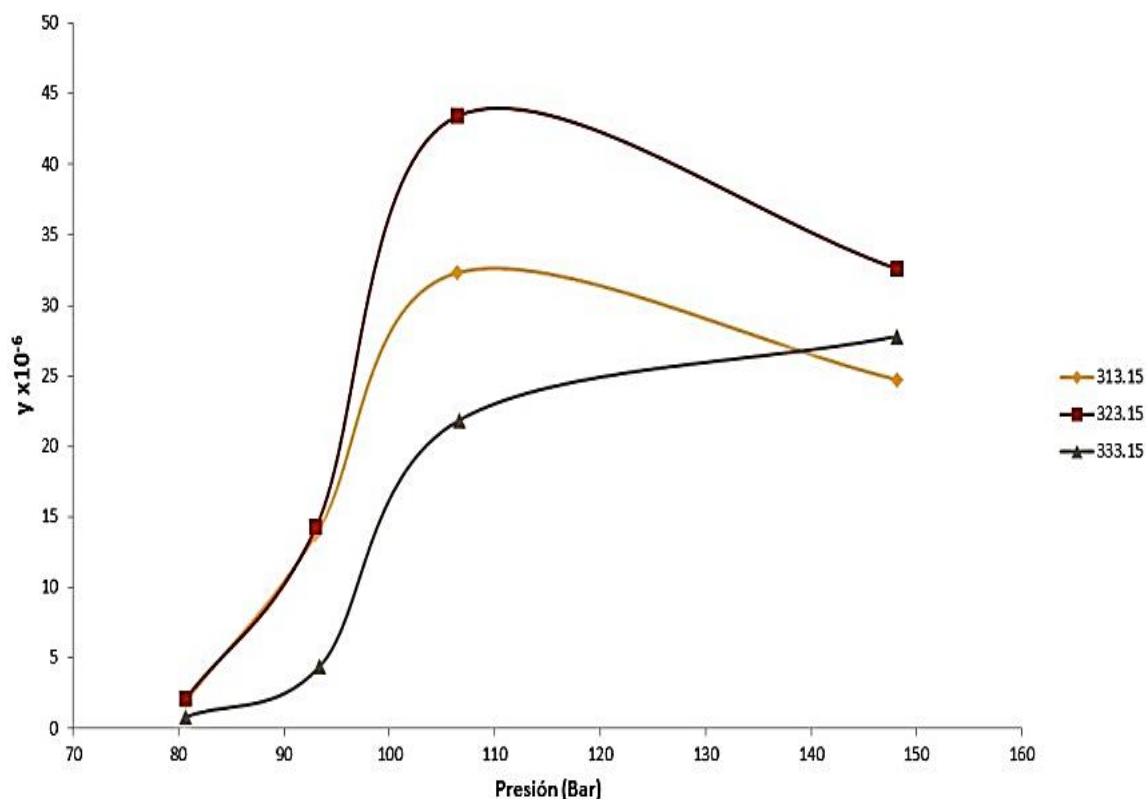


Figura 5. Gráfico del estudio de la extracción de la perezona en CO₂ ^[11]

Se decidió utilizar el bióxido de carbono como fluido supercrítico y de acuerdo con el isoterma Figura 5,¹ donde se indica los isotermas de solubilidad de la perezona en bióxido de

carbono a 313.15, 323.15 y 333.15 K, donde se observa que por arriba de los 106 bar se presenta una zona de saturación, en la cual a pesar de que se aumente la presión, la solubilidad de la perezona no se ve aumentada,^[11] con lo que posteriormente obtienen las condiciones de temperatura y presión para elaborar los experimentos de extracción con CO₂ SC.

Aplicación de la extracción con CO₂ SC, algunos investigadores realizan experiencias utilizando patrones de compuestos o mezclas de éstos, sin embargo, Nilsson y Hudson (1993) resaltan que los datos obtenidos de esta manera poseen un bajo valor predictivo para un posterior estudio con mezclas complejas,^[10] siendo entonces muy necesario realizar las experiencias con muestras reales desde un principio. Por lo que se tomaron las condiciones de estudio de la extracción de la perezona en CO₂SC (Figura 6), “Gráfico de cinéticas de la solubilidad de perezona en CO₂ SC”.^[11]

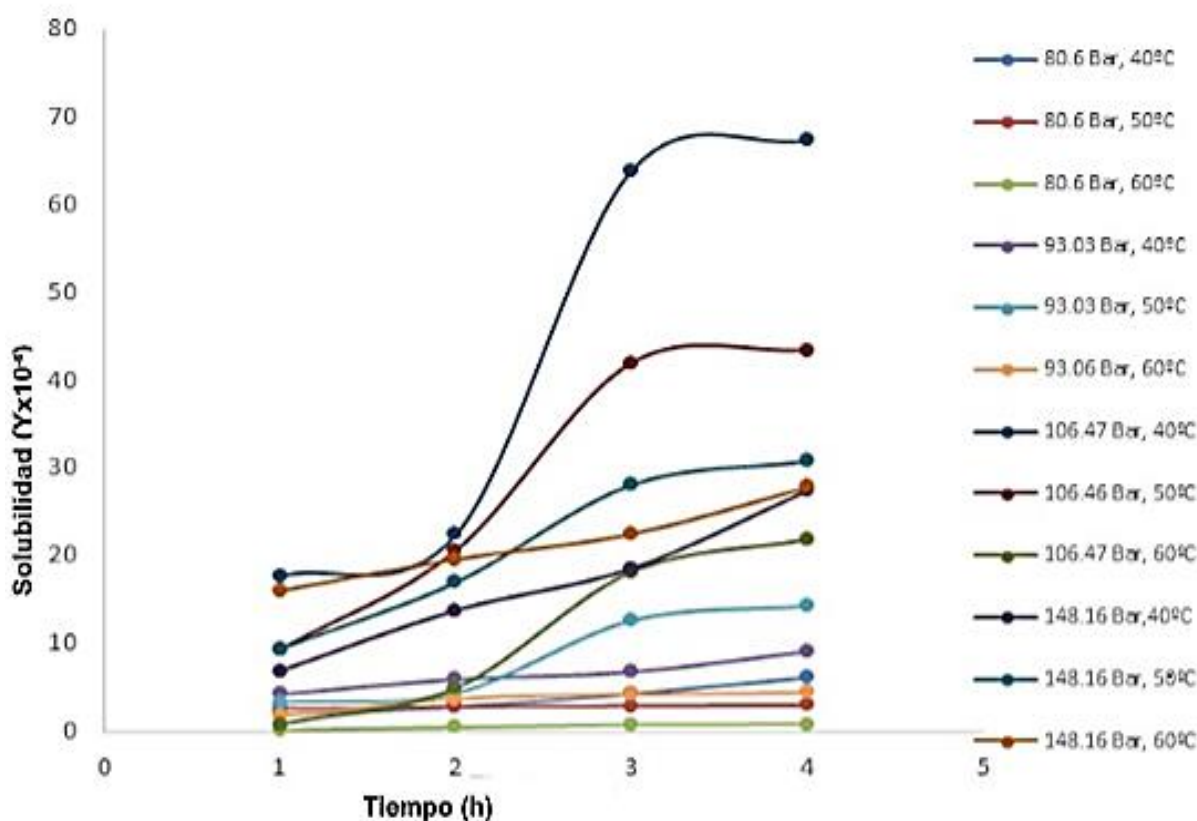


Figura 6. Gráfico de cinéticas de la solubilidad de perezona en CO₂ SC^[11]

En la Figura 6, los resultados refieren una tendencia asintótica, estableciendo de esta manera que al tiempo de 4 h ya se ha logrado el equilibrio de solubilidad de la perezona en el CO₂ SC por lo que el uso de este tiempo resulta adecuado en el momento de establecer las condiciones de solubilidad.

Es importante señalar que la buena solubilidad presentada por la perezona en el dióxido de carbono supercrítico es una consecuencia de la naturaleza no polar del fluido, así mismo este último puede cambiar a ligeramente polar debido a la existencia de un momento cuadrupolar.

n este sentido el dióxido de carbono supercrítico ha sido considerado como un disolvente hidrofóbico con una polaridad equiparable a la del *n*-hexano, siendo este último el disolvente ideal para la extracción de la perezona.^[11]

Una vez establecidas las condiciones de máxima solubilidad de la perezona en el fluido, bióxido de carbono supercrítico como se muestra en la Figura 6 (106.460 Bar, 50°C) y determinando 4 h como un tiempo mínimo para el establecimiento del equilibrio, se procedió a realizar el estudio con el espécimen vegetal.

2.1.3 Métodos Alternos de Activación

Algunos de los procesos que pueden implementarse mediante la química verde son la extracción y la síntesis de productos, que permiten mediante las condiciones adecuadas reducir los requerimientos energéticos e incrementar la eficiencia de los procesos, con la catálisis y el diseño de sustancias químicas seguras.^[12] En la industria química, el uso de rutas alternativas para la síntesis química es común para reducir la emisión de sustancias contaminantes al ambiente y con ello mejorar la calidad de vida de las personas a las que les afecta. Al respecto, de lo antes comentado debe resaltarse la vinculación de lo dicho con el **Principio 6** de la QV.

Con respecto al tratamiento térmico clásico que implica el uso regularmente de mantilla de calentamiento a reflujo, considerando el **Principio 6** actualmente se han generado diferentes métodos alternos de activación, como lo son microondas el cual es un tipo de excitación rotacional, el infrarrojo en donde la excitación es debido a la deformación del enlace molecular, el ultravioleta, el visible, y la radiofrecuencia, entre otros. Es necesario resaltar que el fundamento de estos métodos es debido a que las moléculas absorben energía de una radiación electromagnética y que en consecuencia se manifiestan varios tipos de excitación, Tabla 10.^[12]

Tabla 10. Energías de activación y tipo de excitación

Región	λ	E de excitación (Kcal/mol)	Tipo de excitación
Rayos Cósmicos Rayos γ Rayos X	< 100 nm	+ >286	Transformaciones nucleares, Ionización de moléculas
Ultravioleta	100-350 nm	286-82	Electrónica
Visible	350-800 nm	82-36	Electrónica
Infrarrojo	0.8-300 μ m	36-0.1	Deformaciones de enlace
Microondas	1 cm	10^{-4}	Rotacional
Radiofrecuencia	Metros	10^{-6}	Transiciones de spin nuclear y electrónico

Otros métodos alternos de activación alterna a la **MC** son la mecanoquímica (**MQ**), y el ultrasonido (**US**), alternativas energéticamente eficientes que evitan el uso de grandes cantidades de disolventes.

2.1.3.1 Tratamiento Térmico

Tradicionalmente las reacciones químicas que necesitan calor para que se produzcan se realizan mediante calentamiento térmico convencional, donde los reactivos son activados lentamente mediante una fuente de calor tradicional externa (placa o manta calefactora); son métodos lentos y poco eficientes para transferir la energía al sistema. Aunque una reacción sea exotérmica, regularmente hay que proporcionar energía al sistema para que se realice el proceso y en un momento dado se aumenta la rapidez de reacción.^[13]

La rapidez de una reacción química depende de diferentes factores, como son la naturaleza de las sustancias que reaccionan, la concentración de estas. En concreto, la rapidez de una reacción aumenta cuando se incrementa la temperatura, puesto que se provocan más “choques efectivos” entre las moléculas reaccionantes como consecuencia del incremento de la energía de las moléculas. Como media, un aumento de 10 °C en la temperatura duplica la rapidez de la reacción.^[13]

En un proceso de calentamiento tradicional el calor pasa de fuera del recipiente hacia el interior de forma que la temperatura más elevada se encuentra en la zona cercana a las paredes (más cercana a la fuente de calor) y se va difundiendo hacia la disolución y los reactivos. Figura 7.

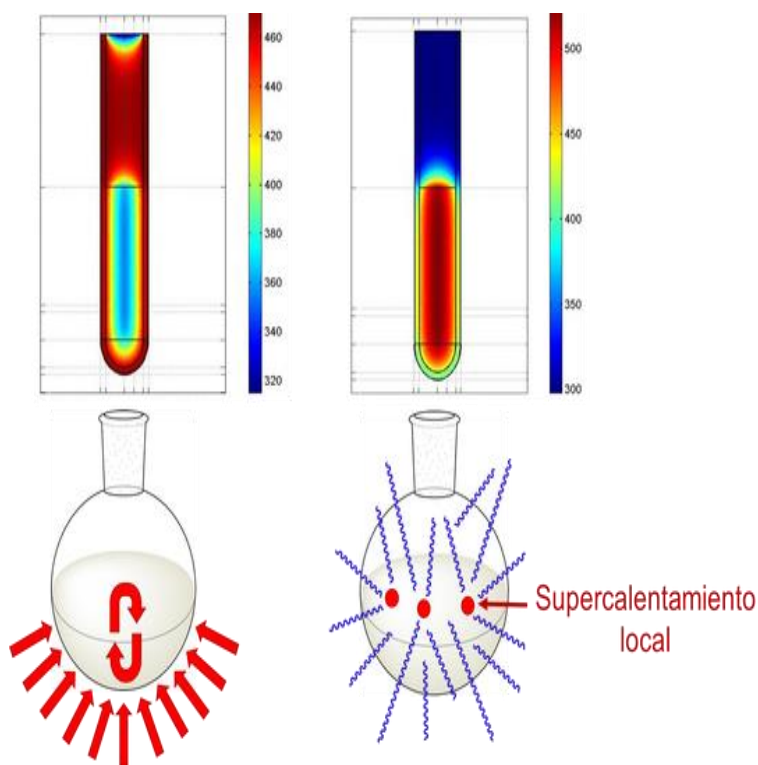


Figura 7. Gradiente de temperatura del calentamiento convencional^[13]

2.1.3.2 Ultrasonido

El ultrasonido son ondas mecánicas longitudinales (son ondas sonoras y no se propaga en el vacío), forman parte del espectro del sonido^[14] (Figura 8), cuya frecuencia está por encima del espectro audible del oído humano aproximadamente 20 000 Hz.

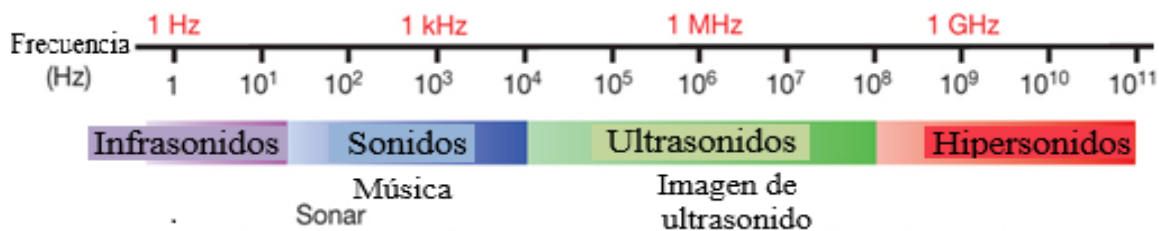


Figura 8. Espectro de frecuencias de ondas sonoras^[15]

Tabla 11. Rango de frecuencias del ultrasonido

20 kHz – 100 kHz	• Poder del ultrasonido convencional
20 kHz – 2 MHz	• Rango para la sonoquímica
5 MHz – 10 MHz	• Ultrasonido de diagnóstico

Las frecuencias ultrasónicas señaladas en la Tabla 11, tienen un campo de aplicación relativamente grande.^[14] Poseen longitudes de onda comprendidas entre los 10 centímetros y una centésima de milímetro. Los factores que intervienen para su aplicación son: la frecuencia, potencia radiada, la duración de su radiación, la velocidad de desplazamiento en el medio y los efectos sobre el medio, la reflexión, dispersión y difracción de estas ondas cuando inciden o atraviesan un medio.^[16] Hay que mencionar que la radiación acústica es la energía mecánica que se transforma en energía térmica.^[12]

La sonoquímica es una rama de la química que estudia la capacidad de la energía transportada por las ondas sonoras para provocar y acelerar reacciones químicas. A diferencia de los procesos fotoquímicos, esa energía no se desorbe por las moléculas, debido al rango extenso de frecuencias de la cavitación, muchas reacciones no son reproducibles, por lo tanto, cada publicación relacionada con el US generalmente contiene la explicación detallada del equipo (dimensiones, frecuencia de intensidad del US, etc.,).^[16]

Utilizan ondas de presión de ultrasonido. Una onda de presión de ultrasonido cuya frecuencia de vibración es superior a la capacidad auditiva del ser humano.

Los efectos químicos producidos por el US son derivados de la creación, expansión y destrucción de burbujas pequeñas que aparecen cuando el líquido se está irradiando por US. Este fenómeno, llamado “cavitación” Creación de burbujas de cavitación estables y transitorias se observan en la Figura 9, genera temperaturas altas presiones en los puntos definidos dentro del líquido.^[16]

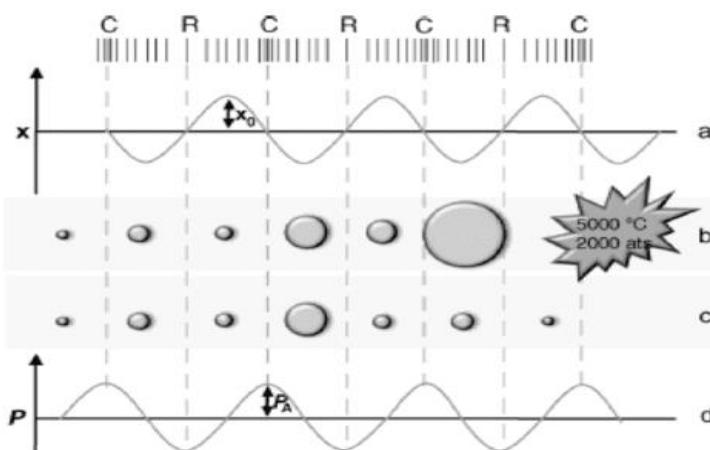


Figura 9. Ciclo de cavitación. a) Desplazamiento, b) Cavitación transitoria, c) Cavitación estable, d) Presión^[16]

El ultrasonido genera, a su vez, vibraciones en el material objetivo. Si contiene líquidos, se generarán millones de burbujas microscópicas, las cuales sufren rapidísimos procesos de expansión y colapso que pueden transmitir su energía a otros materiales. Este fenómeno se llama cavitación y puede ser incrementado añadiendo al medio pequeñísimas esferas de vidrio.^[16]

Los fenómenos complejos de cavitación gaseosa, explican la generación y evolución de microburbujas en un medio líquido. La cavitación se produce en aquellas regiones de un líquido que se encuentra sometida a presiones de alta amplitud que alternan rápidamente. Durante la mitad negativa del ciclo de presión, el líquido se encuentra sometido a un esfuerzo tensional y durante la mitad positiva del ciclo experimenta una compresión.

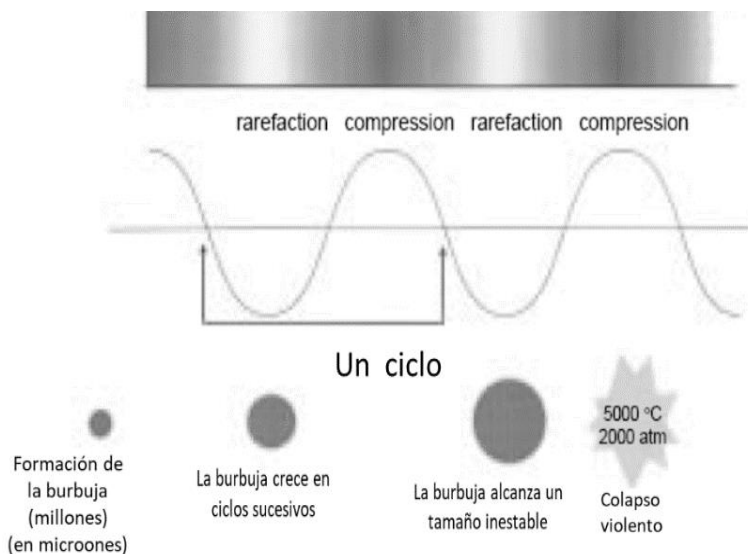


Figura 10. Ciclo de presión [14]

Las microburbujas que alcanzan un tamaño crítico implosionan o colapsan violentamente para volver al tamaño original (Figura 11) la implosión supone la liberación de toda la energía acumulada, ocasionando incrementos de temperatura instantáneos y focales, que se disipan sin que supongan una elevación sustancial de la temperatura del líquido tratado. Sin embargo, la energía liberada, así como el choque mecánico asociado al fenómeno de implosión, afecta la estructura de las células situadas en el microentorno. Se considera que, dependiendo de la frecuencia empleada y la longitud de las ondas de sonido, se pueden generar diferentes cambios físicos, químicos y bioquímicos que pueden emplearse en un sinnúmero de aplicaciones en el campo industrial. [17]

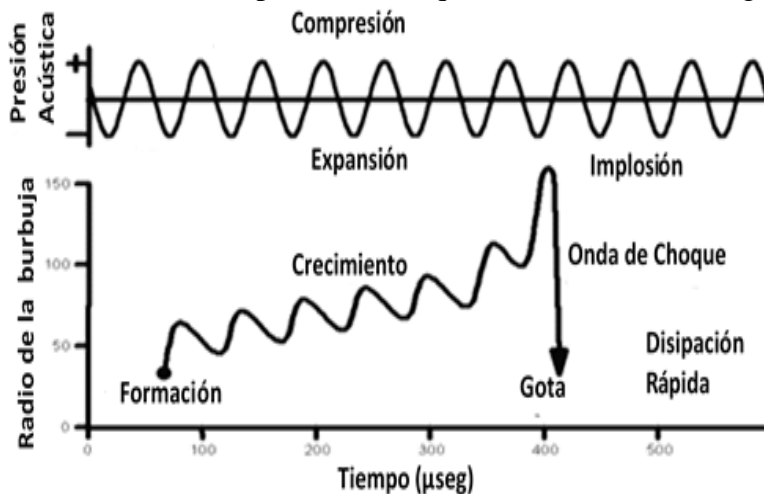


Figura 11. Ciclo de crecimiento de la burbuja y desarrollo de la cavitación [14]

Las burbujas en la región de mayor intensidad de cavitación se sometieron a un movimiento transitorio, mientras que las burbujas de la región de intensidad de más baja cavitación se sometieron a movimiento estable/oscilatorio. El colapso transitorio de las burbujas que da lugar a la temperatura y presión. [17]

La sonicación es la agitación mediante ultrasonidos. Una corriente eléctrica transmite su energía a un sistema mecánico que la convertirá en vibraciones de alta intensidad que generan ondas de ultrasonido. El fundamento para la generación de US se basa en la deformación

elástica de materiales ferroeléctricos, dentro de un campo eléctrico de alta frecuencia y es causada por la mutua atracción de moléculas polarizadas en el campo. Para la polarización de las moléculas se debe transmitir una frecuencia alternante mediante dos electrodos hasta el material ferroeléctrico. Después se obtiene la conversión a oscilación mecánica y el sonido puede ser transmitido a un amplificador para finalmente transmitirse al medio. El ultrasonido es generado por una corriente eléctrica que se transforma mediante transductores, los más empleados son: transductores conducidos por líquidos, de magneto rígido y piezoeléctricos, estos últimos transductores son los más empleados para la generación de sonido y tienen cerca del 95% de eficiencia y pueden operar en todo el intervalo ultrasónico.^[16]

El sonicador es el dispositivo que transforma la energía eléctrica en energía mecánica. Este equipo genera ondas ultrasónicas por la oscilación de los transductores piezoeléctricos con una frecuencia aproximada de 20 kHz. En general, un aparato de ultrasonido incluye un recipiente, lleno de agua, que puede transmitir las ondas que se emiten por los transductores.^[17] Los sonicadores se utilizan en muchos campos, por ejemplo, para romper las paredes celulares (fragmentación subcelular) o en la limpieza de material de laboratorio químico para eliminar las partículas depositadas sobre los objetos de vidrio o cerámica. Otras aplicaciones típicas incluyen los procesos de mezcla, homogeneización y desintegración.^[16]

La aplicación de las ondas ultrasónicas impone la utilización de una energía limpia, no contaminante. Actualmente es considerada una técnica de procesamiento Verde, debido a que típicamente emplea menos tiempo, agua y energía, algunas otras ventajas se enlistan en la Tabla 12.^[12]

Tabla 12. Ventajas del Ultrasonido

- Efectiva contra células vegetativas, esporas y enzimas
- Reducción de los tiempos y temperaturas de proceso
- Pocos requerimientos de adaptación en plantas ya establecidas
- Incrementos de los fenómenos de transferencia de calor
- Puede emplearse en procesos continuos o intermitentes
- Efecto sobre la actividad enzimática

La influencia de varios factores para el éxito de la aplicación del US puede ser resumida de la manera siguiente:^[17]

Frecuencia. El aumento de la frecuencia lleva al descenso de la producción e intensidad de la cavitación en los líquidos. Este hecho puede ser explicado así: en las frecuencias altas, el tiempo necesario para que una burbuja que aparece como resultado de la cavitación crezca hasta un tamaño suficiente para afectar la fase líquida es demasiado pequeño.

Disolvente. La cavitación produce efectos considerablemente menores en los líquidos viscosos o éstos con tensiones superficiales más altas.

Temperatura. El aumento de la temperatura permite llevar a cabo la cavitación a intensidades acústicas más bajas. Eso es una consecuencia del aumento de la presión de vapor del disolvente con el aumento de la temperatura.

Intensidad. En general, el aumento de la intensidad del US fortalece los efectos producidos.

El ultrasonido hace uso de fenómenos físicos y químicos que son fundamentalmente diferentes a los que se aplican convencionalmente en las técnicas de extracción, procesamiento y conservación. Ofrece ventajas en términos de productividad, rendimiento y selectividad, ya que se obtienen mejores tiempos de proceso, mejora la calidad, reduce riesgos químicos y físicos y se considera ambientalmente amigable.

2.2 Perezona

La perezona Figura 1 (pág. 2) es considerada el primer metabolito secundario aislado de forma cristalina en el nuevo mundo, por el Dr. Leopoldo Rio de la Loza,^[1] ésta también es nombrada ácido pipitzaico, es una quinona sesquiterpénica generalmente se obtiene mediante la extracción con *n*-hexano por calentamiento a reflujo, de la raíz del espécimen vegetal llamado “pipitzaahuac” por la medicina tradicional indígena, en el código Badiano de la Cruz que le atribuye un gran número de propiedades biológicas.^[1,2,3]

En la medicina tradicional mexicana se utilizaba el extracto de perezona para el tratamiento de varias enfermedades. Francisco Hernández señala su uso como purgante para el tratamiento de la fiebre entre otros. Máximo Martínez menciona su uso como astringente, regenerativo, diurético y analgésico entre otras (ver Tabla 13). En el código florentino Shagún indica que la raíz de *Perezia* (actualmente *Acourtia*) se utilizaba para el tratamiento de enfermedades respiratorias.^[4]

Las raíces leñosas de varias especies de *Acourtia* han sido utilizadas desde tiempos prehispánicos de los grupos étnicos mexicanos para preparar una bebida laxante. El compuesto activo se aisló de las raíces de *Acourtia* hace más de un siglo (1852) y fue nombrado ácido pipitzaico.^[17] Estudios demostraron que este compuesto es una quinona sesquiterpénica que hoy se conoce como perezona. La fórmula estructural de este compuesto se muestra en la Figura 1, posee las propiedades de una quinona: es una sustancia cristalina con un color naranja intenso; se reduce fácilmente, reoxidiza espontáneamente y produce derivados de amino (Josep-Nathan and Santillán 1986).^[18]

Tabla 13. Otras propiedades curativas

- Antihelmíntico.- Infusión de la raíz de para expulsar parásitos intestinales, en bebida.
- Hemorroides.- Infusión de la raíz para lavados.
- Laxante.- Infusión de la raíz tiene acción laxante en bebida.

La perezona es una quinona de estructura sesquiterpénica distribuida ampliamente en el producto natural perteneciente al género *Acourtia*. Por su importancia en la medicina tradicional mexicana, en los últimos años se han descubierto más propiedades farmacológicas

lo que ha llamado la atención de los investigadores hacia el desarrollo de nuevos derivados buscando potencializar o modular propiedades biológicas de dicho compuesto.^[2, 3]

Debido a que la prevención del cáncer a través de productos naturales ha recibido una atención considerable ahora se conoce el efecto citotóxico de la perezona, actualmente ha sido probada en líneas celulares cancerosas de mama, útero y leucemia humana K562, obteniendo excelentes resultados, mostrando actividad apoptótica.^[19] Por otro lado, en la literatura se ha establecido una relación entre la estructura con grupos o fragmentos altamente electrofílicos y la actividad biológica sobre proteínas, ácidos nucleídos y otros metabolitos con los grupos nucleofílicos que estas moléculas presentan, además se conocen alrededor de 266 fármacos generados a partir de moléculas naturales que presentan grupos electrofílicos tales como receptores de Michael, estructuras tensionadas, ésteres, carbamatos, entre otros, lo anterior nos permite establecer una relación entre el carácter electrofílico y una posible función biológica.^[19]

La perezona también se puede usar como pigmento y puede formar compuestos coordinados con metales para producir otros pigmentos de diferentes colores. Además, puede ser utilizada como agente antimicrobiano.^[20]

2.2.1 *Distribución y Descripción del Género Acourtia*

Taxonómica geográficamente la distribución de *Acourtia* se extiende hacia la sección norteamericana, desde la región costera del sur de California hasta la República del Salvador y hacia el este hasta el centro de Texas, la mayor parte de esta sección está restringida a las pendientes medias y altas de la Sierra Madre Mexicana y al altiplano de la región montañosa en el centro y norte de México.^[4, 20]

Las especies *Acourtia* son erectas, en su mayoría glabras o puntillas resinosas, perennes caulescentes, siempre con la base del tallo más o menos oxidado-lanoso, en su mayor parte de 1-1.5 m de altura y robusto, a veces varios tallos frondosos debajo de la inflorescencia poliforme o bráctea terminal, a veces no ramificados y terminados por una sola cabeza grande, se alternan, en su mayoría sésiles, generalmente amplias y delgadas, hasta rígidas y gruesas coráceas; cabezas homógamas, a menudo aglomeradas, con 4-60 flores; corolas homomorfas, en su mayoría color lavanda-rosa y glabros, raíces fibrosas y a veces tuberiforme.^[4,20] Se distinguen por tener flores con una cabeza, el diente exterior del labio de la corola existe en flores marginales.^[4]

Es importante resaltar que el género *Acourtia*, anteriormente *Perezia* fue reestablecido por L. Reveal y Robert M. King,^[21] debido a que en 1973 reevaluaron las diferencias seccionales de la clasificación del género. Y las especies de Norteamérica caracterizadas por sus troncos

frondosos fueron asignadas a la sección *Acourtia*. La cual posteriormente fue establecida como un género propio.^[4]

A continuación, se presenta un ejemplo en concreto de la reasignación de la especie tratada más adelante.

“Acourtia platyphylla: (A. Gray) Reveal & King, comb. nov., based on Perezia phatyphylla A. Gray.”^[21]

2.2.2 **Producción de Perezona**

A pesar de sus aplicaciones potenciales, no ha sido posible aislar la perezona de en cantidades adecuadas para producción industrial porque:

1. Las poblaciones naturales son muy pequeñas y en muchos lugares se encuentran en proceso de extinción.
2. Varios intentos de cultivo por métodos agrícolas tradicionales no han tenido éxito.

Otra alternativa que se ha explorado para la adecuada producción de perezona es el establecimiento de células genéticamente transformadas o por cultivo de órganos.^[4, 20]

Por ello la importancia de encontrar la manera de obtener un mayor rendimiento en las extracciones con el empleo de diferentes métodos, para aprovechar al máximo este recurso.

En el presente trabajo se utilizó el ultrasonido como método de activación alterna y un medio alternativo de extracción como los fluidos supercríticos: particularmente el bióxido de carbono supercrítico, con el propósito de realizar un estudio comparativo en contra del método convencional de extracción térmica a reflujo y con ello proponer una alternativa basándonos en la QV.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar la extracción de perezona del espécimen *Acourtia platyphylla*, mediante un estudio comparativo entre, el método de calentamiento clásico, ultrasonido y bióxido de carbono supercrítico, contribuyendo de esta manera al acervo de la química verde y de la perezona.

3.2 Objetivos Particulares

- Extraer selectivamente perezona de la raíz de *Acourtia platyphylla* empleando y comparando la eficiencia del ultrasonido y bióxido de carbono supercrítico, además del método convencional de calentamiento.
- Identificar la perezona con métodos espectroscópicos convencionales como Espectrometría de Masas y Resonancia Magnética Nuclear de protón.
- Cuantificar la perezona mediante Resonancia Magnética Nuclear de protón.
- Encontrar las condiciones adecuadas de tiempo, temperatura y presión, en cada método evaluado.

Con los datos del punto anterior hacer un estudio comparativo con la finalidad de encontrar el mayor rendimiento y selectividad en la extracción para determinar el mejor método.

4 HIPÓTESIS

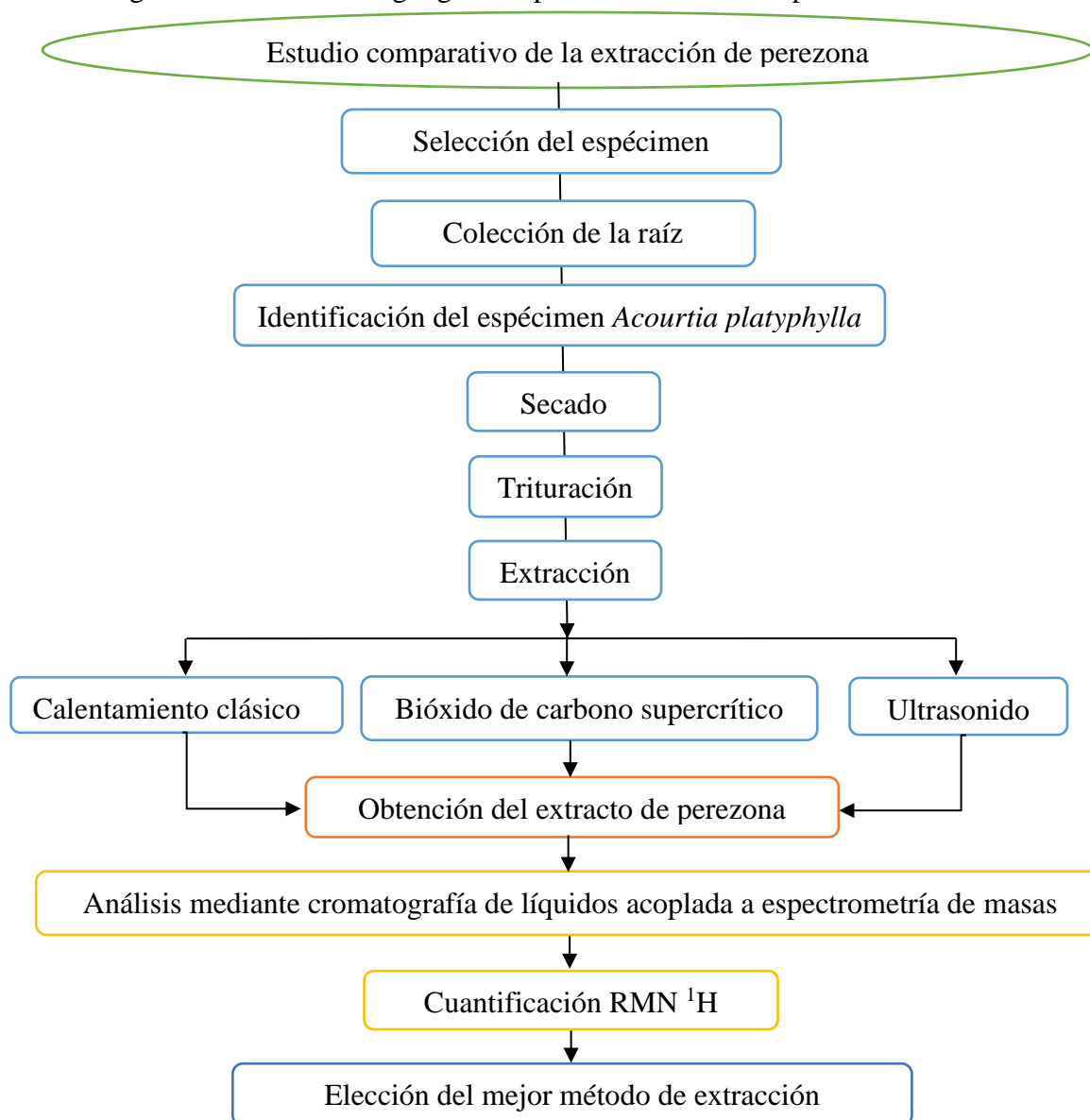
Un medio alternativo de extracción como el bióxido de carbono supercrítico y un método alternativo de activación como las ondas mecánicas presentes en el ultrasonido, han demostrado efectividad en las extracciones y reacciones químicas de diversos metabolitos secundarios.

Por ende, si se estudia comparativamente al método convencional (mantilla de calentamiento a reflujo), el ultrasonido y el bióxido de carbono supercrítico en la extracción de perezona, de un espécimen vegetal del género *Acourtia*, se podría obtener el método que genere un mejor “rendimiento” y una mejor selectividad.

5 PARTE EXPERIMENTAL

La materia prima objeto principal de este proyecto es la "raíz de *Acourtia platyphylla*" la cual se sometió a diversos procedimientos extractivos, los cuales se describen en la Figura 12 para obtener un extracto el cual contiene la perezona, siendo esta uno de los metabolitos que se puede obtener de la raíz, lo anterior se realizó con fines de cuantificar la extracción empleando diferentes métodos de energías alternas a la convencional, para poder encontrar el sistema más adecuado para la extracción y que este acorde con los principios de la química verde.

Figura 12. Diagrama de la metodología general para la extracción de perezona



5.1 Recolección e Identificación del Especimen Vegetal

La recolección del espécimen *Acourtia platyphylla* se llevó a cabo en noviembre 2015, en el Estado de México, en la sierra de Guadalupe del Municipio Coacalco de Berriozábal en las coordenadas: ladera oeste del cerro norte 1935.955 oeste 9905.424s, elevación 9110 pies.

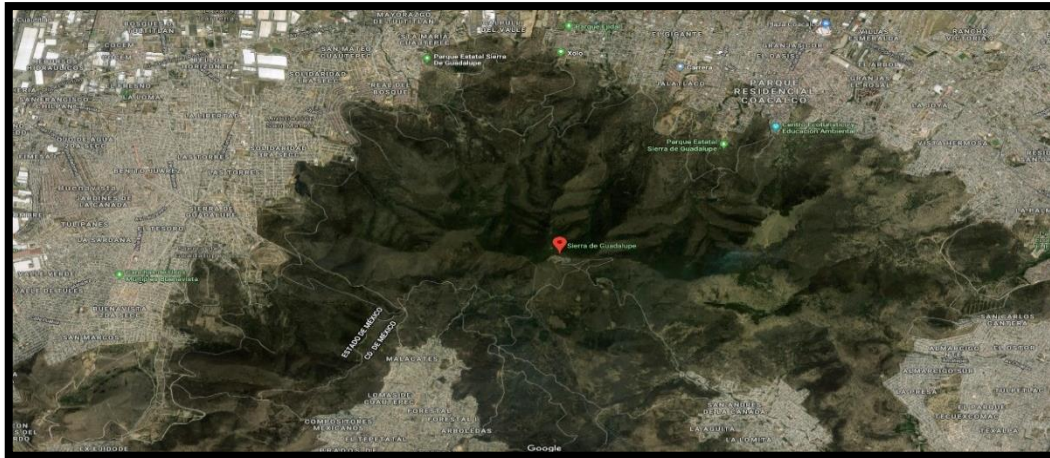


Figura 13. Vista de los municipios con los que colinda la sierra de Guadalupe



Figura 14. Vista sierra de Guadalupe

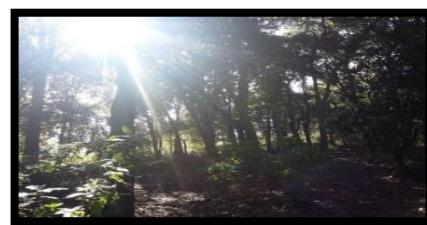


Figura 15. Ecosistema otras especies presentes



Figura 16. Ecosistema en la sierra



Figura 17. Ladera, sierra de Guadalupe



Figura 18. Sierra de Guadalupe donde se recolectó suficiente espécimen



Figura 19. Ecosistema alrededores de la cima en la sierra de Guadalupe

5.1.1 Identificación Taxonómica del Especimen Vegetal

La identificación del espécimen recolectado (Figuras 20 a la 22) se llevó a cabo en el herbario de la facultad de ciencias de la UAEM. En donde basados en una identificación taxonómica se emitió el dictamen (Figura 23), el cual indicó que el espécimen corresponde a la especie: *Acourtia platyphylla*.

Reino de las Plantas - Plantas

Subreino Tracheobionta - Las plantas vasculares

Superdivisión Spermatophyta - Fanerógamas

División Magnoliophyta - Las plantas con flores

Clase Magnoliopsida - Dicotiledóneas

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Compositae

Género: *Acourtia*

Especie: *Acourtia platyphylla*



Figura 20. Especimen *Acourtia*



Figura 21. Especimen de *Acourtia* seco



Figura 22. Especimen recolectado de *Acourtia*



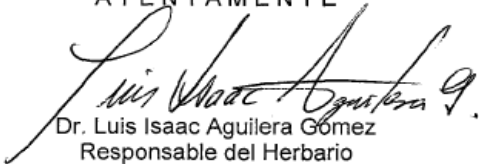
	UAEM	Universidad Autónoma del Estado de México	
FACULTAD DE CIENCIAS HERBARIO			
DICTAMEN			
DATOS DE USUARIO			
Facultad de Química, UAEMex			
DATOS DE LA PLANTA			
Fecha de recepción: 31 de Agosto de 2016 Fecha de entrega: 06 de Septiembre de 2016 Nombre común: snc. Lugar de recolecta: Sierra de Guadalupe, Estado de México			
TIPO DE ANÁLISIS			
Identificación taxonómica			
TÉCNICAS O MÉTODOS EMPLEADOS			
Observación macroscópica y al microscopio estereoscópico simple, de características diagnósticas de género y especie; empleo de claves dicotómicas: Rzedowski G.C. y J. Rzedowski. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología AC. Y CONABIO. Pátzcuaro Michoacán).			
DIAGNOSIS			
Familia: Compositae Género: <i>Acourtia</i>			
Especie: <i>Acourtia platyphylla</i> (A. Gray) Reveal & King			
ATENTAMENTE			
			
Dr. Luis Isaac Aguilera Gómez Responsable del Herbario			

Figura 23. Dictamen de la identificación del espécimen.

5.2 Tratamiento del Especimen Vegetal

Se colectó e identificó el espécimen de *Acourtia platyphylla*, posteriormente a la raíz se le dio un tratamiento de secado a la sombra sobre periódico a temperatura ambiente, para que se pudiera utilizar la muestra con los métodos de extracción. Solo se utilizó la raíz del espécimen para realizar las extracciones por lo que se dejó secar como se indica en la Figura 24, para que no interfiriera el agua con las extracciones.

Posteriormente se trituroó el espécimen para tener una mayor superficie de contacto con ayuda de un molino tal como se observa en la Figura 25.

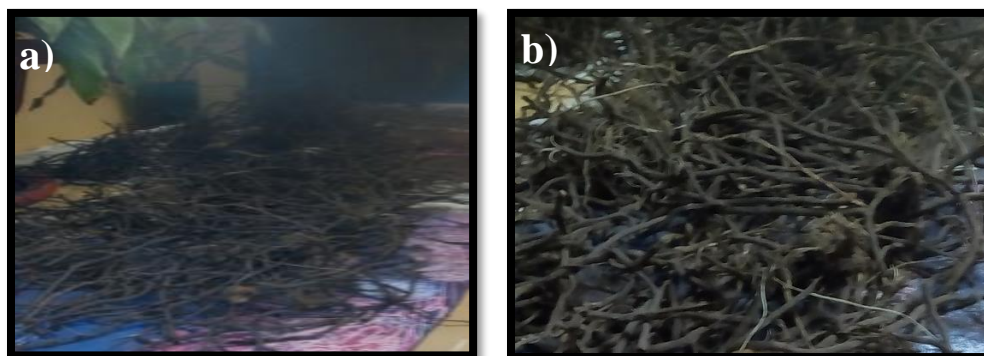


Figura 24. Secado de la raíz del espécimen de *Acourtia platyphylla* a) y b)

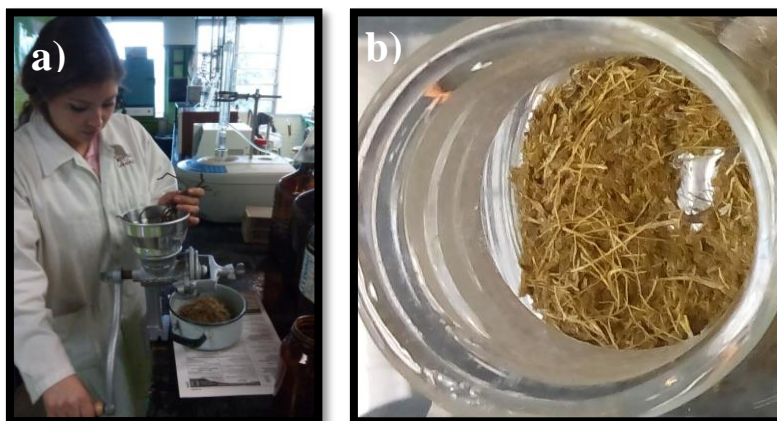


Figura 25. Trituración de la raíz a) y b)

5.3 Metodología para la Extracción de Perezona

Se colecto e identifico el espécimen de *Acourtia platyphylla*, posteriormente se le dio el tratamiento de secado y trituración para utilizar 5g de muestra con los métodos tratamiento convencional y ultrasonido, debido a la polaridad de la perezona se utilizó *n*-hexano como disolvente de extracción a utilizar. Sin embargo, para los métodos con bióxido de carbono

supercrítico se utilizaron 20g de muestra para realizar las extracciones que se describen posteriormente.

Es importante mencionar que el presente trabajo es un continuidad de trabajos anteriores,^[11, 12] como precedente a esta estudio se hicieron las pruebas de extracción, estas se realizaron con disolventes de distinta polaridad; etanol, acetato de etilo y *n*-hexano, se compararon por cromatografía en capa fina (*n*-hexano/acetato de etilo 9:1) los dos extractos con una muestra de perezona como referencia, y se observó que el correspondiente a *n*-hexano contenía perezona, mientras que los extractos obtenidos acetato y etanol contenían compuestos no deseados.^[11] Es por ello que se conoce el *n*-hexano como disolvente de extracción a utilizar.

5.3.1 Extracción Clásica (calentamiento convencional a reflujo)

Para realizar el tratamiento de extracción térmica convencional a reflujo (ver Figura 26) se utilizaron 5g de la raíz triturada, la cual se depositó en un matraz de bola de 100 mL, se le añadió 60 mL de *n*-hexano como disolvente, así como el instrumental de vidrio comúnmente empleado en este tipo de metodología (Figuras 27 y 28) y posteriormente se sometió a reflujo con baño térmico mediante una mantilla de calentamiento a 60°C durante 3 horas se realizaron tres repeticiones para hacer un análisis estadístico, para obtener un extracto de perezona (Figura 29).

Figura 26. Diagrama para la extracción térmica convencional

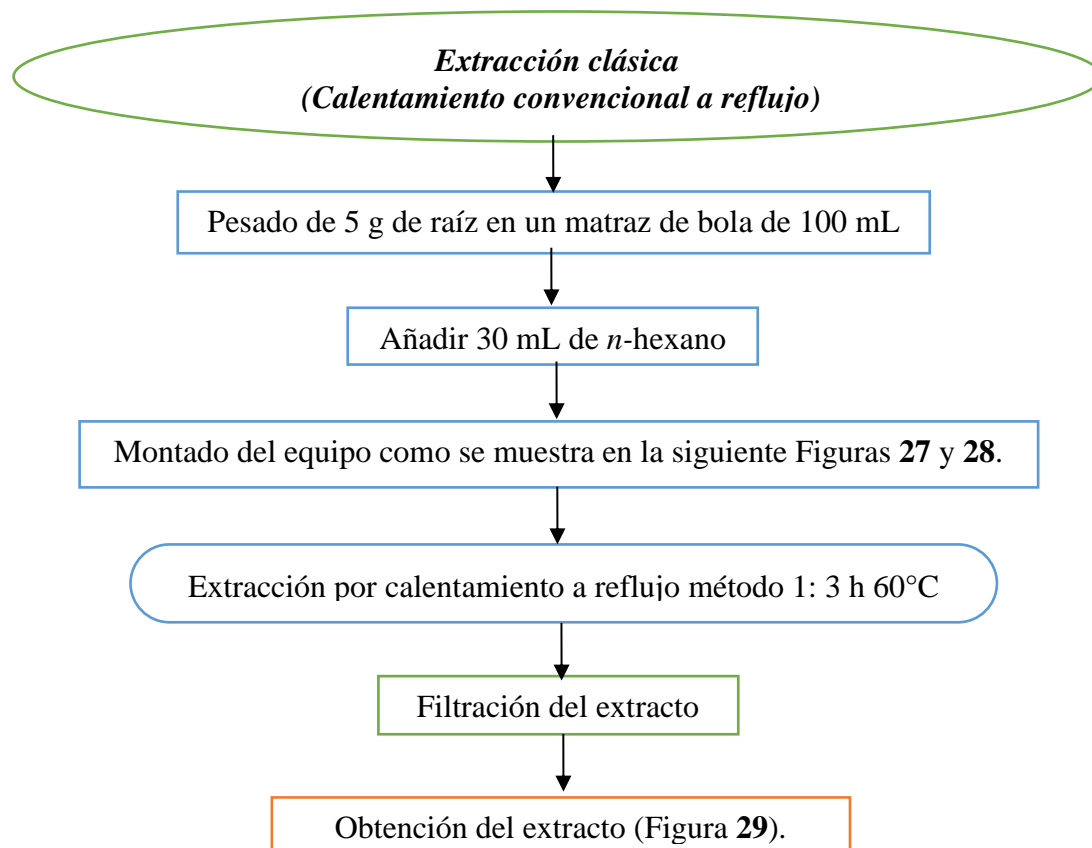




Figura 27. El equipo de extracción convencional o clásica



Figura 28. Extracción clásica



Figura 29. Cristales de extracción clásica

5.3.2 *Extracción con Ultrasonido*

En la Figura 30, se describe el procedimiento para la extracción mediante ultrasonido. La muestra de 5g de la raíz triturada se sometió a sonicación, la cual se depositó en un matraz de bola de 100 mL, se le añadió 60 mL de *n*-hexano como disolvente, también se agregaron perlas de ebullición, y el matraz se conectó a un tubo refrigerante el cual es el instrumental de vidrio comúnmente empleado en

Figura 30. Diagrama de la extracción por ultrasonido

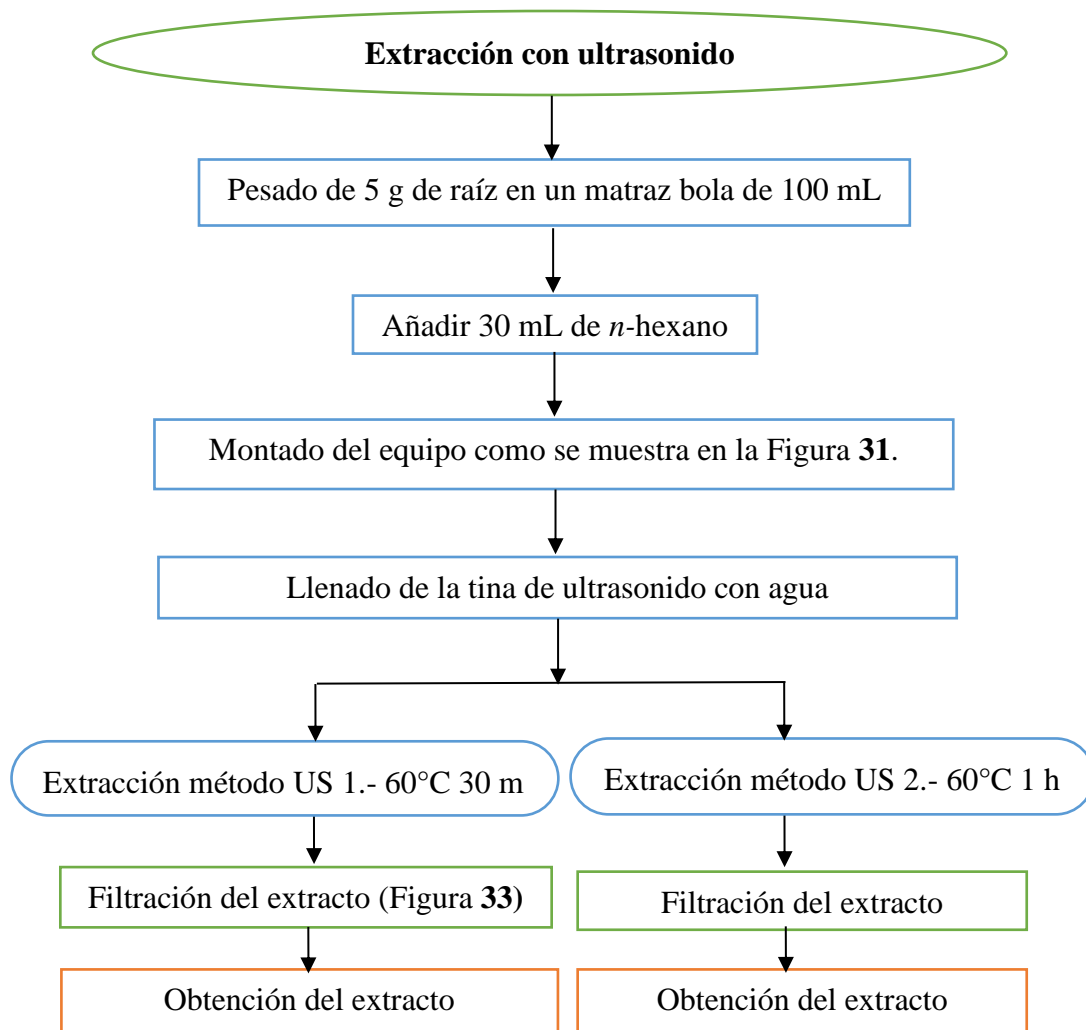


Figura 31. Extracción con ultrasonido



Figura 32. Sonicación

Con estos cristales de perezona obtenidos mediante sonicación (Figura 34) se realizó el análisis de la respectiva cuantificación de la perezona y esto se hace con cada método teniendo muy en cuenta que cada método tiene dos o tres variantes de condiciones y estas cada una se realiza por triplicado.



Figura 33. Filtración del extracto de perezona



Figura 34. Cristales de extracción US

5.3.3 *Extracción con Bióxido de Carbono Supercrítico*

Otro medio alternativo para llevar a cabo un proceso de extracción lo es el CO₂ SC en este caso se usó un sistema de fluidos supercríticos (Figura 35), se presenta una descripción del equipo en la Figura 36. La experimentación se llevó a cabo en el laboratorio de procesos de extracción de biomoléculas aplicando la Tecnología de Fluidos Supercríticos En Facultad de Química, Campus Cerrillo, UAEM a cargo de Dr. Julián Cruz Olivares.

Para realizar la extracción CO₂ SC (ver Figura 37) se utilizaron 20 g de muestra del espécimen de *Acourtia platyphylla* los cuales se colocaron en la celda de rejilla contenedora se observa en la Figura 41, a continuación se colocó dentro del reactor y para conectarlo al sistema (Figura 38), enseguida se purga y presuriza con bióxido de carbono hasta llegar a la presión supercrítica deseada, con este método podemos variar la presión del fluido, la temperatura y el tiempo de extracción. Para este caso se le aplicó a la muestra una presión de 1500 psi de CO₂ y temperaturas de 50°C por un lapso de 6, 10, 12, 24 horas, los extractos y los cristales obtenidos se muestran en las Figuras 39 a la 44.

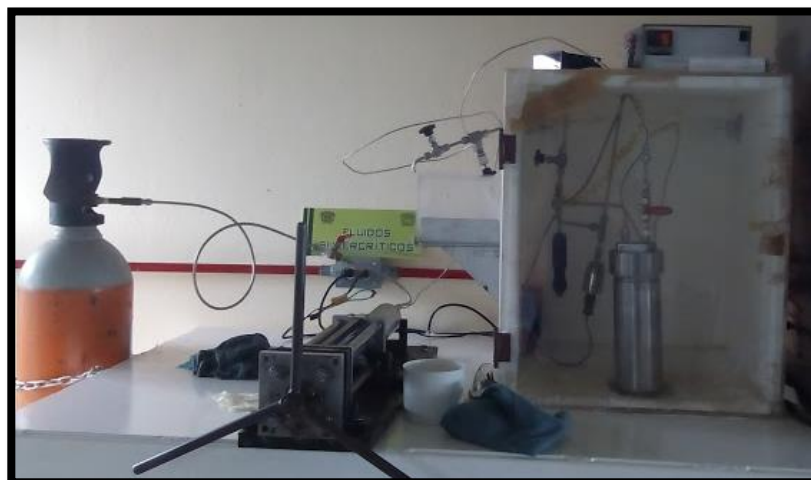


Figura 35. Equipo de fluidos supercríticos

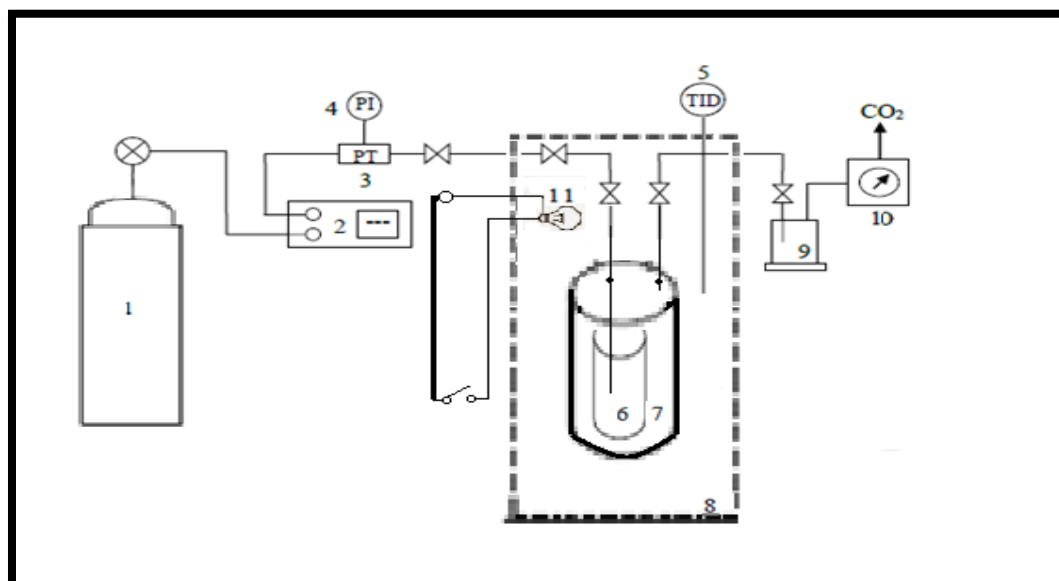
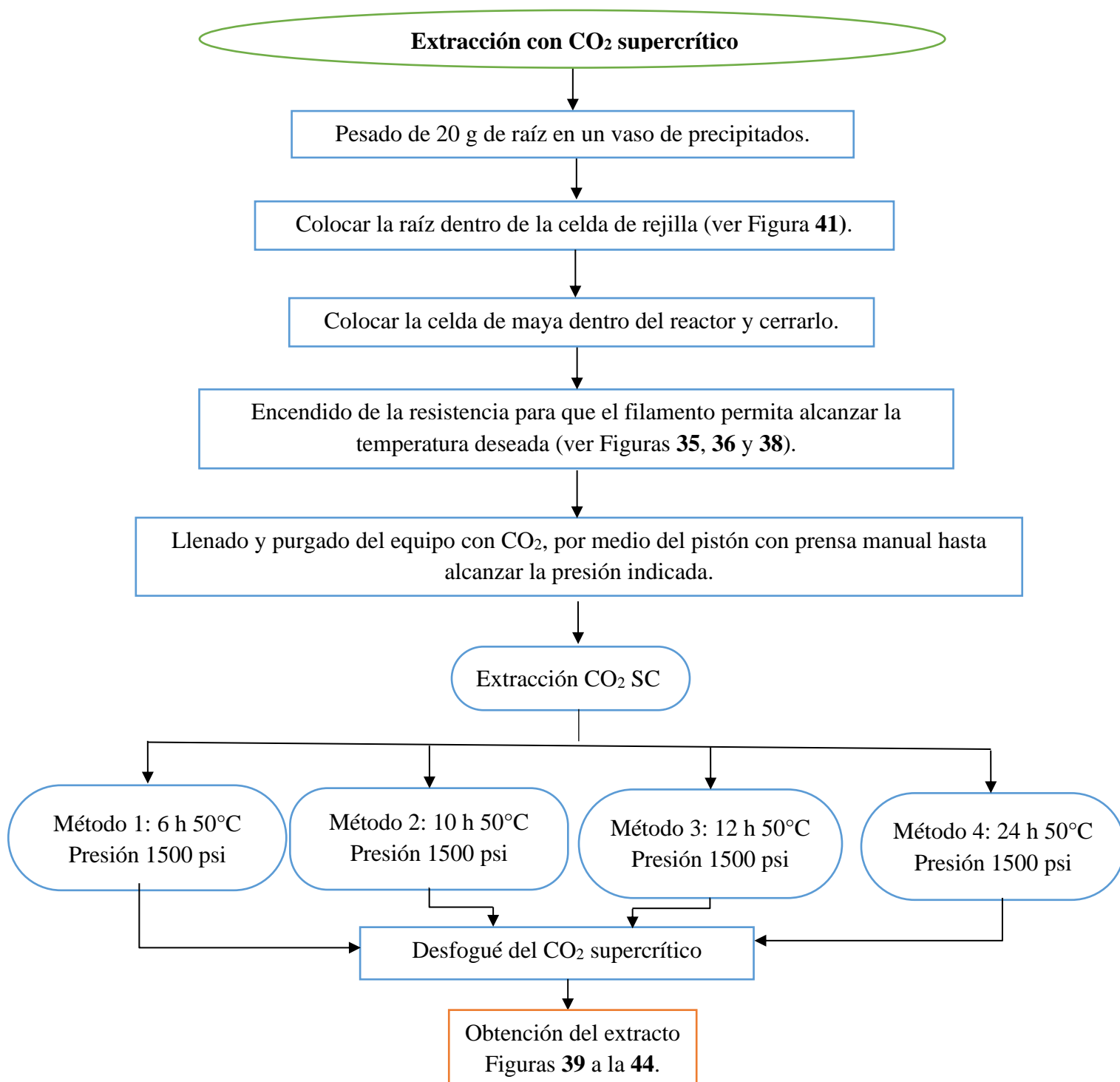


Figura 36. Diagrama esquemático del sistema para fluidos supercríticos ^[22]

1. Tanque de dióxido de carbono
2. Bomba de alta presión
3. Transductor de presión
4. Indicador de presión
5. Controlador indicador de temperatura
6. Celda de rejilla contenedora de la raíz
7. Reactor de extracción a alta presión
8. Cabina para mantener la calefacción
9. Celda de recuperación del extracto
10. Medidor de salida de gas húmedo
11. Fuente de calor (foco)

Figura 37. Diagrama para la extracción con CO₂ supercrítico



El sistema está integrado por tanque de CO₂, un pistón que empaqueta el CO₂ a presión (medido por un transductor e indicador) en el reactor, el cual tiene condiciones de temperatura

controlada, la fuente de calor emitida por un foco de 100 watts y un sensor para medir la temperatura del reactor.



Figura 38. Cámara isotérmica del equipo de fluidos supercríticos



Figura 39. Tapa del reactor y tubo inyector de CO₂



Figura 40. Obtención de perezona en forma de finas agujas



Figura 41. Celda de rejilla contenedora de la raíz

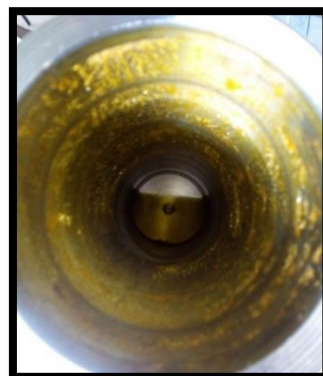


Figura 42. Formación de cristales dentro del reactor cilíndrico. Al cual se le agregó metanol para recuperar los cristales de perezona

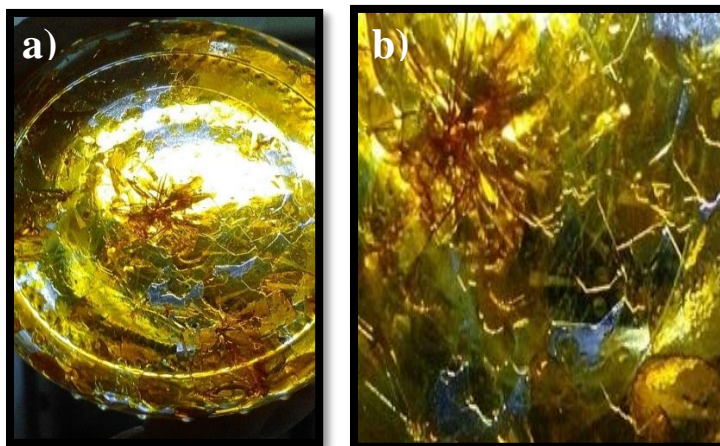


Figura 43. Cristales de perezona recuperados con disolvente a) y b)

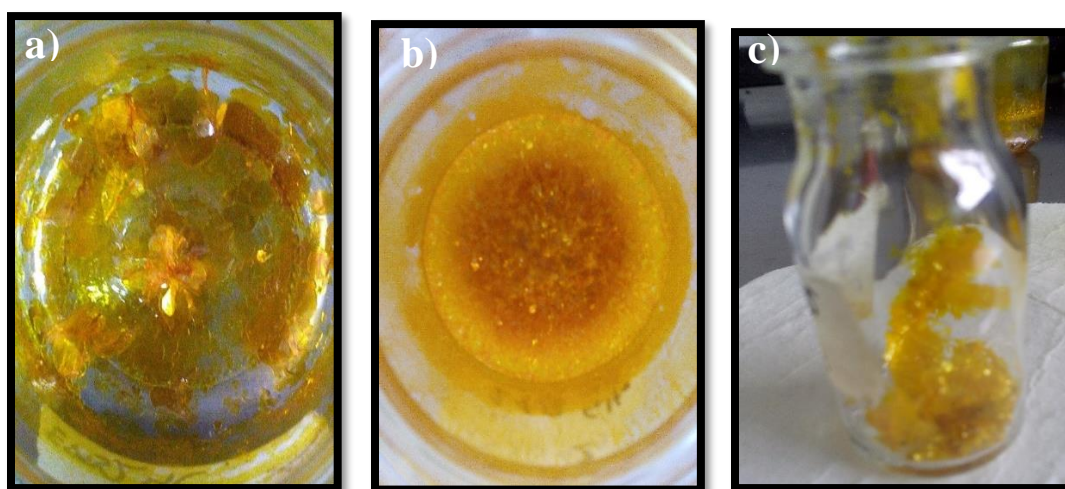


Figura 44. Cristales de perezona obtenidos con CO₂ SC. a) y b) cristales en forma de hojuelas obtenidos mediante la misma nucleación del extracto obtenido por CO₂ supercrítico, c) cristales obtenidos directamente de la extracción en forma de agujas.

Esto se realizó para las cuatro variantes de condiciones que tiene la extracción con CO₂ SC, las cuales se hicieron por triplicado para el análisis estadístico. Como se observa el método de extracción por fluidos supercríticos no necesitó de un tratamiento pre análisis debido a la calidad del extracto.

5.4 Metodología para la Cuantificación de Perezona Presente en el Extracto

Con los cristales de perezona obtenidos del extracto se realizaron los estudios de RMN ^1H , para el análisis y la cuantificación de la perezona.

La preparación de la muestra, para el análisis en el equipo de resonancia se realizó de la siguiente manera: en un vial se pesó 30 mg de muestra del extracto de perezona y se adicionó un patrón interno (1,4-dinitrobenzeno) en relación 3:1, disueltos en 0.7 mL CDCl_3 . Se trasvaso tu tubo para RMN, con ayuda de un a pipeta Pasteur. Esto se realizó para cada uno de los extractos obtenidos.

Las muestras preparadas de extracción clásica y de ultrasonido fueron analizadas en un equipo de resonancia magnética Varian Mercury-300 a 3000 A 300 MHz. Pero las muestras (Figura 45) de extracción con bióxido de carbono supercrítico se analizaron en un equipo Varian Mercury a 500 MHz (Figura 46) del Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM..



Figura 45. Muestras para RMN ^1H



Figura 46. Equipo varían para RMN ^1H .

Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear del Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación de perezona se realizó por métodos espectroscópicos convencionales como lo son: Análisis Mediante Cromatografía de Líquidos Acoplada a Espectrometría de Masas y Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN ^1H). Sin embargo, la cuantificación se efectuó únicamente mediante RMN ^1H . A continuación, se muestran los resultados.

6.1 Análisis Mediante Cromatografía de Líquidos Acoplada a Espectrometría de Masas

Se identificó a la molécula de perezona mediante el análisis por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, en la Figura 47 se observa el cromatograma obtenido del extracto representativo obtenido de la raíz *Acourtia platyphylla*.

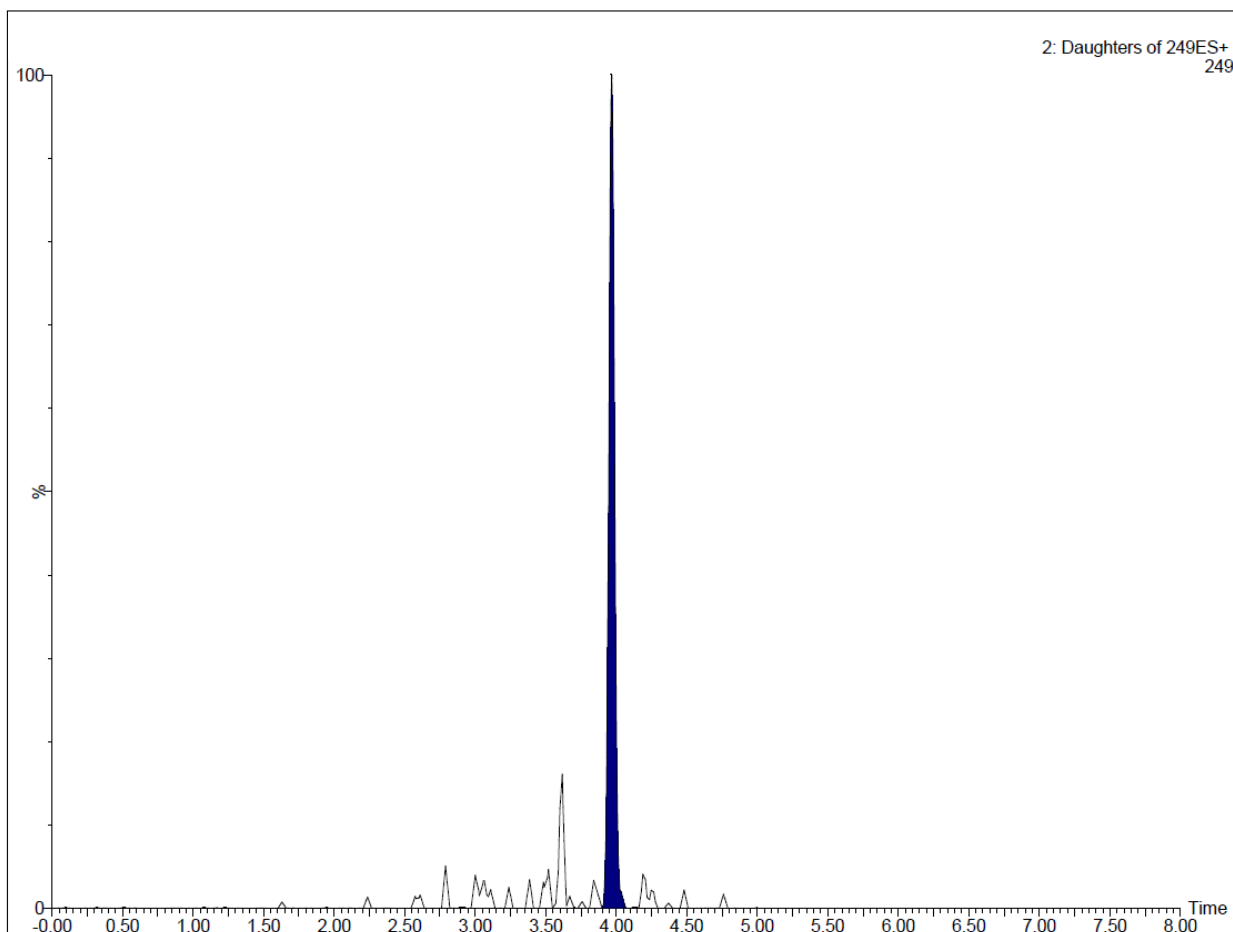


Figura 47. Cromatograma del extracto de perezona

En la Figura 46, se observa una señal, LC – MS/MS: El ion extraído de la exploración de iones precursores de m/z 249 para la molécula de perezona, por electro ionización positiva, donde el tiempo de retención obtenido para perezona fue de 3.97 min, en la relación señal/ruido requerida ≥ 3 . En el caso del perezona, el ion se detectó un fragmento de $m/z = 249$ que fue asignado al ion molecular protonado $[M + H]^+$.

Debido a que la espectrometría de masas, es una técnica de análisis cualitativo, de amplia utilización para para la identificación de moléculas, por si sola o en combinación con otras técnicas de espectrofotometría, en la Figura 48 se encuentra el espectro de masas del extracto de la perezona determinado por ESI obtenido a partir de la raíz *Acourtia platyphylla*.

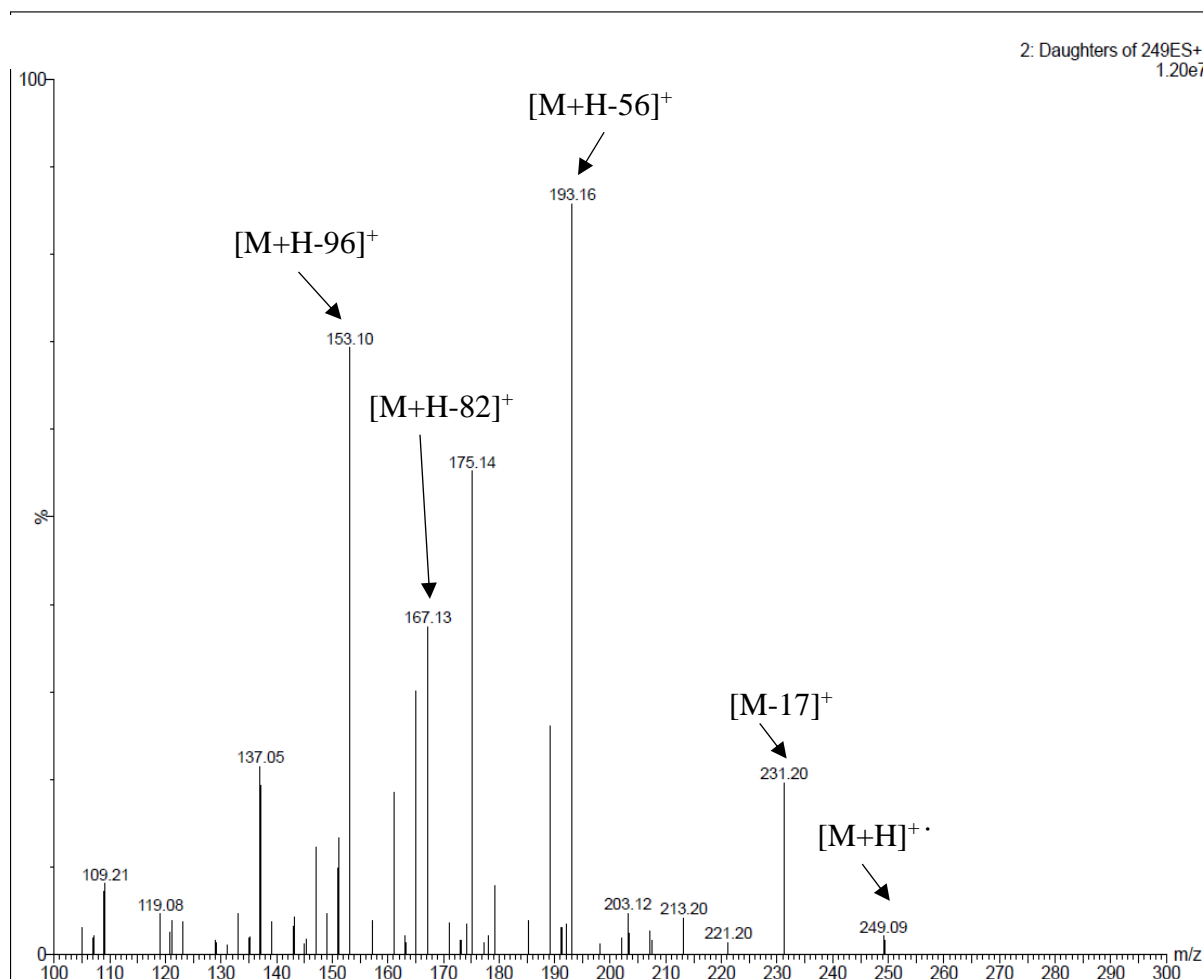


Figura 48. Espectro de masas de la perezona determinado por ESI

Perezona.- (*R*)-2-(1.5-dimetil-4-hexenil)-3-hidroxi-5-metil-*p*-bezoquinona (**1**) ESI (20 eV) m/z (% ar) [Asig]: 249.09 (5) $[M+H]^+$; 231.20 (20) $[M-17]^+$, 193.16 (87) $[M+H-55.93]^+$, 175.14 (56) $[M+H-73.95]^+$, 167.13 (38) $[M+H-81.96]^+$, 153.10 (70) $[M+H-95.99]^+$, 137.05 (22) $[M+H-112.04]^+$.

Tabla 14. Ionización por electro spray (ESI)

m/z	Ion representativo
249.09	$[M+H]^+$
231.20	$[M-17]^+$
193.15	$[M+H-56]^+$
153.10	$[M+H-96]^+$

El peso molecular de la perezona es de 248.322 g/mol, la regla del nitrógeno indica que cuando el peso molecular es par, como en este caso, los picos más importantes son de masa impar, y el compuesto no tendrá **nitrógeno**.

6.2 Análisis Espectroscópico de RMN ^1H

La resonancia magnética nuclear permitió elucidar de una mejor forma la estructura de esta molécula (**1**),^[4] El fundamento de la RMN ^1H se basa en la resonancia que tienen los núcleos de hidrógeno para ello se le incide cierta energía y para un núcleo desprotegido será menor la energía que se utiliza, estando en campo bajo, para hacer resonancia en el núcleo (isotópico) y se necesitará más energía para un núcleo que está protegido.

El espectro de resonancia magnética nuclear de la perezona que se reportado en la literatura se muestra en la Figura 49, el cual concuerda con el espectro de RMN ^1H experimental.

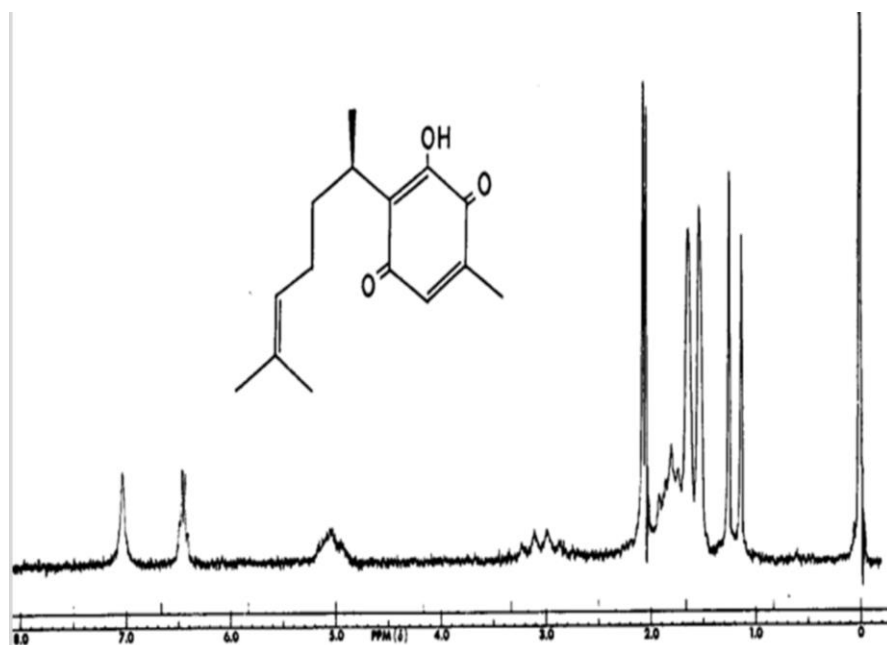


Figura 49. Espectro de RMN ^1H de perezona reportado en la literatura^[23]

Las características más significativas son las señales para el grupo metilo (sobre el anillo quinónico) y para el hidrogeno en posición adyacente. Estas señales son dobles con una pequeña constante de acoplamiento (1.8 cps). Esto indica que están acoplados en posiciones adyacentes.^[23]

En la Figura 50 se observa el espectro de RMN ¹H representativo obtenido del extracto de perezona donde hace una señalización de la molécula de perezona con respecto a la señal que tiene el patrón interno: 1,4-dinitrobenceno.

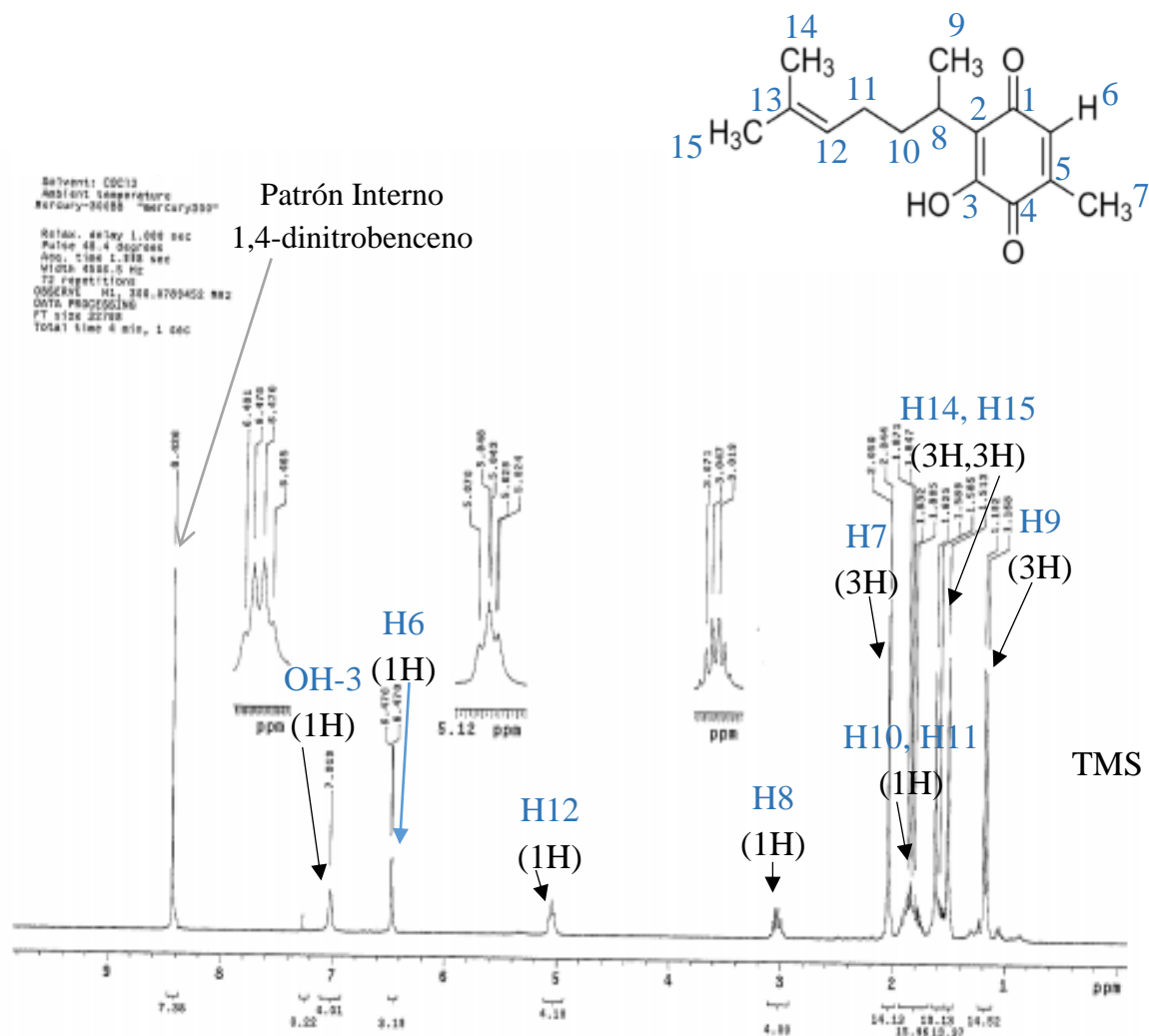


Figura 50. Espectro de RMN ¹H del extracto de perezona con patrón interno

Perezona.- RMN ¹H 300 MHz (CDCl₃) δppm: 7.30 ppm (s, 1D, CDCl₃), 7.08 ppm (s, 1H, OH), 6.47 ppm (s, 1H, C₆H), 5.12 ppm (t, 1H, CH), 3.00 ppm (m, 1H, CH), 2.06 ppm (s, 3H, CH₃), 1.84 ppm (m, 2H, CH₂), 1.68 ppm (m, 2H, CH₂), 1.62 ppm (s, 3H, CH₃), 1.51 ppm (s, 3H, CH₃), 1.05 ppm (d, 3H, CH₃).

Las características más significativas de este espectro son las señales para el grupo metilo, que se encuentra sobre el anillo quinónico y para el hidrógeno en la posición adyacente las señales son dobletes con una pequeña constante de acoplamiento.

Como podemos observar la señal característica de la perezona se ubica en 6.45 ppm por lo que está presente en el extracto. La presencia de un metilo en δ 2.05 como señal doble ($J = 1.08$ Hz) y un hidrógeno vinílico en δ 6.45 como cuarteto ($J = 1.8$ Hz), lo cual indica la vecindad entre estos grupos en uno de los dobles enlaces de la quinona, de acuerdo con la estructura de la perezona y tiene un grupos hidroxilo el cual se presenta a 7 ppm (Figura 1).

Para la cuantificación de compuestos, se utilizó una técnica de normalización de áreas con el método del patrón interno para el cual se realizó una disolución del patrón interno para conocer las señales que emitidas del 1,4-dinitrobeneno.

Las señales características de la perezona son diferentes del 1,4-dinitrobeneno, respecto al desplazamiento en 8.5 ppm el cual se mantuvo constante en todos los espectros de RMN ^1H , debido a que se agregó una cantidad constante, se utilizó la integral de la señal del patrón interno puesto que es una concentración conocida, para poder utilizar una fórmula en donde obtuvo la cantidad de perezona utilizando la integral de la misma. Así se logró cuantificar el extracto de perezona ya que el área de las señales será diferente dependiendo de la concentración de perezona; por tanto, la integral indica la concentración presente en cada extracto llevando a cabo la cuantificación de la perezona con base a las proporciones de las integrales del patrón y la muestra mediante la ecuación que se muestra a continuación.

Cantidad de perezona en muestra en mg

$$= \left(\frac{\left(\frac{\text{Integral de perezona}}{\text{Protones de perezona}} \right)}{\left(\frac{\text{Integral de patrón interno}}{\text{Protones de patrón interno}} \right)} \right) * \left(\frac{\text{mg de patrón interno}}{\text{PM de patrón interno}} \right) * \text{PM de perezona}$$

Donde:

Protones de perezona = 1 Núcleos de H^+ ; *PM de perezona* = 248 g/mol

Protones del patrón interno = 4 Núcleos de H^+ ; *PM de patrón interno* = 161.8 g/mol

mg de patrón interno: cantidad de 1,4-dinitrobeneno añadida a la muestra para RMN ^1H . Estos datos se presentan en las tablas 16 a la 22, como: Patrón interno

Integral de patrón interno: Los resultados se presentan en las tablas 16 a la 22, (como: Integral patrón int.) Los cuales se obtuvieron del apartado 9.2 espectros RMN ^1H .

Integral de perezona: Estos resultados se presentan en las tablas **16** a la **22**, como: Integral extracto. Los cuales se obtuvieron del apartado 9.2 espectros RMN ¹H

En el espectro de RMN ¹H del extracto de perezona con patrón interno (Figura **50**) se observa la señal correspondiente a la perezona y la señal correspondiente al patrón interno.

Para determinar la señal correspondiente a la perezona se relacionó el área de la integral perteneciente a la señal asignada al protón H-6 de perezona la cual permite llevar a cabo el cálculo de forma directa, debido a que pertenece a un protón que se ha observado no sufre de cambios en su localización por el ambiente molecular, además de que la integral al provenir de un solo hidrogeno se observa definida.

La elección de 1,4-dinitrobenceno como patrón interno más adecuado para la cuantificación, se debe principalmente a su útil carácter de originar pocas señales en el espectro, en este caso se eligió a la señal a campo alto aproximadamente a 8.4 ppm, la cual además se manifiesta alejada de la señal de la perezona y en consecuencia no interfiere con la zona de integración de la misma. Sumado a estas oportunas características, el 1,4-dinitrobenceno cumple con la condición de ser soluble en CDCl₃, estable no volátil y de fácil acceso.

6.3 Análisis Estadístico

Para organizar los resultados y realizar el análisis de los tratamientos de acuerdo a las condiciones utilizadas para cada método se utilizó la siguiente nomenclatura descrita a continuación en la Tabla **15**.

Tabla **15**. Tratamiento, condiciones y nomenclatura para cada método

Tratamiento	Condiciones	Nomenclatura
Calentamiento Clásico	1.- Reflujo 3 h 60°C	Reflujo 1.- 3 h
US	1.- 1 h 60°C	US 1.- 1 h
	1.- 30 m 60°C	US 2.- 30 m
CO ₂ SC	1.- 6 h 1500 psi 50°C	CO ₂ SC 1.- 6 h
	2.- 10 h 1500 psi 50°C	CO ₂ SC 2.- 10 h
	3.- 12 h 1500 psi 50°C	CO ₂ SC 3.- 12 h
	4.- 24 h 1500 psi 50°C	CO ₂ SC 4.- 24 h

Se presentan en seguida los datos de la cantidad de raíz utilizada y los resultados del extracto obtenido, así como los resultados del análisis espectroscópico de los extractos de RMN ¹H

(los espectros de RMN ¹H utilizados para la cuantificación se presentan en el apartado 9.2) reportados como integral del extracto e integral del patrón interno en las Tablas 16 a la 22.

Los resultados se presentan a continuación: en el método clásico se observan en la Tabla 16, así como para el método de ultrasonido el cual tiene dos variantes se encuentran en las Tablas 17 y 18.

Tabla 16. Resultados de la extracción con Reflujo 1.- 3 h

Espectro	Raíz	Extracto	Extracto rendimiento	Extracto RMN ¹ H	Integral extracto	Patrón interno	Integral patrón int.
	(mg)	(mg)	%	(mg)		(mg)	
1	5000	223.00	4.46	30	1.31	10	11.92
2	5000	218.00	4.36	30	1.28	10	13.47
3	5000	214.00	4.28	30	1.25	10	12.73
Prom.	5000	218.33	4.37	30	1.28	10	12.71

Tabla 17. Resultados de la extracción con US 1.- 1 h

Espectro	Raíz	Extracto	Extracto rendimiento	Extracto RMN ¹ H	Integral extracto	Patrón interno	Integral patrón int.
	(mg)	(mg)	%	(mg)		(mg)	
4	5000	430.00	8.60	30	2.30	10	6.57
5	5000	434.00	8.68	30	3.04	10	9.14
6	5000	400.00	8.00	30	2.64	10	7.10
Prom.	5000	421.33	8.43	30	2.66	10	7.60

Tabla 18. Resultados de la extracción con US 2.- 30 m

Espectro	Raíz	Extracto	Extracto rendimiento	Extracto RMN ¹ H	Integral extracto	Patrón interno	Integral patrón Int.
	(mg)	(mg)	%	(mg)		(mg)	
7	5020	425.00	8.47	30	3.10	10	7.69
8	5000	413.00	8.26	30	2.33	10	6.31
9	5000	410.00	8.20	30	2.02	10	4.75
Prom.	5007	416.00	8.31	30	2.48	10	6.25

El método de bióxido de carbono supercrítico tiene cuatro variantes de condiciones que se presenta en las Tablas 19 a la 22, además cada método de extracción se realizó por triplicado para el análisis estadístico.

Tabla 19. Resultados de la extracción con CO₂ SC 1.- 6 h

Espectro	Raíz	Extracto	Extracto rendimiento	Extracto RMN ¹ H	Integral extracto	Patrón interno	Integral patrón int.
	(mg)	(mg)	%	(mg)		(mg)	
10	20000	378.30	1.89	30	1.31	20	11.92
11	20000	521.20	2.61	30	0.26	20	2.94
12	20000	435.20	2.18	30	0.94	10	3.39
Prom.	20000	444.90	2.22	30	0.84	16.67	6.08

Tabla 20. Resultados de la extracción con CO₂ SC 2.- 10 h

Espectro	Raíz	Extracto	Extracto rendimiento	Extracto RMN ¹ H	Integral extracto	Patrón interno	Integral patrón int.
	(mg)	(mg)	%	(mg)		(mg)	
13	20003	571.30	2.86	30	2.91	10	9.19
14	20005	664.50	3.32	30	2.74	10	9.58
15	20024	620.70	3.10	30	1.85	10	4.07
Prom.	20011	618.83	3.09	30	2.5	10	7.61

Tabla 21. Resultados de la extracción con CO₂ SC 3.- 12 h

Espectro	Raíz	Extracto	Extracto rendimiento	Extracto RMN ¹ H	Integral extracto	Patrón interno	Integral Patrón int.
	(mg)	(mg)	%	(mg)		(mg)	
16	20000	623.70	3.12	30	0.91	10	2.08
17	20000	464.90	2.32	30	2.92	10	7.80
18	20000	471.40	2.36	30	2.80	10	7.50
Prom.	20000	520.00	2.60	30	2.21	10	5.79

Tabla 22. Resultados de la extracción con CO₂ SC 4.- 24 h

Espectro	Raíz	Extracto	Extracto rendimiento	Extracto RMN ¹ H	Integral extracto	Patrón interno	Integral patrón int.
	(mg)	(mg)	%	(mg)		(mg)	
19	20000	743.20	3.72	30	2.35	10	6.73
20	20000	449.20	2.25	30	1.72	10	4.85
21	20000	605.10	3.03	30	2.04	10	5.44
Prom.	20000	599.17	3.00	30	2.04	10	5.67

Con los resultados anteriormente presentados se realizó la cuantificación de perezona en cada método posteriormente se procedió al análisis estadístico.

El tratamiento de resultados de la cuantificación de las extracciones se presenta de la Tablas **23** a la **29**, así se determinó la cantidad de perezona existente en el extracto y el porcentaje de la misma presente en la raíz de acuerdo a cada método.

Tabla **23**. Cuantificación y rendimientos de la extracción con Reflujo 1.- 3 h

		Perezona en				
		muestra de 30 mg		Extracto		Raíz
		(mg)	%	(mg)	%	%
		6.49	21.62	48.21	21.62	0.96
		5.61	18.69	40.75	18.69	0.81
		5.79	19.32	41.34	19.32	0.83
Prom.		5.96	19.88	43.43	19.88	0.87

Tabla **24**. Cuantificación y rendimientos de la extracción con US 1.- 1h

		Perezona en				
		muestra de 30 mg		extracto		Raíz
		(mg)	%	(mg)	%	%
		20.66	68.86	296.11	68.86	5.92
		19.63	65.43	283.95	65.43	5.68
		21.94	73.14	292.57	73.14	5.85
Prom.		20.74	69.14	290.88	69.14	5.82

Tabla **25**. Cuantificación y rendimientos de la extracción con US 2.- 30 m

		Perezona en				
		muestra de 30 mg		extracto		Raíz
		(mg)	%	(mg)	%	%
		23.79	79.30	337.01	79.30	6.71
		21.79	72.64	299.98	72.64	6.00
		25.10	83.65	342.98	83.65	6.86
Prom.		23.56	78.53	326.66	78.53	6.52

Tabla **26**. Cuantificación y rendimientos de la extracción con CO₂ SC 1.- 6 h

		Perezona en				
		muestra de 30 mg		Extracto		Raíz
		(mg)	%	(mg)	%	%
		12.97	43.24	163.56	43.24	0.82
		10.44	34.79	181.34	34.79	0.91
		16.36	54.54	237.38	54.54	1.19
Prom.		13.26	44.19	194.09	44.19	0.97

Tabla 27. Cuantificación y rendimientos de la extracción con CO₂ SC 2.- 10 h

	Perezona en				
	muestra de 30 mg		Extracto		Raíz
	(mg)	%	(mg)	%	%
	18.69	62.29	355.85	62.29	1.78
	16.88	56.26	373.85	56.26	1.87
	26.82	89.41	554.99	89.41	2.77
Prom.	20.80	69.32	428.23	69.32	2.14

Tabla 28. Cuantificación y rendimientos de la extracción con CO₂ SC 3.- 12 h

	Perezona en				
	muestra de 30 mg		Extracto		Raíz
	(mg)	%	(mg)	%	%
	25.82	86.06	536.76	86.06	2.68
	22.09	73.64	342.35	73.64	1.71
	22.03	73.44	346.19	73.44	1.73
Prom.	23.31	77.71	408.43	77.71	2.04

Tabla 29. Cuantificación y rendimientos de la extracción con CO₂ SC 4.- 24 h

	Perezona en				
	muestra de 30 mg		Extracto		Raíz
	(mg)	%	(mg)	%	%
	20.61	68.69	510.48	68.69	2.55
	20.93	69.76	313.36	69.76	1.57
	22.13	73.77	446.36	73.77	2.23
Prom.	21.22	70.74	423.40	70.74	2.12

Ya obtenido el porcentaje promedio de perezona en el extracto se calculó la desviación estándar (S) y error estándar (SE \bar{x}) de cada método como se observa en la Tabla 30.

Tabla 30. Cálculo de error estándar para perezona en el extracto

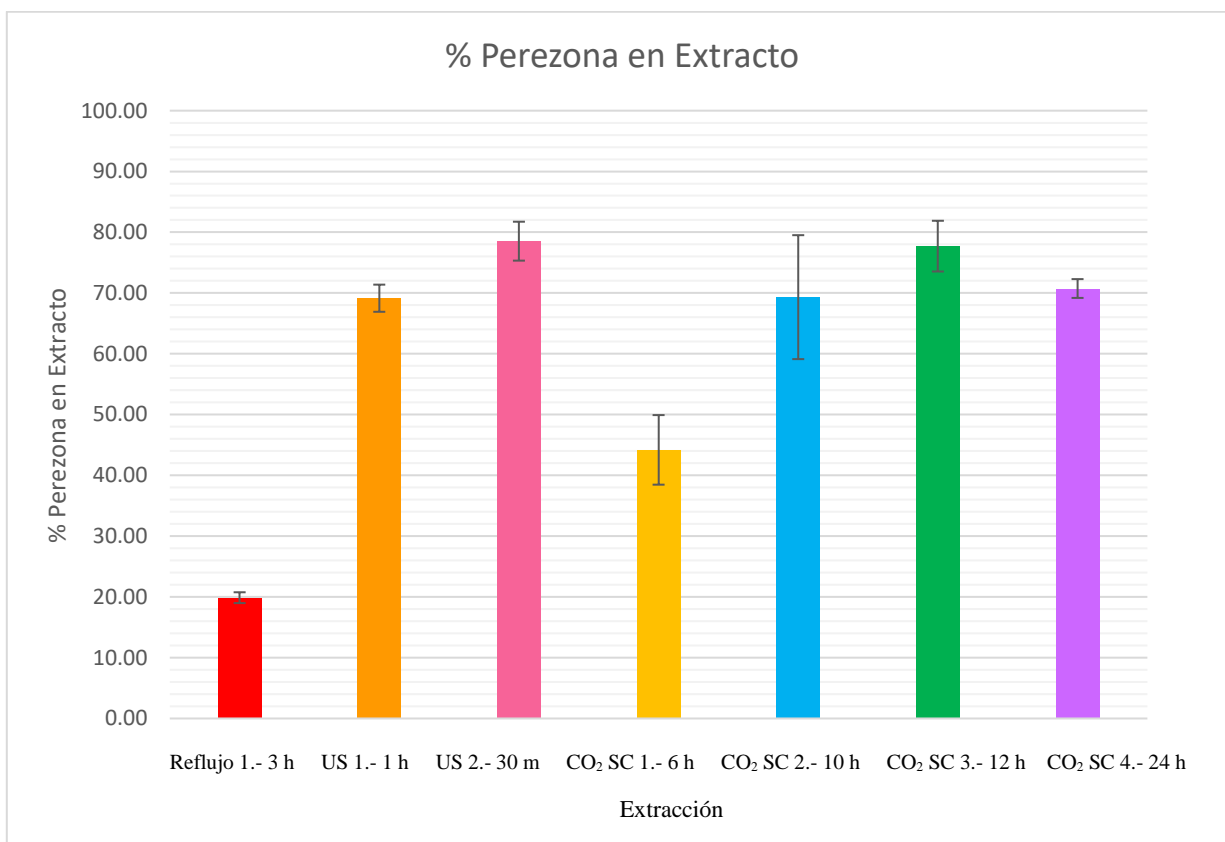
	Prom. perezona en extracto	S	SE \bar{x}
Reflujo 1.- 3 h	19.88	1.54	0.8898
US 1.- 1h	69.14	3.87	2.2319
US 2.- 30 m	78.53	5.55	3.2035
CO₂ SC 1.- 6 h	44.19	9.91	5.7220
CO₂ SC 2.- 10 h	69.32	17.66	10.1957
CO₂ SC 3.- 12 h	77.71	7.23	4.1742
CO₂ SC 4.- 24 h	70.74	2.68	1.5453

En la Tabla 31 se muestra la desviación estándar promedio de la perezona presente en extracto con una r^2 igual a 97.

Tabla 31. Porcentaje de perezona en el extracto

$r^2_{extracto}$	97.64972545
$S_{extracto}$	0.402545427

La siguiente grafica presenta el contenido promedio de perezona en extracto de cada método de extracción



Grafica 1. Porcentaje de la extracción perezona en el extracto para cada método

Como se aprecia en la Gráfica 1 el mejor método de extracción en cuanto a la selectividad fue utilizando la sonicación (US 2.- 30 m) con *n*-hexano como disolvente mayor a 78%, seguido por el CO₂ SC 3.- 12 h con un 77% y de perezona en extracto con estos métodos se obtiene mayor cantidad de perezona y por ende tienen mejor selectividad.

Después se encuentran a los métodos CO₂ SC 4.- 24 h con 70%, CO₂ SC 2.- 10 h y US 1.- 1h con el 69% de perezona presente en extracto.

El método convencional de Reflujo 1.- 3 h genero menor porcentaje de perezona y por lo tanto el que menor selectividad en extracto presenta en comparación con los otros métodos.

Las diferencias de los valores medios se analizaron mediante la prueba análisis de varianza (ANOVA) y la diferencia significativa honesta de Tukey para los resultados, empleando un intervalo de confianza del 95%, para perezona en el extracto.

Para continuar con el análisis se procedió a realizar, análisis de varianza de un factor (Tabla 32), análisis de varianza (Tabla 33), la prueba de Tukey (Tablas 34 y 35) de perezona en extracto y así poder comparar la validez estadística de los métodos entre sí (Tabla 36).

Tabla 32. Análisis de varianza de un factor para perezona en el extracto

Resumen					
	<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Reflujo 1.- 3 h	1	3	2.61	0.87	0.01
US 1.- 1 h	2	3	17.45	5.82	0.02
US 2.- 30 m	3	3	19.57	6.52	0.21
CO ₂ SC 1.- 6 h	4	3	2.91	0.97	0.04
CO ₂ SC 2.- 10 h	5	3	6.42	2.14	0.30
CO ₂ SC 3.- 12 h	6	3	6.13	2.04	0.31
CO ₂ SC 4.- 24 h	7	3	6.35	2.12	0.25

Tabla 33. Análisis de varianza para perezona en el extracto

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	94.25	6	15.70	96.94	1.368E-10	2.84
Dentro de los grupos	2.26	14	0.16			
Total	96.52	20				

Tabla 34. Valores para prueba de Tukey para perezona en el extracto

Error estándar de las medias	0.232409711
Valor de T	3.58
Diferencia Significativa (Error Est.*T)	0.8320

La diferencia respecto al porcentaje de perezona contenida en el extracto, de cada método en comparación con los mismos se encuentran en la Tabla 35.

Tabla 35. Valores de diferencias entre los extractos de perezona para cada método

% Perezona en extracto	RF	US		CO ₂ SC			
	Reflujo 1.- 3 h	US 1.- 1h	US 2.- 30 m	CO ₂ SC 1.- 6 h	CO ₂ SC 2.- 10 h	CO ₂ SC 3.- 12 h	CO ₂ SC 4.- 24 h
Reflujo 1.- 3 h	0	49.26	58.65	24.31	49.44	57.83	50.86
US 1.- 1 h	49.26	0	9.38	24.95	0.17	8.56	1.59
US 2.- 30 m	58.65	9.38	0	34.33	9.20	0.81	7.79
CO ₂ SC 1.- 6 h	24.31	24.95	34.33	0	25.12	33.52	26.54
CO ₂ SC 2.- 10 h	49.44	0.17	9.20	25.12	0	8.39	1.41
CO ₂ SC 3.- 12 h	57.83	8.56	0.81	33.52	8.39	0	6.97
CO ₂ SC 4.- 24 h	50.86	1.59	7.79	26.54	1.41	6.97	0

A continuación, se resaltan cada uno de los métodos donde NDS: No tienen diferencia significativa y SDS: Si tienen diferencia significativa, respecto al porcentaje de perezona presente en el extracto.

Tabla 36. Diferencias significativas para la prueba de Tukey de la perezona presente en el extracto

% Perezona en extracto	RF	US		CO ₂ SC			
	Reflujo 1.- 3 h	US 1.- 1h	US 2.- 30 m	CO ₂ SC 1.- 6 h	CO ₂ SC 2.- 10 h	CO ₂ SC 3.- 12 h	CO ₂ SC 4.- 24 h
Reflujo 1.- 3 h	NDS	SDS	SDS	SDS	SDS	SDS	SDS
US 1.- 1 h	SDS	NDS	NDS	SDS	NDS	NDS	NDS
US 2.- 30 m	SDS	NDS	NDS	SDS	NDS	NDS	NDS
CO ₂ SC 1.- 6 h	SDS	SDS	SDS	NDS	SDS	SDS	SDS
CO ₂ SC 2.- 10 h	SDS	NDS	NDS	SDS	NDS	NDS	NDS
CO ₂ SC 3.- 12 h	SDS	NDS	NDS	SDS	NDS	NDS	NDS
CO ₂ SC 4.- 24 h	SDS	NDS	NDS	SDS	NDS	NDS	NDS

De acuerdo a la Tabla 36 se deduce que el US 1.- 1h y US 2.- 30 m, son estadísticamente iguales con los métodos CO₂ SC 2.- 10 h, CO₂ SC 3.- 12 h y CO₂ SC 4.- 24 h es decir no tienen diferencia significativa. Sin embargo los métodos que sí presentan diferencia significativa son Reflujo 1.- 3 h y CO₂ SC 1.- 6 h respecto al rendimiento que presenta el extracto de perezona.

Se realizó el mismo tratamiento para el cálculo porcentaje promedio perezona presente en la raíz se calculó la desviación estándar (S) y error estándar ($SE_{\bar{x}}$) de cada método se muestran en la Tabla 37, para posteriormente obtener la desviación estándar promedio de la perezona presente en raíz (ver Tabla 38).

Tabla 37. Cálculo de error estándar para perezona en la raíz

	Prom. perezona en raíz	S	$SE_{\bar{x}}$
Reflujo 1.- 3 h	0.8686	0.0830	0.0479
US 1.- 1 h	5.8175	0.1251	0.0722
US 2.- 30 m	6.5242	0.4601	0.2656
CO₂ SC 1.- 6 h	0.9705	0.1926	0.1112
CO₂ SC 2.- 10 h	2.1398	0.5490	0.3170
CO₂ SC 3.- 12 h	2.0422	0.5557	0.3209
CO₂ SC 4.- 24 h	2.1170	0.5027	0.2902

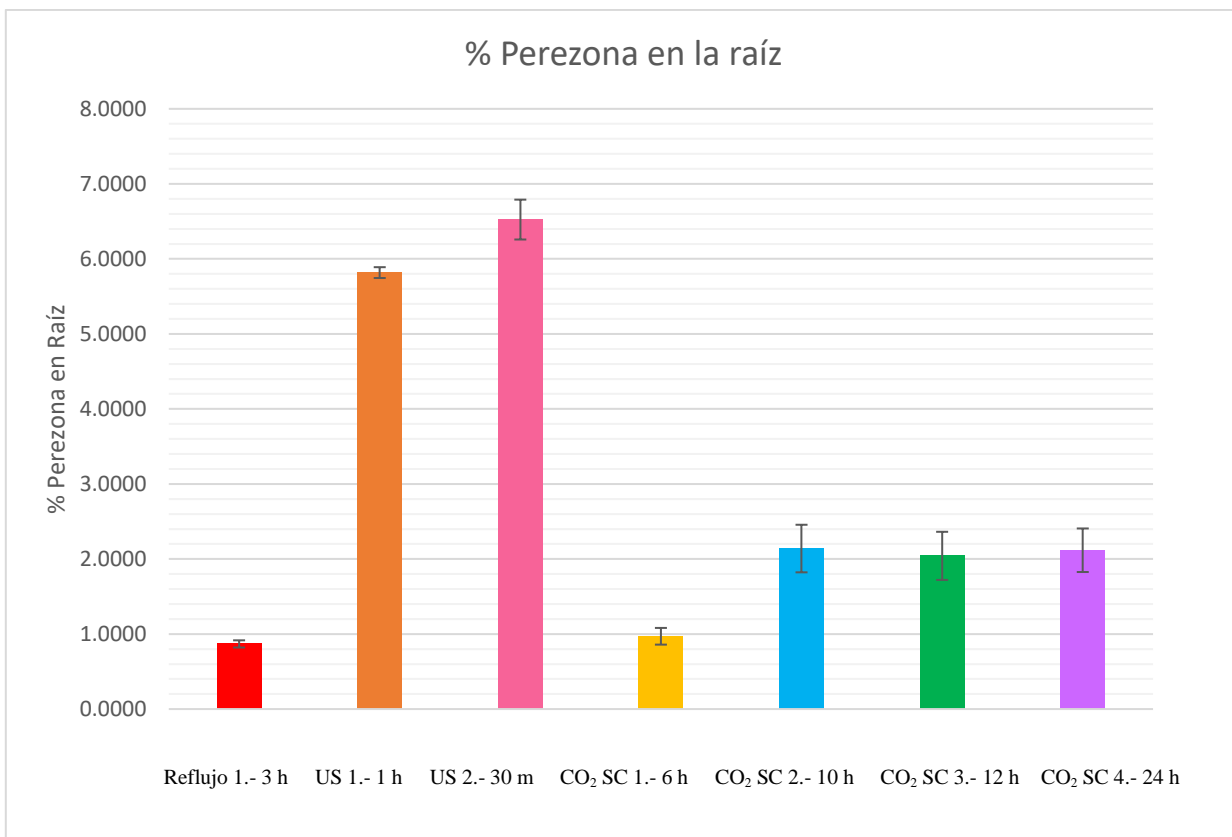
Tabla 38. Porcentaje de perezona en la raíz

$r^2_{raíz}$	88.99219297
$S_{raíz}$	3.9946

A continuación, se presentan los resultados del porcentaje de la extracción perezona en la raíz para cada método:

Como puede observarse en la Gráfica 2 el mejor método de extracción fue utilizando la sonicación US 2.- 60°C 30 m siendo mayor a 6.5% de perezona presente en raíz, así seguido por el US 1.- 60°C 1 h con un valor de 5.8% de extracción, dicho de otro modo con estas técnicas se obtiene el mejor rendimiento del proceso pero también podemos agregar a esto que se logró disminuir el tiempo comparado al método convencional de reflujo que se da por tres horas y que genera alrededor del 0.86% de extracción de perezona en raíz.

Los resultados en fluidos supercríticos tienen mayor extracción CO₂ SC 2.- 10 h y CO₂ SC 4.- 24 h ambos con 2.1%, CO₂ SC 3.- 12 h con 2%, CO₂ SC 1.- 6 h presenta 0.97%, los métodos por CO₂ SC brindan una calidad de cristales más puros y no tiene que esperar una cristalización ni hacer una purificación. Por último, el método convencional con 0.86% arroja el menor porcentaje de rendimiento del proceso.



Grafica 2. Porcentaje de la extracción perezona en la raíz para cada método

Siguiendo con el análisis se procedió a realizar, un análisis de varianza de un factor que se muestra en la Tabla 39, el análisis de varianza el cual se presenta en la Tabla 40, la prueba de Tukey (Tablas 41 y 42) de perezona en raíz y en la Tabla 43 se observa la validez estadística de los métodos comparados entre sí, del porcentaje de perezona contenida en la raíz.

Resumen	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Reflujo 1.- 3 h	1	3	2.6058	0.8686	0.0068
US 1.- 1 h	2	3	17.4525	5.8175	0.0156
US 2.- 30 m	3	3	19.5726	6.5242	0.2116
CO ₂ SC 1.- 6 h	4	3	2.9113	0.9704	0.0371
CO ₂ SC 2.- 10 h	5	3	6.4193	2.1397	0.3014
CO ₂ SC 3.- 12 h	6	3	6.1264	2.0421	0.3088
CO ₂ SC 4.- 24 h	7	3	6.3510	2.1170	0.2527

Las diferencias de los valores medios se analizaron mediante la prueba ANOVA y la diferencia significativa con la prueba de Tukey para los resultados, se utilizó una significancia estadística de $p < 0.05$.

Tabla 40. Análisis de varianza para perezona en la raíz

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	94.25	6	15.70	96.94	1.368E-10	2.84
Dentro de los grupos	2.26	14	0.16			
Total	96.52	20				

Tabla 41. Valores para Prueba de Tukey para perezona en la raíz

Error estándar de las medias	4.9647
Valor de T	3.58
Diferencia Significativa (Error Est.*T)	17.77

Las diferencias significativas respecto al porcentaje de perezona contenida en la raíz, de cada método en comparación con los mismos se encuentran en **Tabla 42**.

Tabla 42. Valores de diferencias entre cada método para perezona en la raíz

% Perezona en raíz	RF	US		CO ₂ SC			
	Reflujo 1.- 3 h	US 1.- 1h	US 2.- 30 m	CO ₂ SC 1.- 6 h	CO ₂ SC 2.- 10 h	CO ₂ SC 3.- 12 h	CO ₂ SC 4.- 24 h
Reflujo 1.- 3 h	0	4.94	5.65	0.10	1.27	1.17	1.24
US 1.- 1 h	4.94	0	0.70	4.84	3.67	3.77	3.70
US 2.- 30 m	5.65	0.70	0	5.55	4.38	4.48	4.40
CO ₂ SC 1.- 6 h	0.10	4.84	5.55	0	1.16	1.07	1.14
CO ₂ SC 2.- 10 h	1.27	3.67	4.38	1.16	0	0.09	0.02
CO ₂ SC 3.- 12 h	1.17	3.77	4.48	1.07	0.09	0	0.07
CO ₂ SC 4.- 24 h	1.24	3.70	4.40	1.14	0.02	0.074	0

A continuación, se muestra la prueba de Tukey de cada uno de los métodos donde, NDS: No tienen diferencia significativa y SDS: Si tienen diferencia significativa en cuanto al porcentaje de perezona contenida en la raíz.

Tabla 43. Diferencias significativas para la prueba de Tukey de la perezona contenida en la raíz

% Perezona en raíz	RF	US		CO ₂ SC			
	Reflujo 1.- 3 h	US 1.- 1h	US 2.- 30 m	CO ₂ SC 1.- 6 h	CO ₂ SC 2.- 10 h	CO ₂ SC 3.- 12 h	CO ₂ SC 4.- 24 h
Reflujo 1.- 3 h	NDS	SDS	SDS	NDS	SDS	SDS	SDS
US 1.- 1h	SDS	NDS	NDS	SDS	SDS	SDS	SDS
US 2.- 30 m	SDS	NDS	NDS	SDS	SDS	SDS	SDS
CO ₂ SC 1.- 6 h	NDS	SDS	SDS	NDS	SDS	SDS	SDS
CO ₂ SC 2.- 10 h	SDS	SDS	SDS	SDS	NDS	NDS	NDS
CO ₂ SC 3.- 12 h	SDS	SDS	SDS	SDS	NDS	NDS	NDS
CO ₂ SC 4.- 24 h	SDS	SDS	SDS	SDS	NDS	NDS	NDS

En la Tabla 43 se resalta que los métodos de Reflujo 1.- 3 h y CO₂ SC 1.- 6 h respecto a los rendimientos que presenta la perezona contenida en la raíz no tienen diferencia significativa entre ellos.

Por otro lado, el US 1.- 1h y US 2.- 30 m, son estadísticamente iguales entre ellos y los métodos CO₂ SC 2.- 10 h, CO₂ SC 3.- 12 h y CO₂ SC 4.- 24 h lo cuales no tienen diferencia significativa entre sí. Sin en cambio los métodos que si presentan diferencia significativa con respecto al rendimiento que presenta la perezona contenida en la raíz son Reflujo 1.- 3 h y CO₂ SC 1.- 6 h.

6.4 Análisis Comparativo del Consumo Energético de los Métodos Extracción de Perezona

También realizó un análisis del consumo energético de los diferentes métodos como se muestra en la Tabla 44, debido a que es importante para realizar una evaluación con los resultados anteriormente obtenidos.

Tabla 44. Comparación del consumo energético de los diferentes métodos

Extracción	Método	Requerimiento energético W h ⁻¹	Tiempo h	Muestra tratada mg	Consumo energético kJ
Clásica	Reflujo 1.- 3 h	152	3	5000	0.456
Ultrasonido	US 1.- 1 h	160	1	5000	0.160
	US 2.- 30 m		0.5	5000	0.080
CO ₂ SC	CO ₂ SC 1.- 6 h	100	6	20000	0.360
	CO ₂ SC 2.- 10 h	100	10		0.600
	CO ₂ SC 3.- 12 h	100	12		0.720
	CO ₂ SC 4.- 24 h	100	24		1.440

Para hacer la misma comparación los métodos de extracción clásica y US se multiplicaron para igualar la muestra tratada a 20000 mg, quedando para Reflujo 1.- 3 h = 1.8024 kJ, US 1.- 1h = 0.640 kJ y US 2.- 30 m = 0.320 kJ

Se observa que la extracción clásica es la que requiere mayor consumo energético con 1.8024 kJ, seguida de CO₂ SC 4.- 24 h con 1.440 kJ. Posteriormente de CO₂ SC 3.- 12 h , US 1.- 1h con 0.640 kJ, CO₂ SC 2.- 10 h y CO₂ SC 1.- 6 h respectivamente. El método que menor consumo energético presento fue US 2.- 30 m.

7 CONCLUSIONES

Para concluir los resultados de la extracción de perezona en la raíz mediante los tratamientos estudiados se muestran en la Grafica 2, en donde, la irradiación con US 2.- 30 m y 1 h obtuvieron un mayor porcentaje de perezona. En el caso de activación por ultrasonido la cual obtuvo mejores resultados, debido a que favorece la lisis celular facilitando la liberación de su contenido y por ende la extracción. Teniendo en cuenta que estos dos métodos antes mencionados permiten una mayor interacción entre el disolvente y los compuestos a extraer, se obtuvo que la cantidad de extracto es mayor en comparación con los tratamientos de CO₂ SC y el térmico convencional, cuyas cantidades de perezona extraída en la raíz fueron menores. Señalando que estos dos últimos requieren de tiempos de extracción prolongados y los rendimientos obtenidos son bajos.

Por otro lado, se conoce que la solubilidad de la perezona en bióxido de carbono supercrítico afecta de una manera directa las membranas celulares de los compuestos biológicos, puesto que esto permite que el disolvente penetre y lleve a cabo la extracción. Es importante señalar que la buena solubilidad presentada por la perezona en el dióxido de carbono supercrítico es una consecuencia de la naturaleza no polar del fluido, es decir del bióxido de carbono supercrítico permitiendo así, una mayor extracción de la perezona. En contraste la activación por el ultrasonido y el medio de reacción alterno CO₂ SC resultó en una cantidad de perezona menor, esto puede explicarse debido al tiempo en que ocurre la transferencia de masa entre la matriz, la muestra y el fluido de extracción permitiendo así que estos interactúen sencillamente con la muestra, debido a la densidad del fluido supercrítico las interacciones moleculares pueden ser fuertes permitiendo acortar las distancias intermoleculares. Como resultado, las propiedades de solvatación son similares a las de los líquidos, pero con coeficientes de difusión 10 a 100 veces más altos, esto se debe a que la transferencia de masa de solutos en extracciones con el bióxido de carbono supercrítico es significativamente más alta a diferencia de las extracciones con líquidos, en consecuencia, la eficiencia de extracción es mayor por una mejor penetración en la matriz.

Cómo se observa en la Grafica 1 la selectividad aumenta conforme aumenta el tiempo de interacción hasta las 12 h (del 1 al método 3 de CO₂ SC), en la Grafica 2 el rendimiento aumenta en 6 y 10 h, pero al llegar a las 12 y 24 h decrece por lo tanto la eficiencia de la activación se ve disminuida. El CO₂ SC es un disolvente poco polar y es importante destacar que es más fácilmente la separación de los solutos del fluido supercrítico. Esto no es posible en las extracciones convencionales en muchos casos, lo que crea contaminaciones indeseables del producto.

Cumpliendo así con los objetivos planteados y siguiendo los puntos de la QV puesto que se cumplen notoriamente dos de ellos, se logró realizar la extracción de: perezona a partir de la raíz de *Acourtia platyphylla* empleando un método no convencional de activación siendo

este el ultrasonido, además se obtuvo mejor selectividad y rendimiento de proceso, ambos utilizando un menor consumo energético con el US 2.- 30 m, también podemos agregar a esto que se logró disminuir el tiempo (comparado al método convencional) y un medio de reacción como el bióxido de carbono supercrítico con excelente selectividad y calidad debido a que los resultados en fluidos supercríticos tienen mayor extracción alrededor del 2%, 1.2% más que el reflujo convencional pero nos brindan una buena calidad de cristales, tanto como un considerable rendimiento de proceso (puesto que es mayor al tratamiento convencional) para las tres últimas variantes, y buen consumo energético para las tres primeras variantes. Sin embargo, la variante de CO₂ SC 1.-6 h fue similar en comparación al método de extracción clásica reflujo durante 3 h en cuanto a selectividad y rendimiento del proceso.

Como podemos observar en la Gráfica 1 el mejor método de extracción en cuanto a la selectividad fue utilizando la sonicación (US 2.- 30 m) con *n*-hexano como disolvente mayor a 78%, seguido por el CO₂ SC 3.- 12h con un 77% y de perezona en extracto con estos métodos se obtiene mayor cantidad de perezona y por ende tienen mejor selectividad. Después podemos observar al CO₂ SC 4.- 24 h con 70%, CO₂ SC 2.- 10 h y US 1.- 1 h con el 69% de perezona presente en extracto. El método convencional de Reflujo 1.- 3 h genero menor porcentaje de perezona y por lo tanto el que menor selectividad en extracto presenta en comparación con los otros métodos. Para evaluar la presencia de diferencias significativas entre las cantidades de perezona obtenidas por los distintos tratamientos se realizó un análisis estadístico con la prueba de Tukey empleando un intervalo de confianza del 95%. Los resultados de este tratamiento estadístico determinaron que los métodos de US 2.- 30 m y US 1.- 1h tienen una mayor cantidad de perezona extraída los cuales son estadísticamente iguales con los métodos CO₂ SC 2.- 10 h, CO₂ SC 3.- 12 h y CO₂ SC 4.- 24 h es decir no tienen diferencia significativa. En comparación al tratamiento convencional. Reflujo 1.- 3 h y CO₂ SC 1.- 6 h respecto a los rendimientos que presenta el extracto de perezona. Si presentan diferencia significativa (Tabla 36).

También se evaluó la igualdad estadística con respecto al rendimiento del proceso entre los métodos, el US 1.- 1h y US 2.- 30 m, la cantidad de perezona contenida en la raíz los cuales son estadísticamente iguales entre ellos y los métodos CO₂ SC 2.- 10 h, CO₂ SC 3.- 12 h y CO₂ SC 4.- 24 h en los que no hay diferencia significativa entre sí. Sin embargo los métodos que si presentan diferencia significativa son CO₂ SC 1.- 6 h. y Reflujo 1.- 3 h en comparación son estadísticamente similares pero el tratamiento térmico convencional requiere un menor tiempo (Tabla 43).

Cumpliendo con el protocolo de Química Verde, haciendo énfasis en los *principios 5 y 6* se cubrieron plenamente los objetivos iniciales planteados, se logró llevar a cabo un análisis de la extracción de perezona con una fuente alterna de energía (US) y con un medio alterno de reacción (CO₂ SC), ambos tienen incidencias sobre el desarrollo de nuevas metodologías para la extracción de un producto natural de interés farmacológico.

8 REFERENCIAS

- [1] Río de la Loza L., *Discurso pronunciado por el catedrático de química médica de la Escuela de Medicina* (noviembre 23, 1852). In: Noriega J. M. (Compilador), *Escritos de Leopoldo Río de la Loza*, Imprenta de Ignacio Escalante, México. (1911).
- [2] (a) Alarcón Aguilar FJ., Román Ramos R., Jiménez Estrada M., Reyes Chilpa R., González Paredes B., Flores Sáenz J. L., *Effects of three Mexican medicinal plants (Asteraceae) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits*. *Journal of Ethnopharmacology*, 55, 171-177., (1997).
- (b) Enríquez R., Ortega J., Lozoya X., *Active components in perezia roots*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2, 389-393., (1980).
- (c) Nathan-Joseph P, Mendoza V, García E *The chemistry of perezone and its consequences*. In *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta-ur-Rahman, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, vol. 5, Structural Elucidation (Part B), 763-813. (1989)
- (d) De La Peña A., Izaguirre R., Baños G., Viveros M., Enríquez R. G., Fernández J. M., *Effect of perezone, aminoperezone and their corresponding isomers isoperezone and isoaminoperezone upon in vitro platelet aggregation*. *Phytomedicine*, 8, 465-468. (2001).
- [3] (a) Martínez J., Velasco Bejarano B., Delgado F, Pozas R., Torres Domínguez HM, Trujillo Ferrara JG, Arroyo GA, Miranda R *Eco-contribution to the chemistry of perezone, a comparative study, using different modes of activation and solventless conditions.*, (2008)
- (b) Burgueño Tapia E., Castillo L., González Coloma A, Nathan Joseph P., *Antifeedant and phytotoxic activity of the sesquiterpene p-benzoquinone perezone and some of its derivatives*. *Journal of chemical ecology*, 34., (2008).
- (c) Sánchez Torres L.E., Torres Martínez J. A., Godínez Victoria M., Martínez J. Omar, Velasco Bejarano B., *Perezone and its isomer isoperezone induce caspase-dependent and caspase-independent cell death*. *Phytomedicine*, 17, 614-620., (2010).
- (d) Concepción Lozada M., Soria Arteche O., Ramírez Apan M. T., Nieto Camacho A., Enríquez R. G., Izquierdo T., Jiménez Corona A., *Synthesis, cytotoxic and antioxidant evaluations of amino derivatives from perezone*. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 20. (2012).
- [4] Aceves Pastrana (compilador)., *Leopoldo Rio de la Loza y su tiempo*. Universidad Autónoma de Mexico, México. D. F., (2011).
- [5] Miranda R., *Prácticas de laboratorio de química orgánica verde*, Editorial tecnológica de Costa Rica. (2010).
- [6] Anastas P.T., Warner J.C., *Green Chemistry: Theory and Practice*, vol 30, Oxford University press; Oxford, New York, (2000).
- [7] Mestres R. *Química sostenible: naturaleza, fines y ámbito educación química green and sustainable chemistry: nature, aims and scope*. Volume 24, Supplement 1, (2013).
- [8] Kerton, F. M.; Marriott, R. *Alternative Solvents for green Chemistry*, 2nd Edition.; Royal society of chemistry, Ed.; RCS Publishing; Cambridge, UK., (2013).

- [9] Arias V. A. & Ramírez P. E., *Obtención de Extractos con CO2 Supercrítico a escala piloto de la especies: Rosmarinus officinalis, Salvia officinalis y Psidium Guajava.* (Tesis) Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia. (2012).
- [10] Ruiz S. P., *Aplicación del dióxido de carbono supercrítico al procesado de alimentos: nata, subproductos del refinado de aceites vegetales y zumo de naranja* (Tesis) Universidad complutense de Madrid, Madrid, España. (1996).
- [11] Escobedo González René, *Acercamiento verde a la química de la perezona* (Tesis) Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México. (2018).
- [12] Escobedo, R., Miranda, R., & Martínez, J., *Infrared irradiation: toward green chemistry, a review.* International journal of molecular sciences, 17(4). (2016).
- [13] Cabildo Miranda P.; Cornago Ramirez, P; Escolástico León, C; Esteban Santos, S; Farrán Morales, M.a; Pérez Torralba, M; Sanz del Catillo, D., *Procesos orgánicos de bajo impacto ambiental química verde.* Editorial UNED. España. (2006).
- [14] Dr. José Guillermo Penieres, *Medios alternos para activar reacciones.* UNAM. Recuperado en línea el [10/02/2018] en : <https://slideplayer.es/slide/10275081/>
- [15] *Dispositivos fonónicos para el control del sonido y del calor.* Recuperado en línea el [10/02/2018] en :<https://francis.naukas.com/2013/11/20/fonones/>
- [16] Robles O., Ochoa M., *Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos.* Revista Iberoamericana de tecnología postcosecha, vol. 13, núm. 2., S.C., Hermosillo, México. (2012).
- [17] Kharisov B., Ortiz U., *Uso del ultrasonido en procesos químicos,* Ingenierías, Septiembre, Vol. II, No.5 pág. 13,14. (1999).
- [18] Arellano J, Vázquez F, Villegas T, Hernández G. *Establishment of transformed root cultures of perezia cuernavacana producing the sesquiterpene quinone perezone.* Plant Cell Reports, 15. (1996).
- [19] Escobedo González René, Vargas Requena Claudia Lucia, Moyers Montoya Edgar, Aceves Hernández Juan Manuel, Nicolás Vázquez María Inés, Miranda Ruvalcaba René, *In silico study of the pharmacologic properties and cytotoxicity pathways in cancer cells of various Indolylquinone analogues of perezone,* 22(7): 1060. (2017).
- [20] Arellano J. & Hernández G., *Genetic transformation of perezia species.* Biotechnology in agriculture and forestry, Vol.45. Transgenic medicinal plants, springer verlag, Berlin Heidelberg. (1999).
- [21] James L. Reveal y Robert M. King, *Re-establecimiento de Acourtia D. Don.,* Departamento de botánica, museo nacional de historia natural, Institución Smithsonian, Washington, D. C. (1973).
- [22] Andrade Y. *Proceso de extracción supercrítica del aceite esencial de pimienta de Jamaica (Pimenta Dioica l. Merrill)* (Tesis). Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México. (2017).
- [23] Gibaja S., *Pigmentos naturales quinónicos,* UNMSM Fondo Editorial, Lima, Perú, (1998)

9 APENDICE

9.1 Condiciones experimentales

LC/MS/MS

Waters Acquity SDS Method

Run Time: 5.00 min
Comment:
Solvent Selection A: A1
Solvent Selection B: B1
Low Pressure Limit: 0 psi
High Pressure Limit: 15000 psi
Solvent Name A: Water0.01%FormicAcid
Solvent Name B: Acetonitrile 0.01% Formic acid
Switch 1: No Change
Switch 2: No Change
Switch 3: No Change
Seal Wash: 5.0 min
Chart Out 1: System Pressure
Chart Out 2: %B
System Pressure Data Channel: No
Flow Rate Data Channel: No
%A Data Channel: No
%B Data Channel: No
Primary A Pressure Data Channel: No
Accumulator A Pressure Data Channel: No
Primary B Pressure Data Channel: No
Accumulator B Pressure Data Channel: No
Degasser Pressure Data Channel: No
[Gradient Table]
Time(min) Flow Rate %A %B Curve
1. Initial 0.600 99.0 1.0 Initial
2. 1.20 0.600 99.0 1.0 6
3. 3.80 0.600 10.0 90.0 6
4. 4.00 0.600 10.0 90.0 6
5. 4.10 0.600 99.0 1.0 6
6. 5.00 0.600 99.0 1.0 6
Run Events: Yes
Gradient Start (Relative to Injection): 0 uL
Participate in pre-analysis: No

Waters Acquity Autosampler Method

Run Time: 5.00 min
Comment:
Load Ahead: Disabled
Injection Mode: Partial Loop
LoopOffline: Disable
Weak Wash Solvent Name: Water/Acetonitrile
Weak Wash Volume: 900 uL
Strong Wash Solvent Name: Acetonitrile
Strong Wash Volume: 300 uL
Target Column Temperature: 30.0 C
Column Temperature Alarm Band: Disabled
Target Sample Temperature: 10.0 C
Sample Temperature Alarm Band: Disabled
Full Loop Overfill Factor: Automatic
Syringe Draw Rate: Automatic
Needle Placement: 0.1
Pre-Aspirate Air Gap: Automatic
Post-Aspirate Air Gap: Automatic
Column Temperature Data Channel: No
Ambient Temperature Data Channel: No
Sample Temperature Data Channel: No
Sample Organizer Temperature Data Channel: No
Sample Pressure Data Channel: No
Switch 1: No Change
Switch 2: No Change
Switch 3: No Change

```
Switch 4: No Change
Chart Out: Sample Pressure
Sample Temp Alarm: Disabled
Column Temp Alarm: Disabled
Run Events: Yes
Needle Overfill Flush: Automatic
NoInjection: false
End Of Report

Initial States
Stop flow                No Change
Switch 2                 No Change
Switch 3                 No Change
Switch 4                 No Change
Infusion                 No Change
Flow state               LC
Flow rate                5 µl/min
Reservoir                No Action
Refill                   No Action
API Probe Delay Temp    20 °C

Run events                Yes

Number Of Functions      4

Function 1 : MRM of 3 mass pairs, Time 0.00 to 5.00, ES+ (PEREZONE)

Type                     MRM
Ion Mode                  ES+
Inter Channel Delay (sec) -1.000
InterScan Time (sec)     -1.000
Span (Da)                 0.1
Start Time (min)          0.0
End Time (min)            5.0
Ch  Prnt(Da)  Dau(Da)  Dwell(s)  Cone(V)  Coll(eV)  Delay(s)  Compound
1   249.20    153.20    0.008    15.00    15.00    -1.000    PEREZONE
2   249.20    193.15    0.008    15.00    15.00    -1.000    PEREZONE
3   249.20    231.20    0.008    15.00    15.00    -1.000    PEREZONE

Function 2 : Daughter Scan, Time 0.00 to 5.00, Mass 50.00 to 350.00 ES+

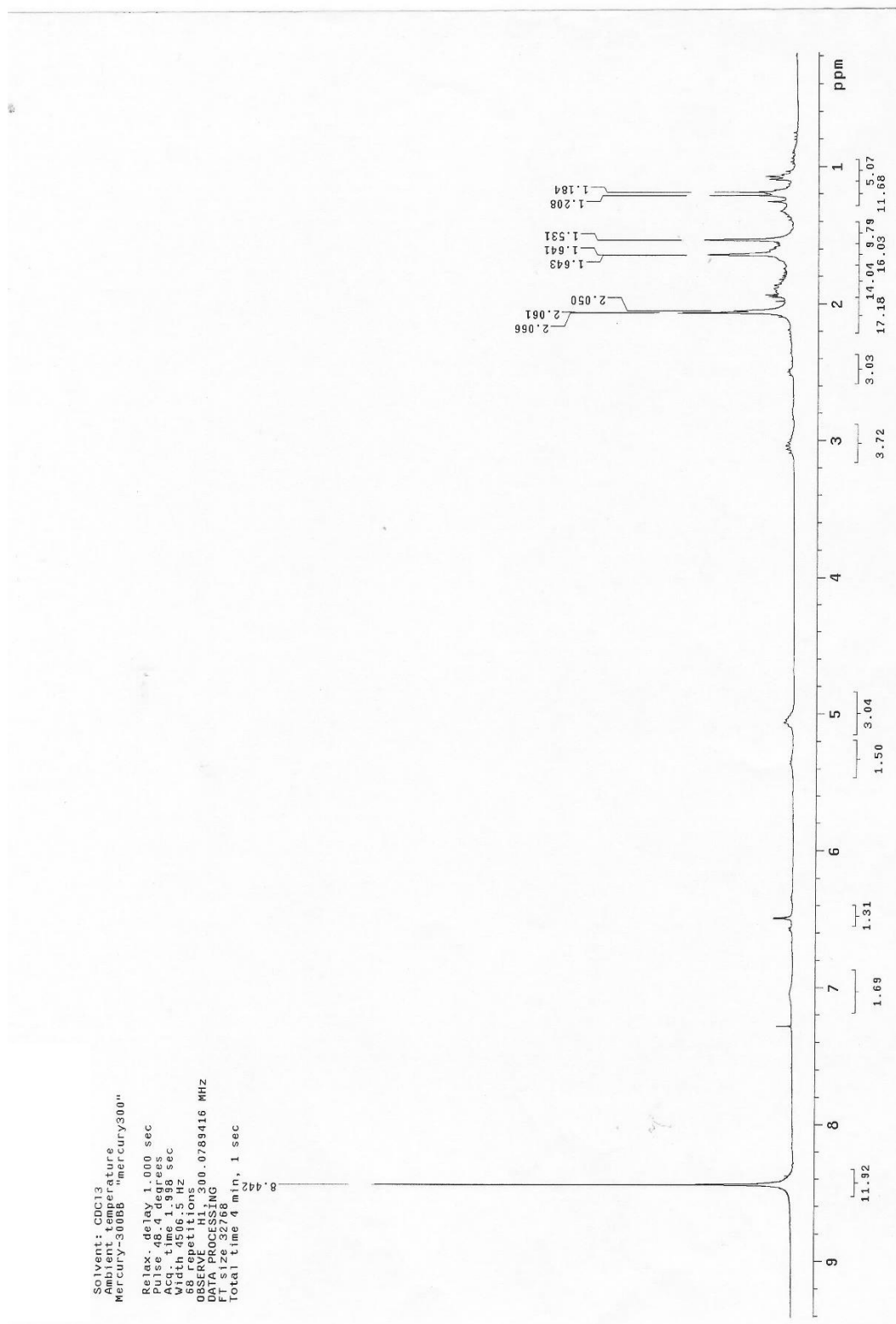
Daughters of             249.2
Type                     Daughter Scan
Ion Mode                  ES+
Data Format                Continuum
Start Mass                50.0
End Mass                  350.0
Scan Time (sec)           0.10
InterScan Time (sec)     -1.00
Start Time (min)          0.0
End Time (min)            5.0
Cone Voltage (V)          15.0
Collision Energy (eV)     20.0
```

RMN ¹H

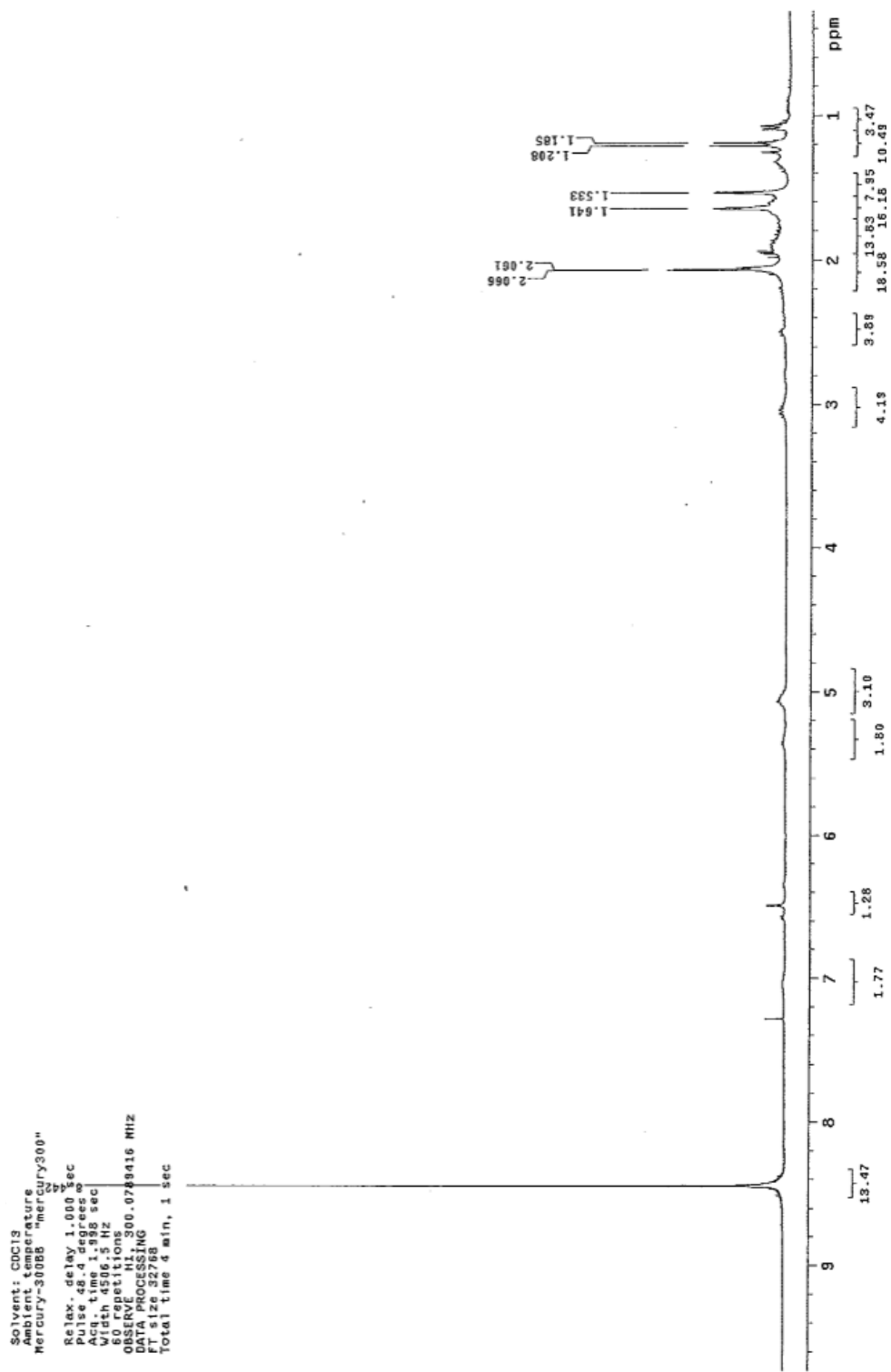
```
Pulse Sequence:
Solvent: CDC13
Ambient temperature
Mercury-300BB "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 48.4 degrees
Acq. time 1.998 sec
Width 4506.5 Hz
48 repetitions
OBSERVE H1, 300.0789444 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 4 min, 1 sec
```

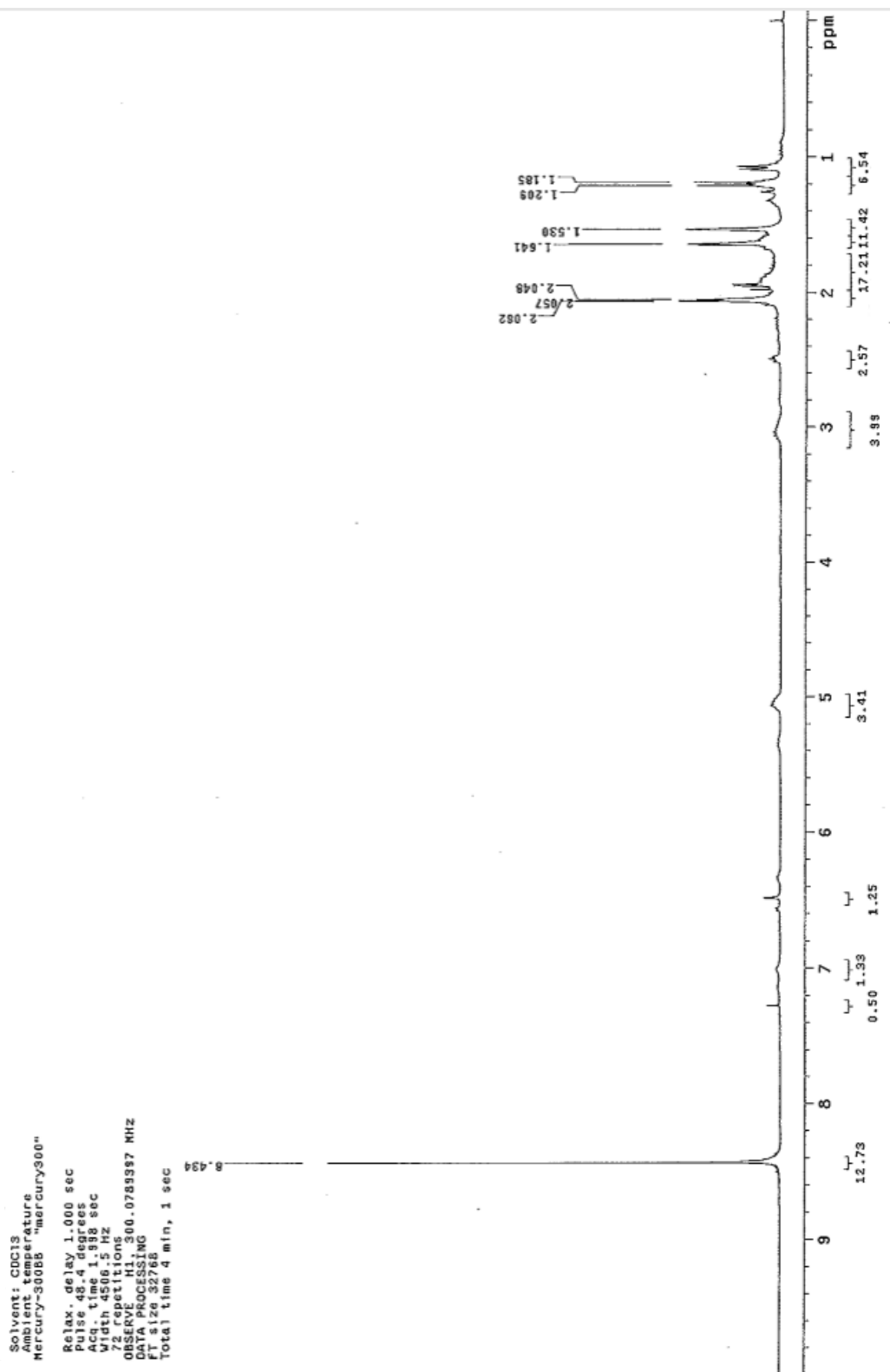

9.2 Espectros RMN ^1H



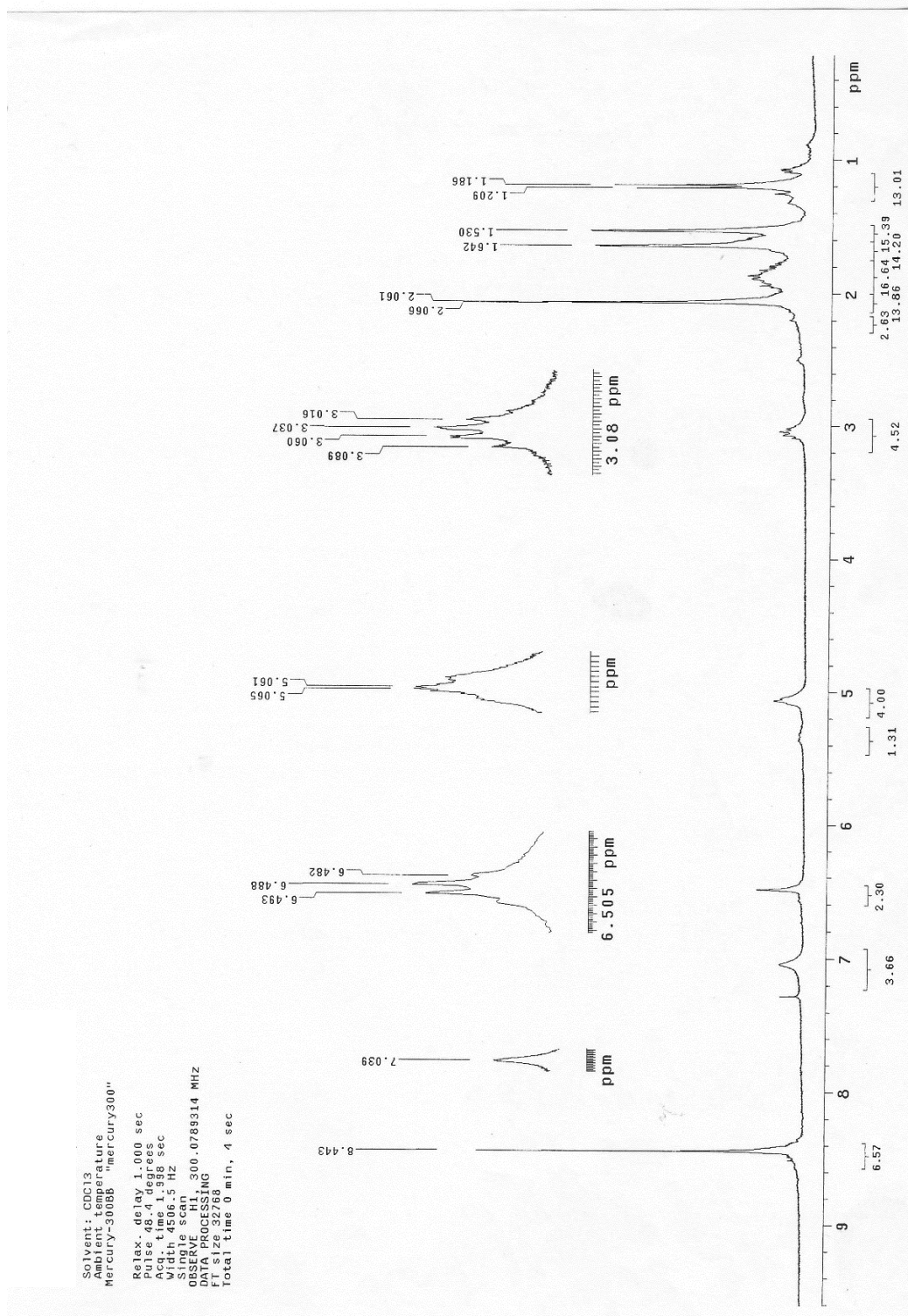
Espectro 1 de RMN ^1H (CDCl₃) a 300 MHz, de la extracción con Reflujo 1.- 3 h



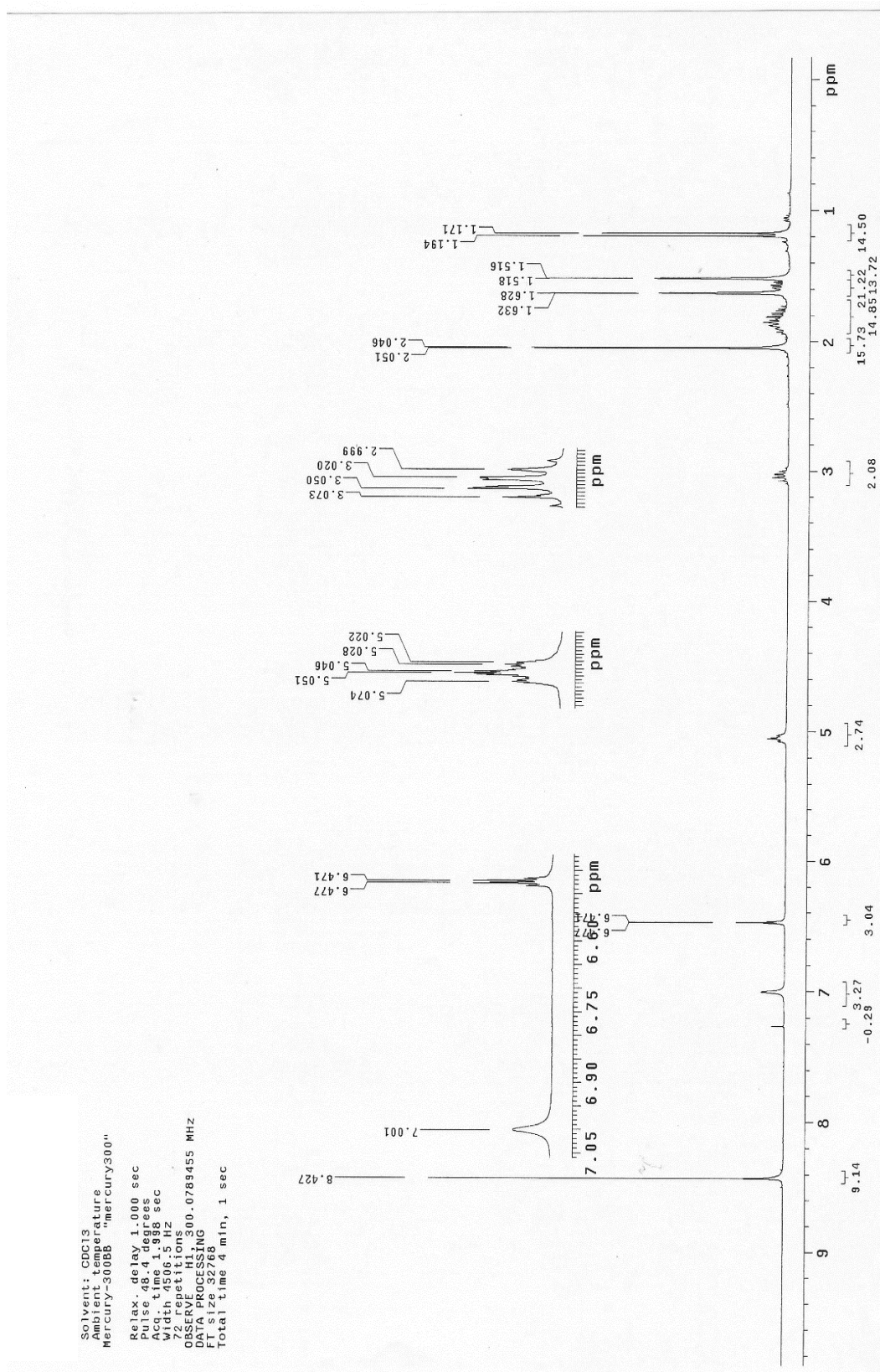
Espectro 2 de RMN ¹H (CDCl₃) a 300 MHz, de la extracción con Reflujo 1.- 3 h



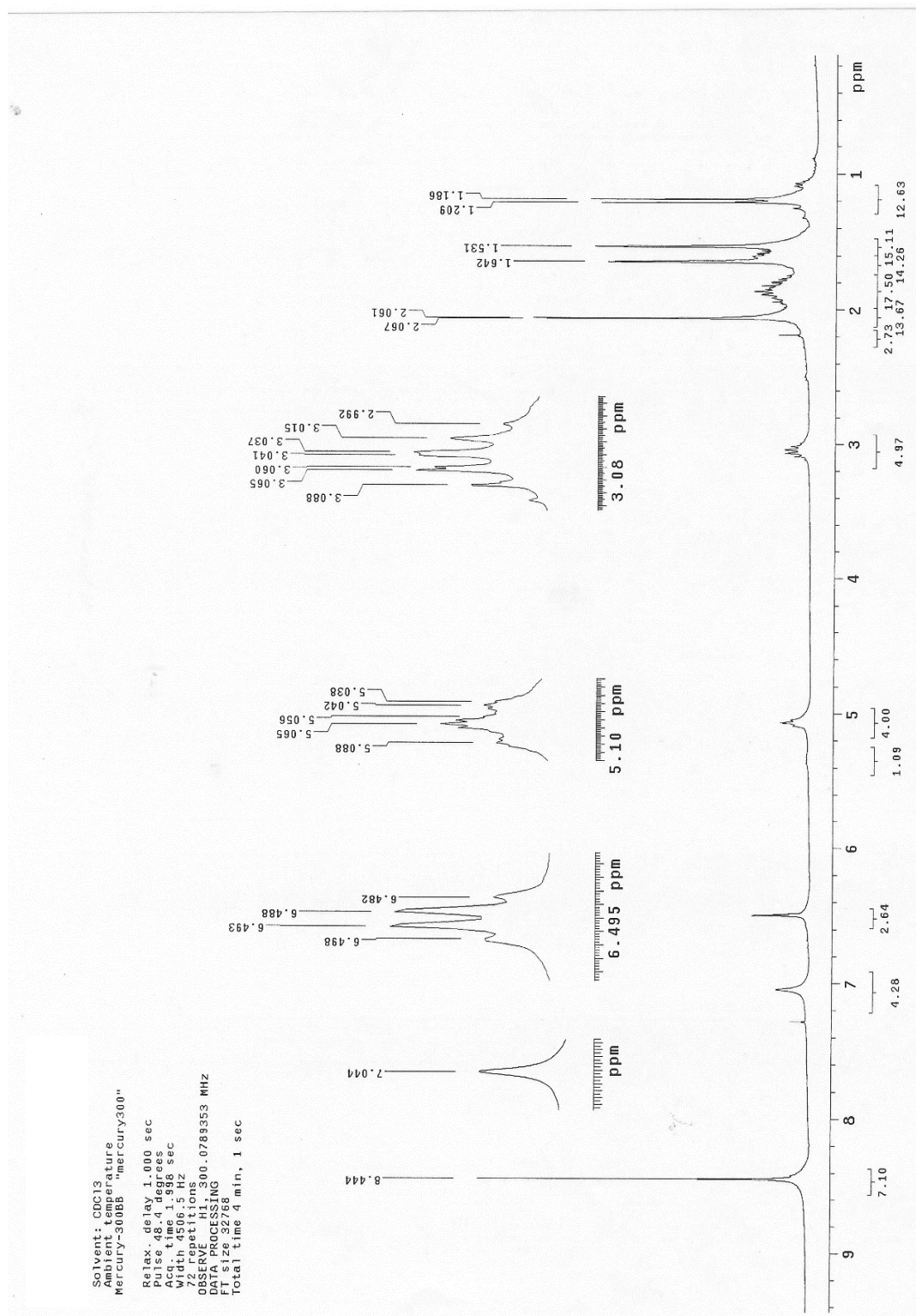
Espectro 3 de RMN ^1H (CDCl_3) a 300 MHz, de la extracción con Reflujo 1.- 3 h



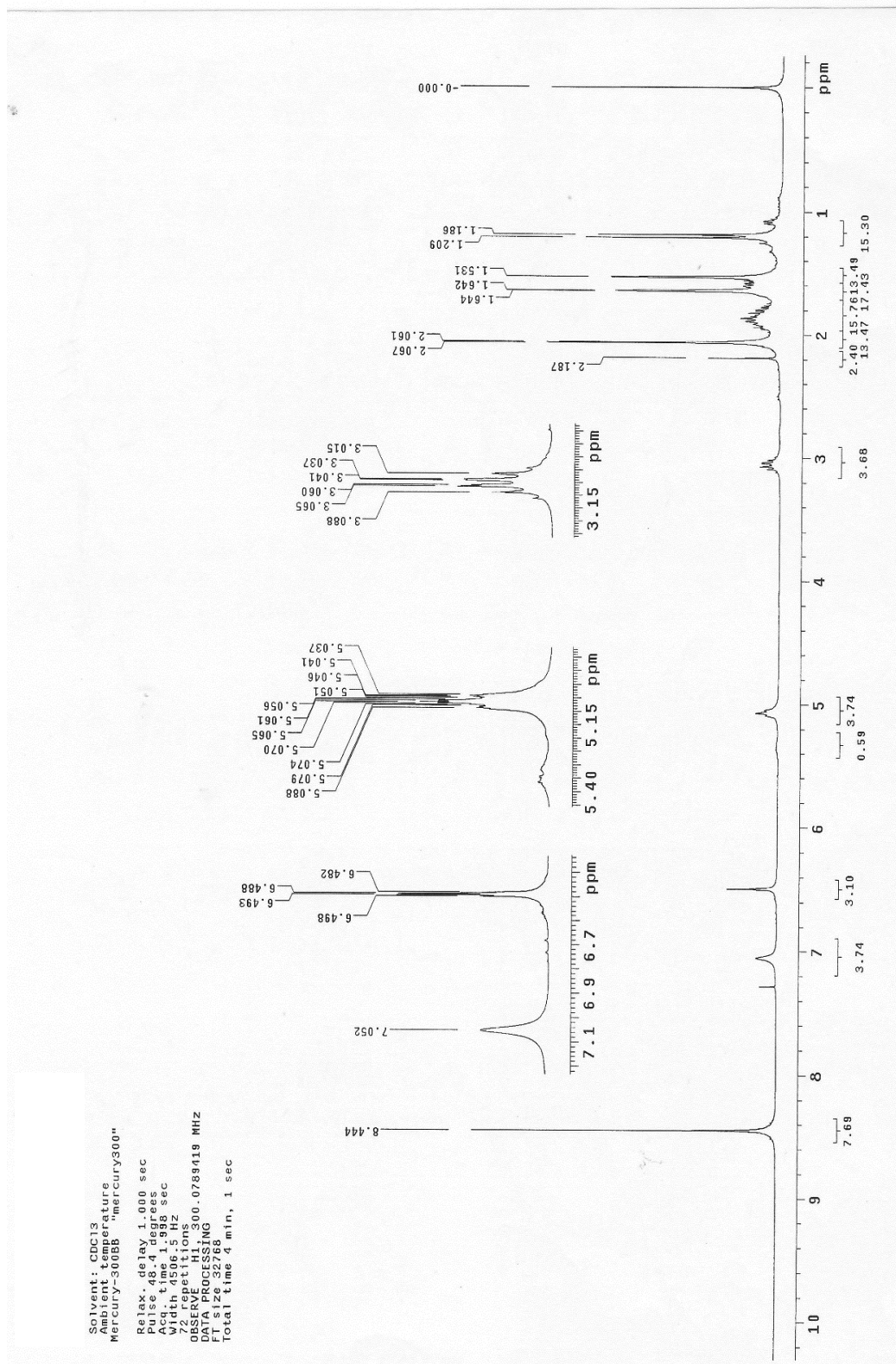
Espectro 4 de RMN ¹H (CDCl₃) a 300 MHz, de la extracción con US 1.- 1 h



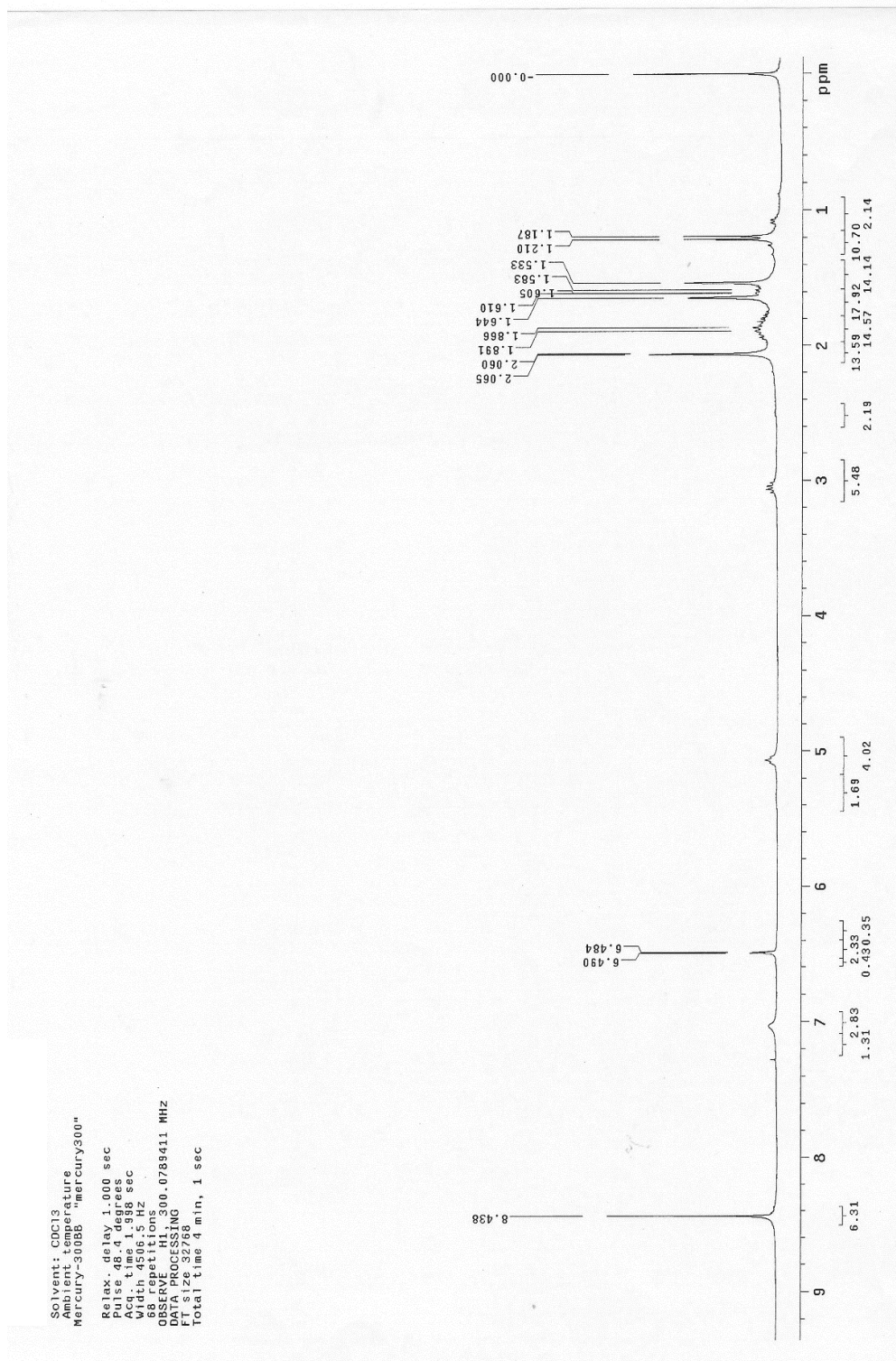
Espectro 5 de RMN ¹H (CDCl₃) a 300 MHz, de la extracción con US 1.- 1 h



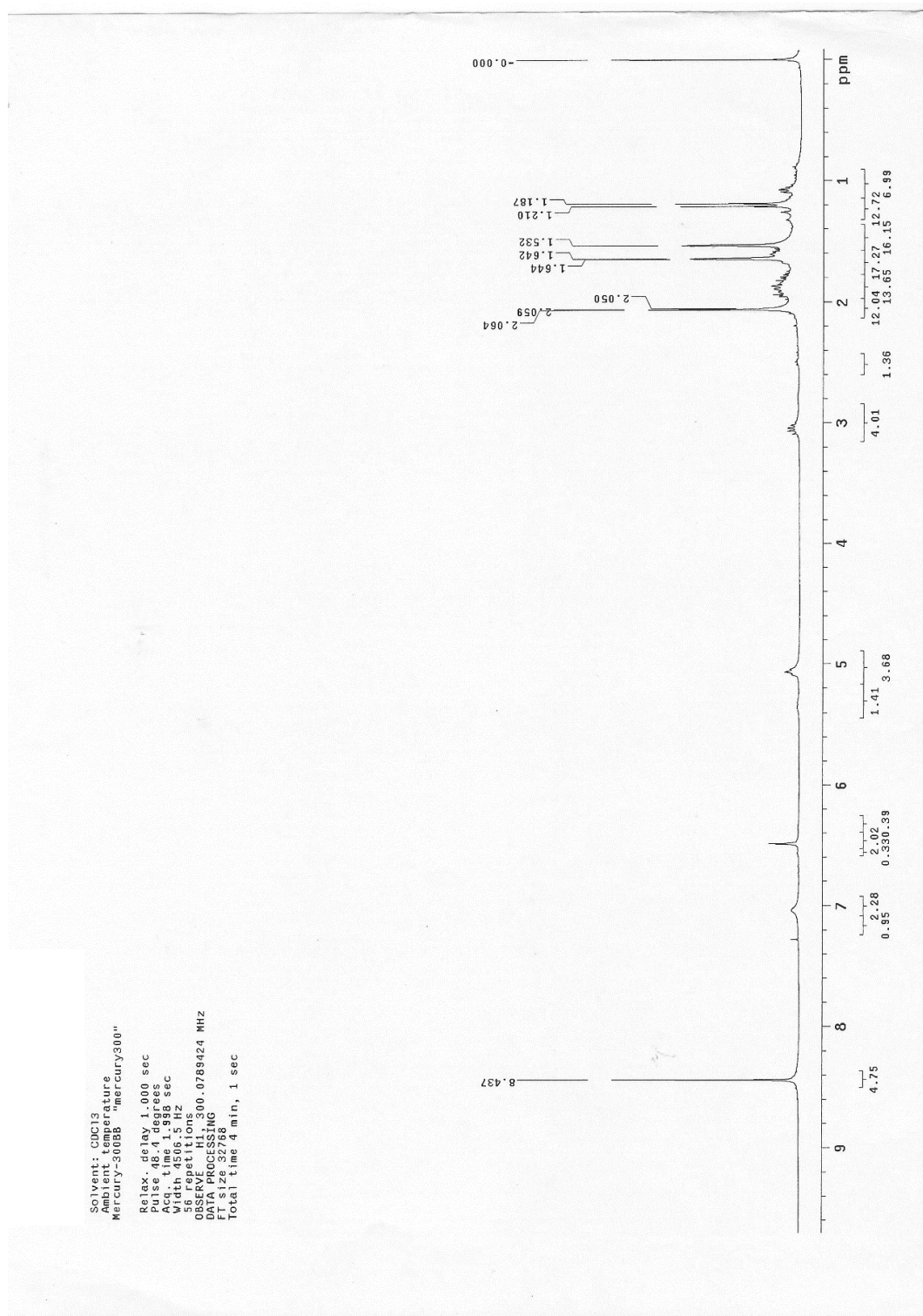
Espectro 6 de RMN ¹H (CDCl₃) a 300 MHz, de la extracción con US 1.- 1 h



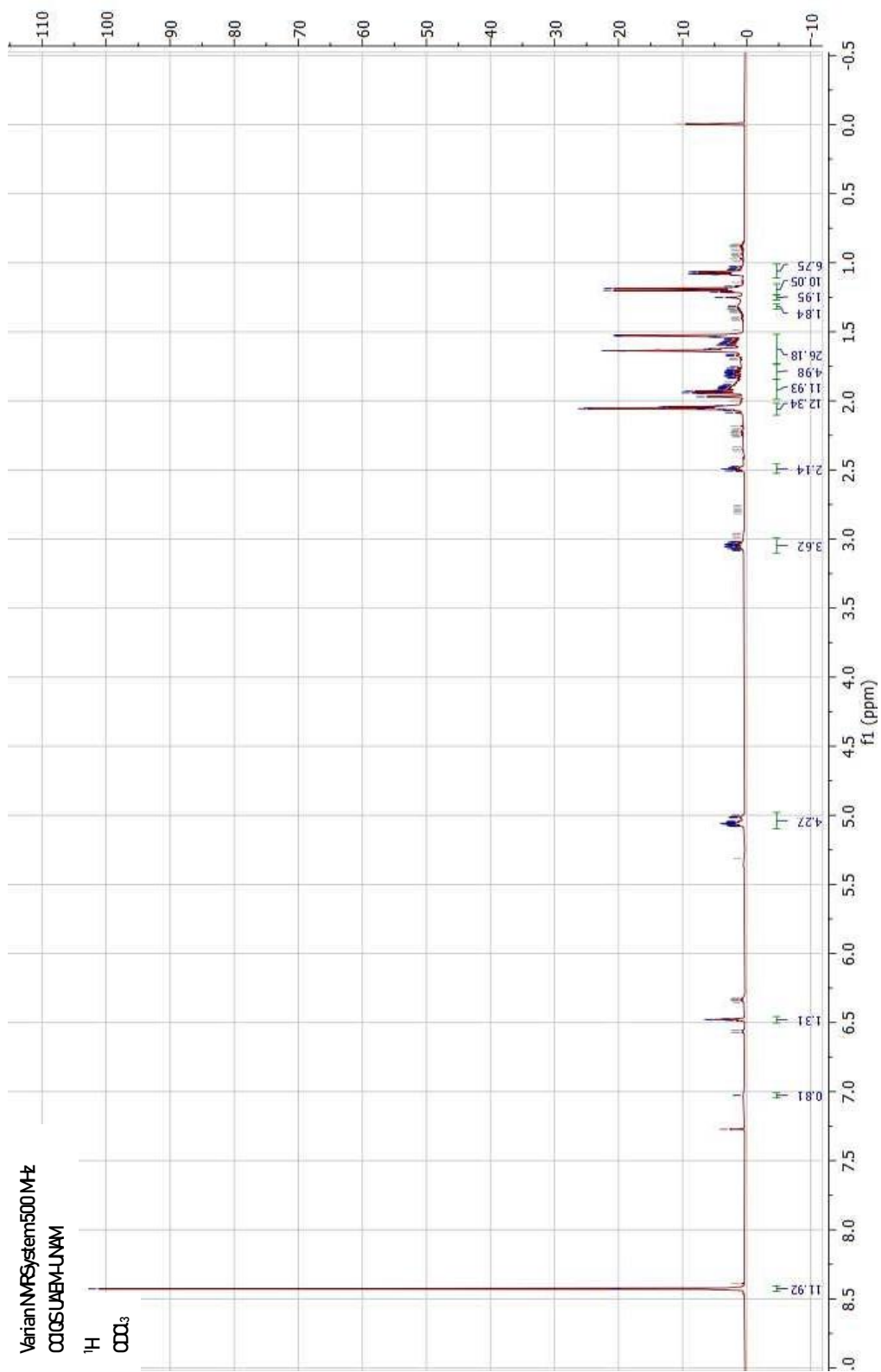
Espectro 7 de RMN ¹H (CDCl₃) a 300 MHz, de la extracción con US 2.- 30 m



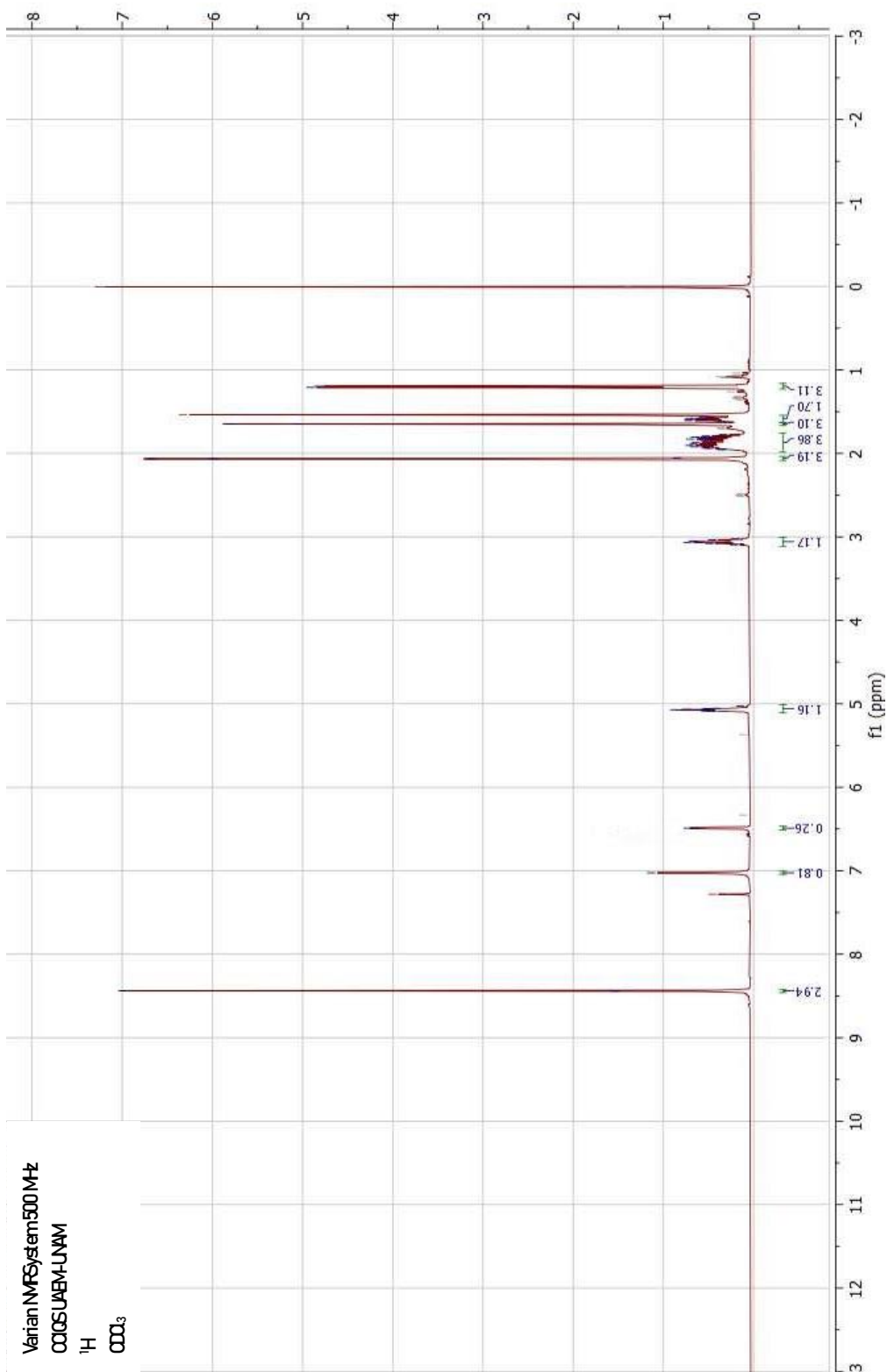
Espectro 8 de RMN ^1H (CDCl_3) a 300 MHz, de la extracción con US 2.- 30 m



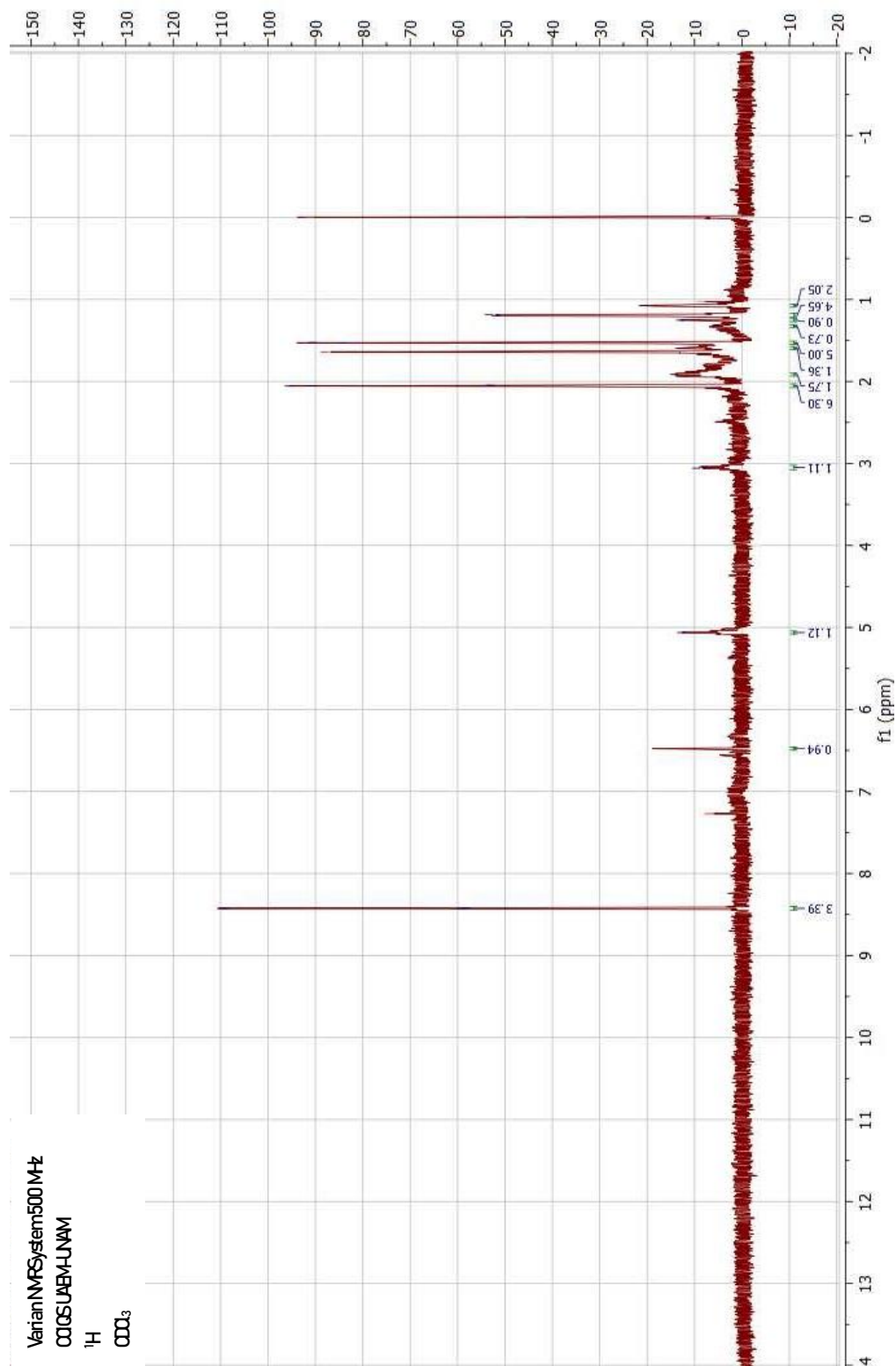
Espectro 9 de RMN ^1H (CDCl_3) a 300 MHz, de la extracción con US 2.- 30 m



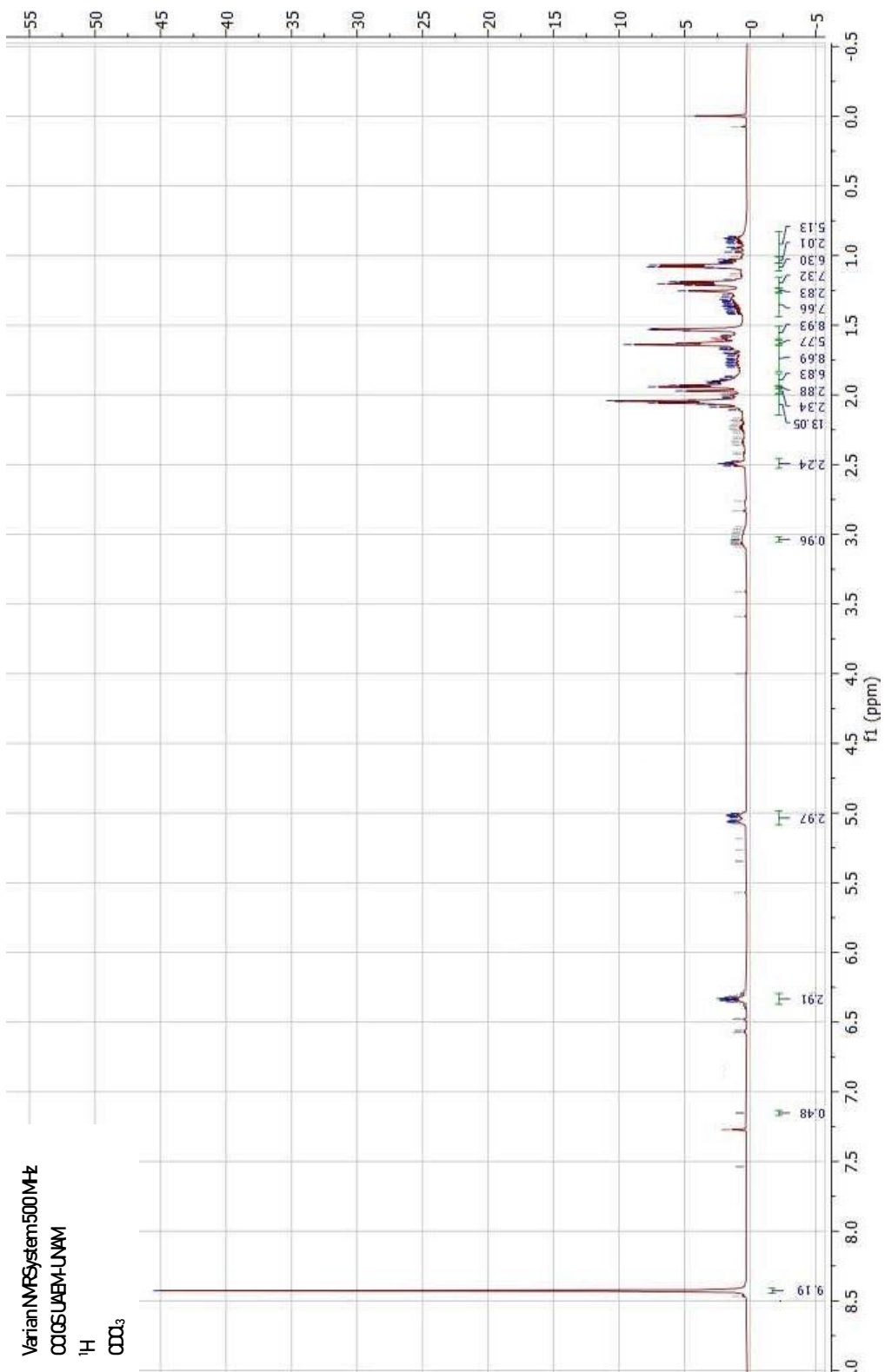
Espectro 10 de RMN ¹H (CDCl₃) a 500 MHz, de la extracción con CO₂ SC 1.- 6 h



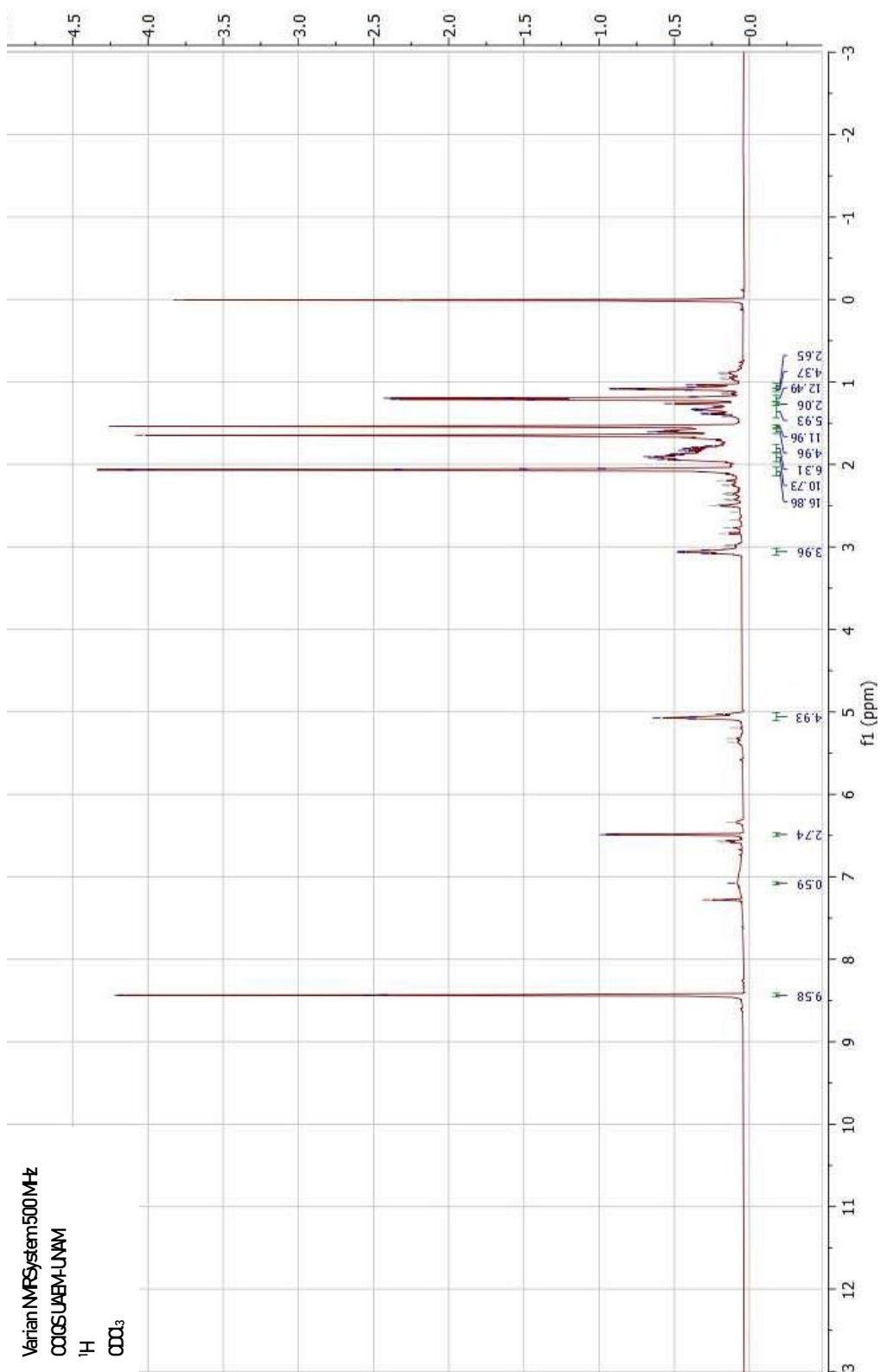
Espectro 11 de RMN ¹H (CDCl₃) a 500 MHz, de la extracción con CO₂ SC 1.- 6 h



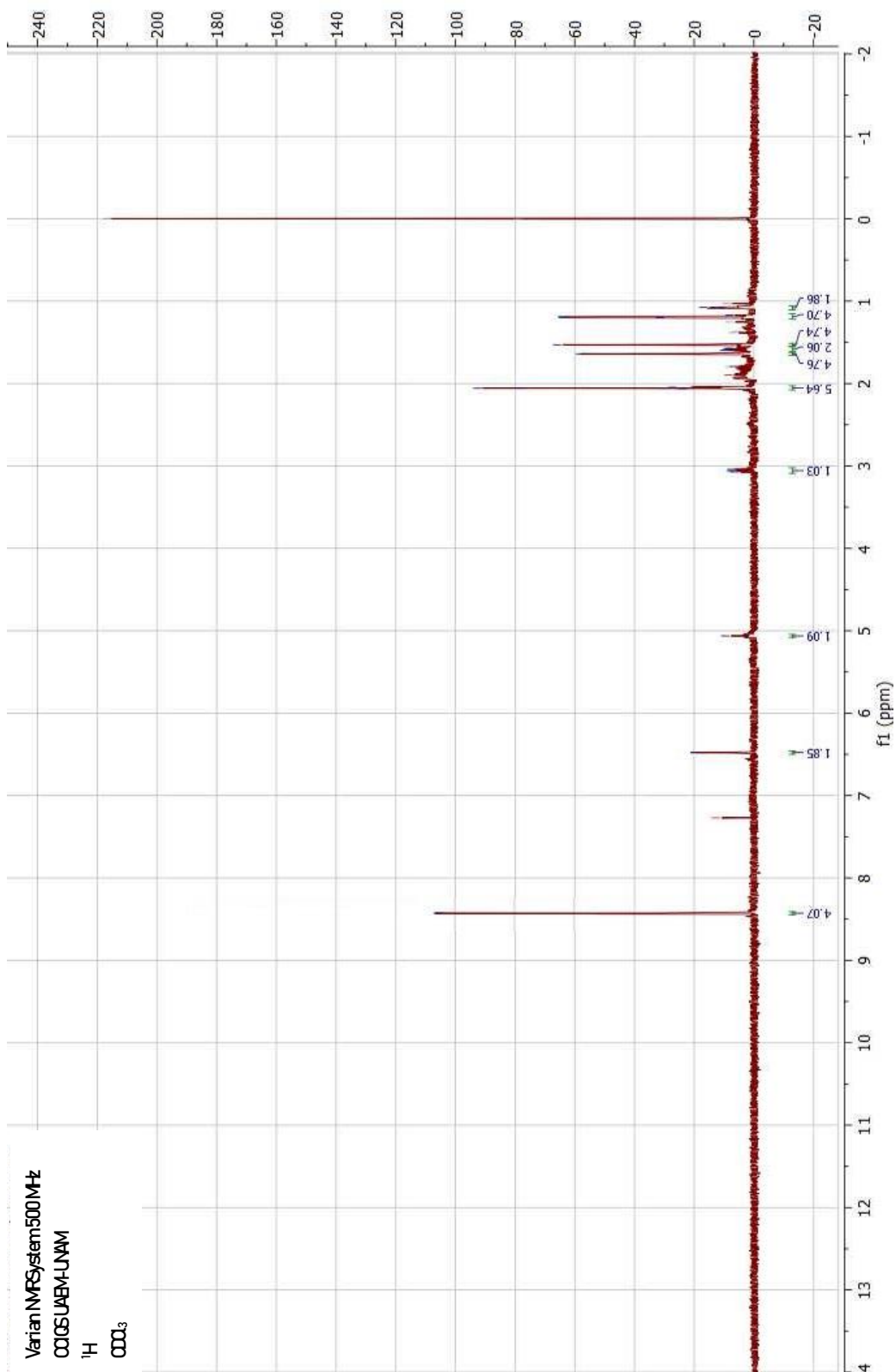
Espectro 12 de RMN ¹H (CDCl₃) a 500 MHz, de la extracción con CO₂ SC 1.- 6 h



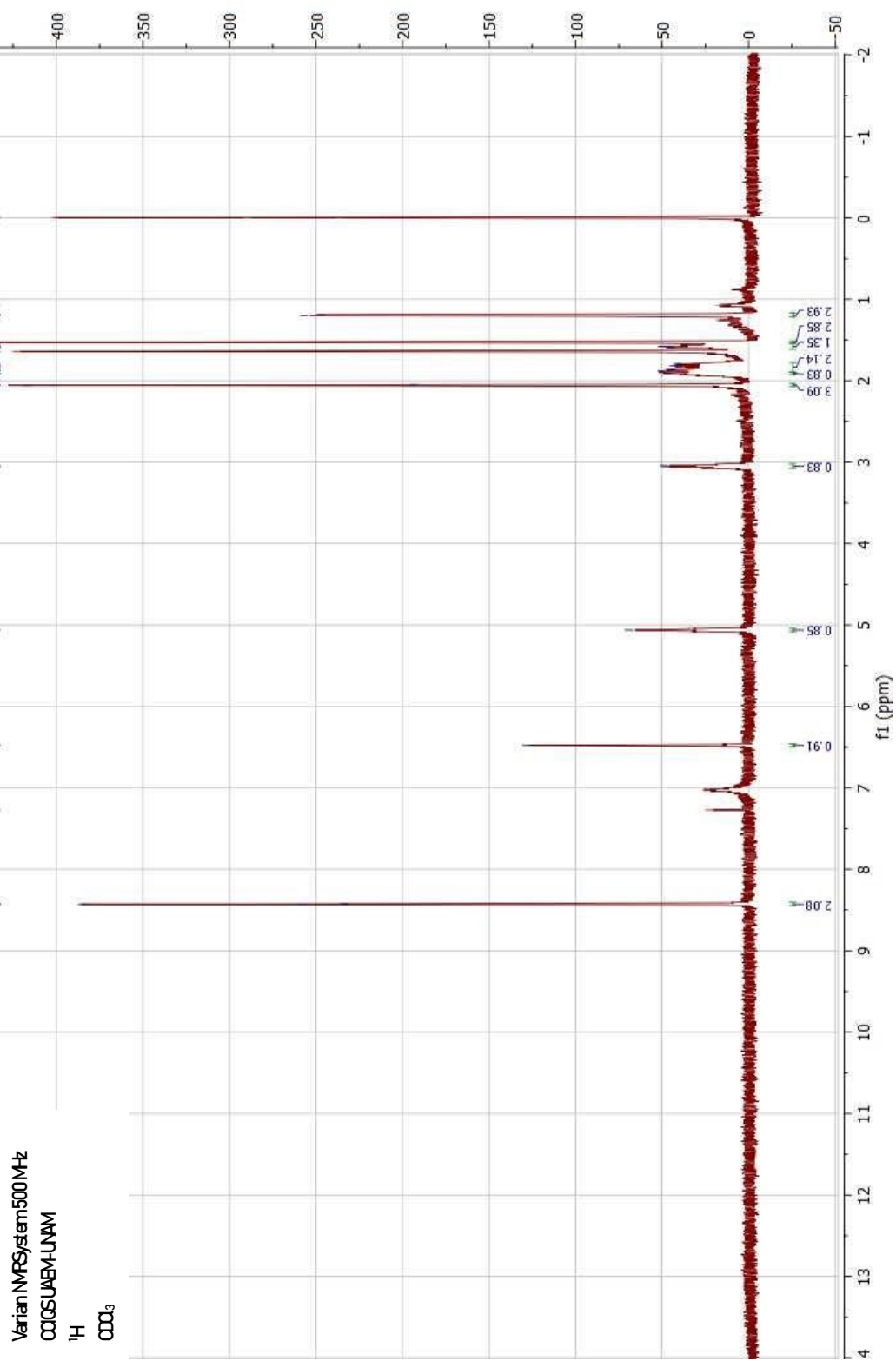
Espectro 13 de RMN ¹H (CDCl₃) a 500 MHz, de la extracción con CO₂ SC 2.- 10 h



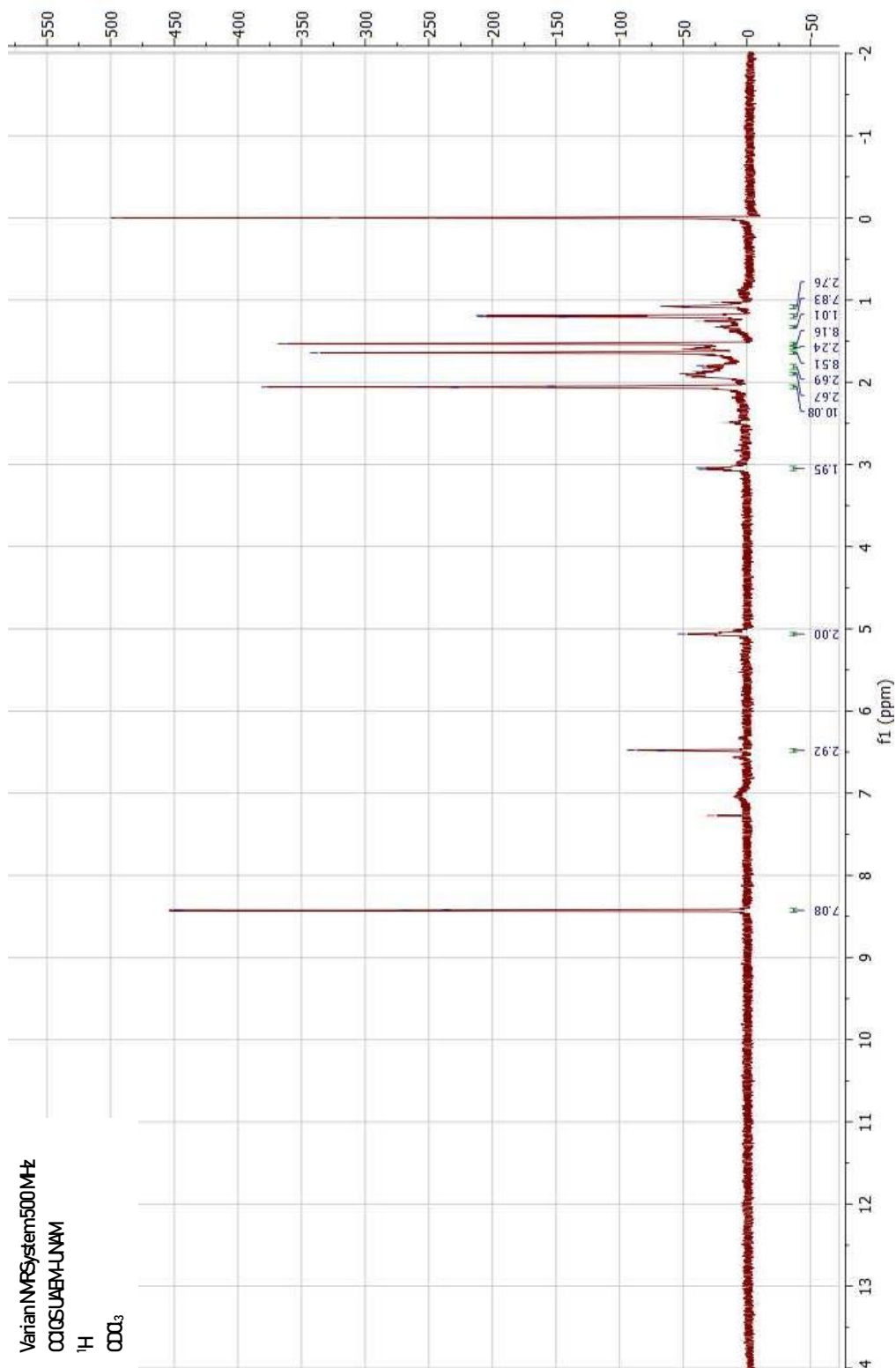
Espectro 14 de RMN ¹H (CDCl₃) a 500 MHz, de la extracción con CO₂ SC 2.- 10 h



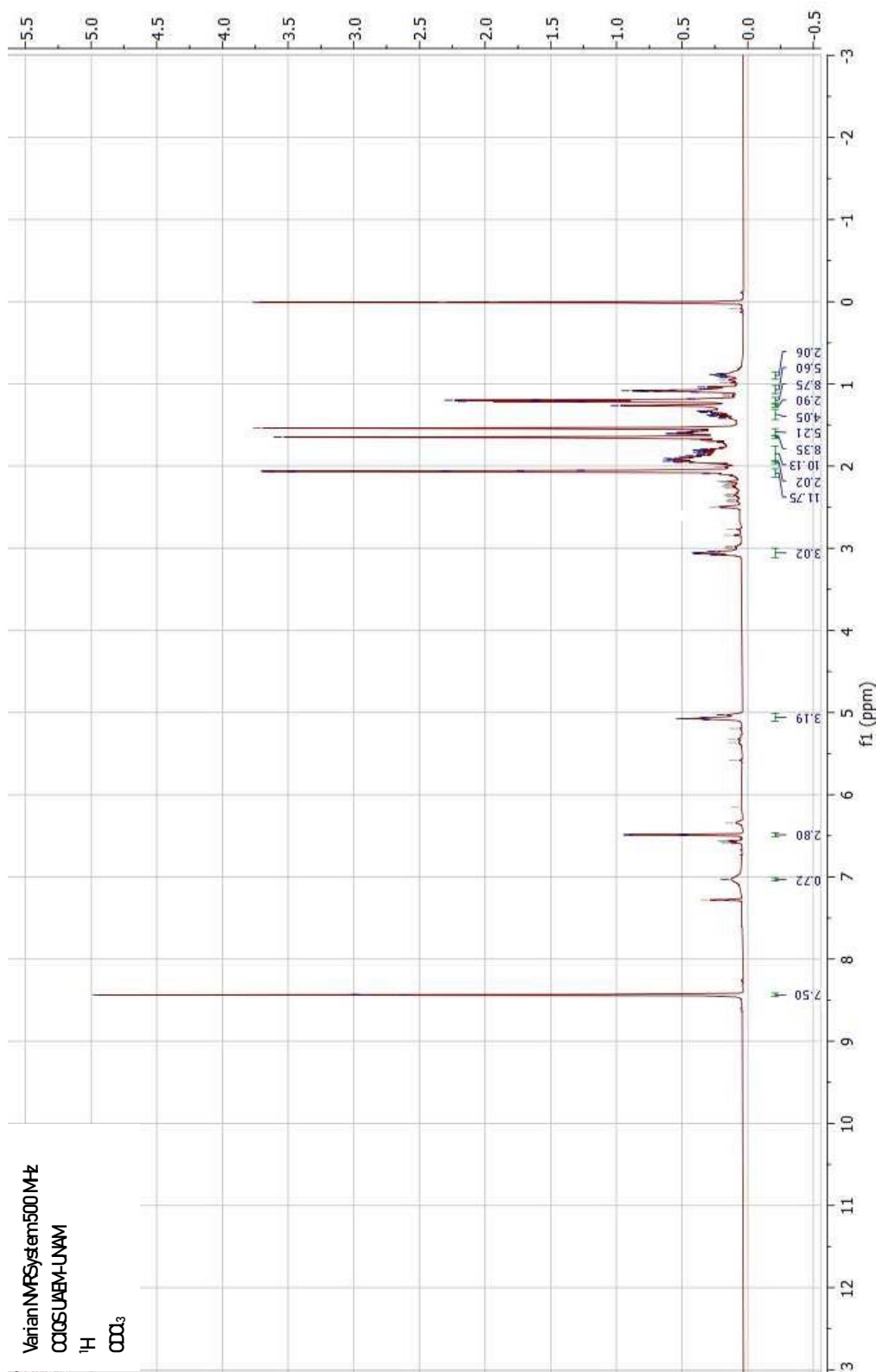
Espectro 15 de RMN ¹H (CDCl₃) a 500 MHz, de la extracción con CO₂ SC 2.- 10 h



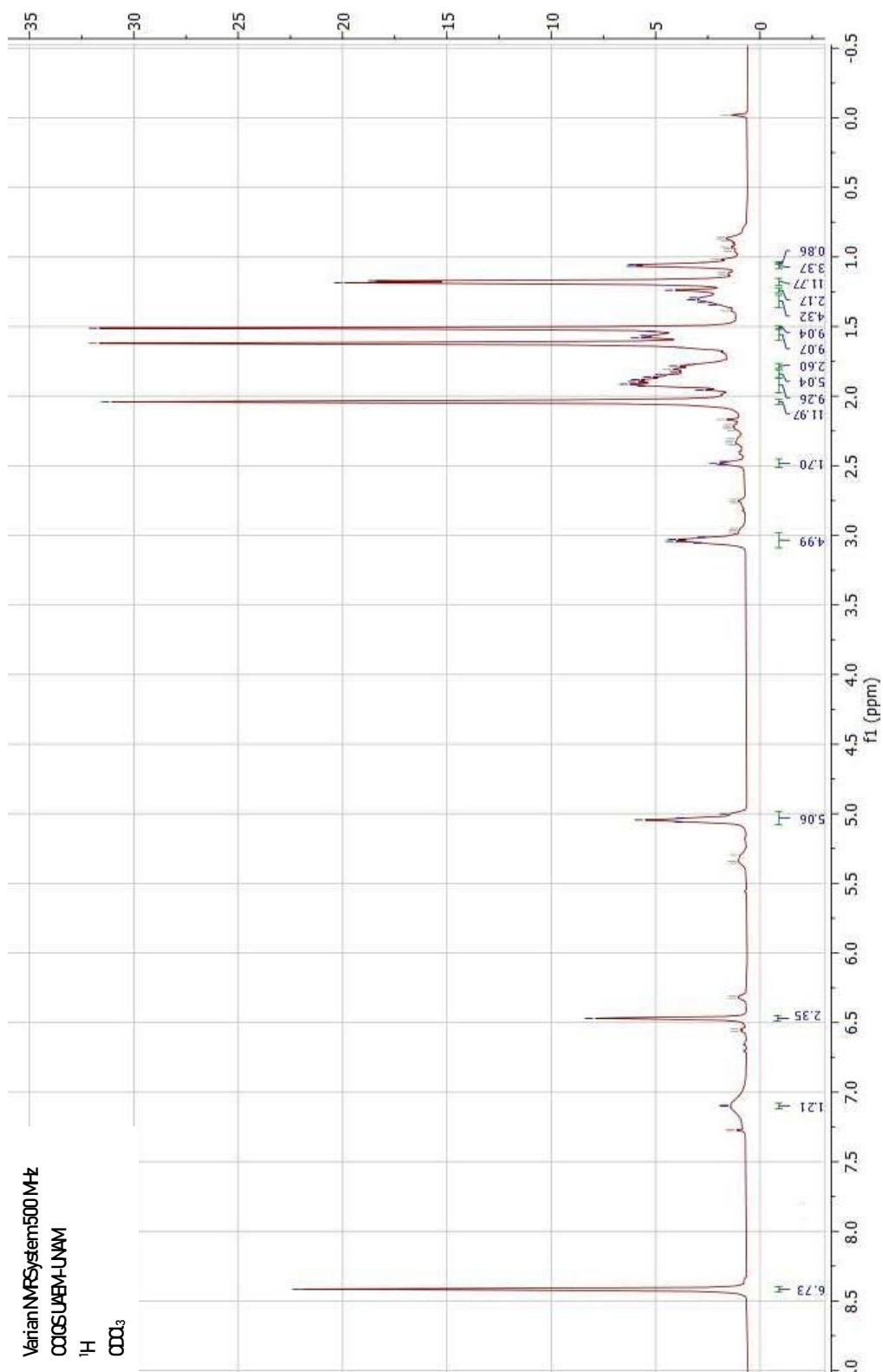
Espectro 16 de RMN ¹H (CDCl₃) a 500 MHz, de la extracción con CO₂ SC 3.- 12 h



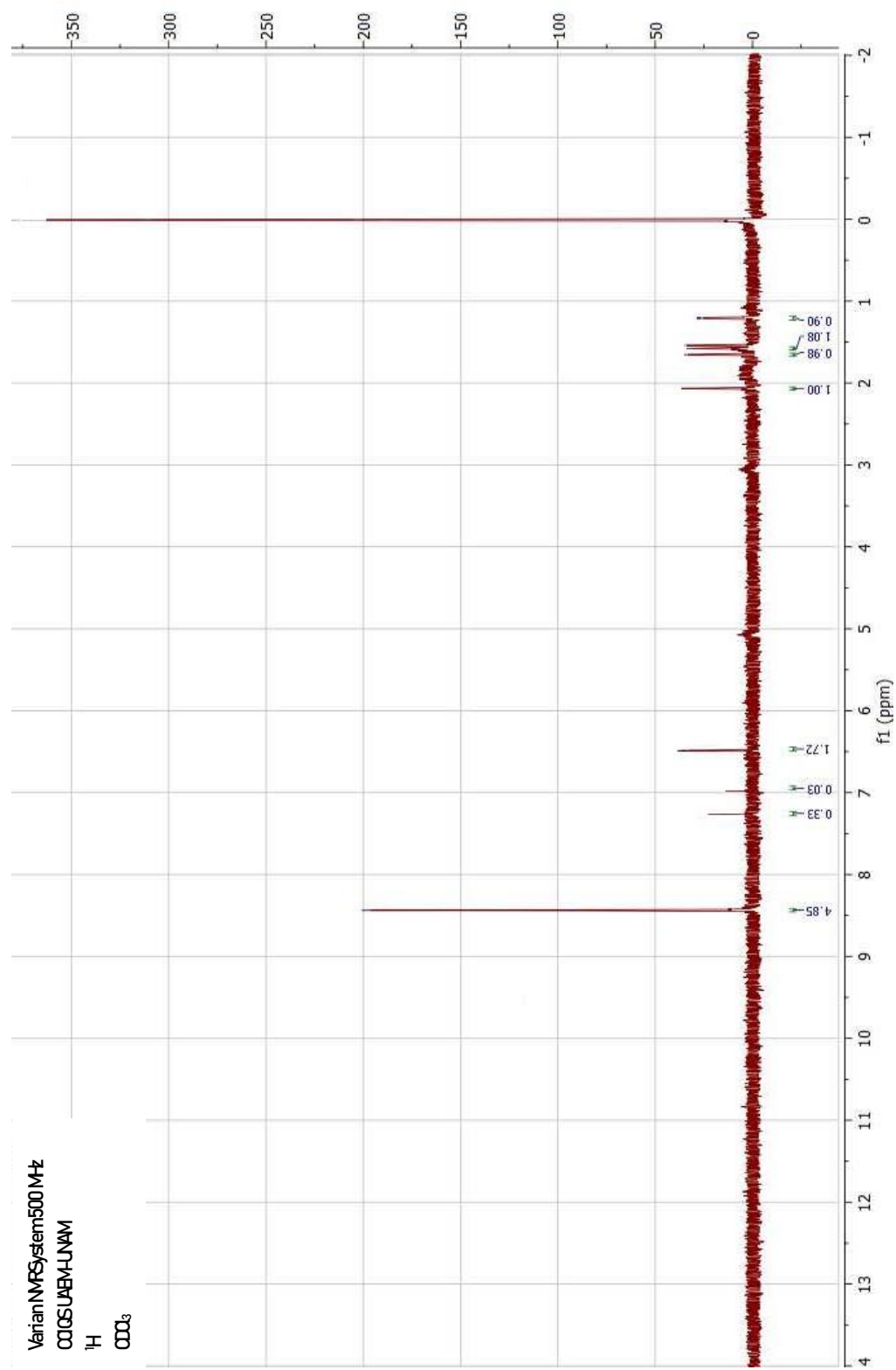
Espectro 17 de RMN ¹H (CDCl₃) a 500 MHz, de la extracción con CO₂ SC 3.- 12 h



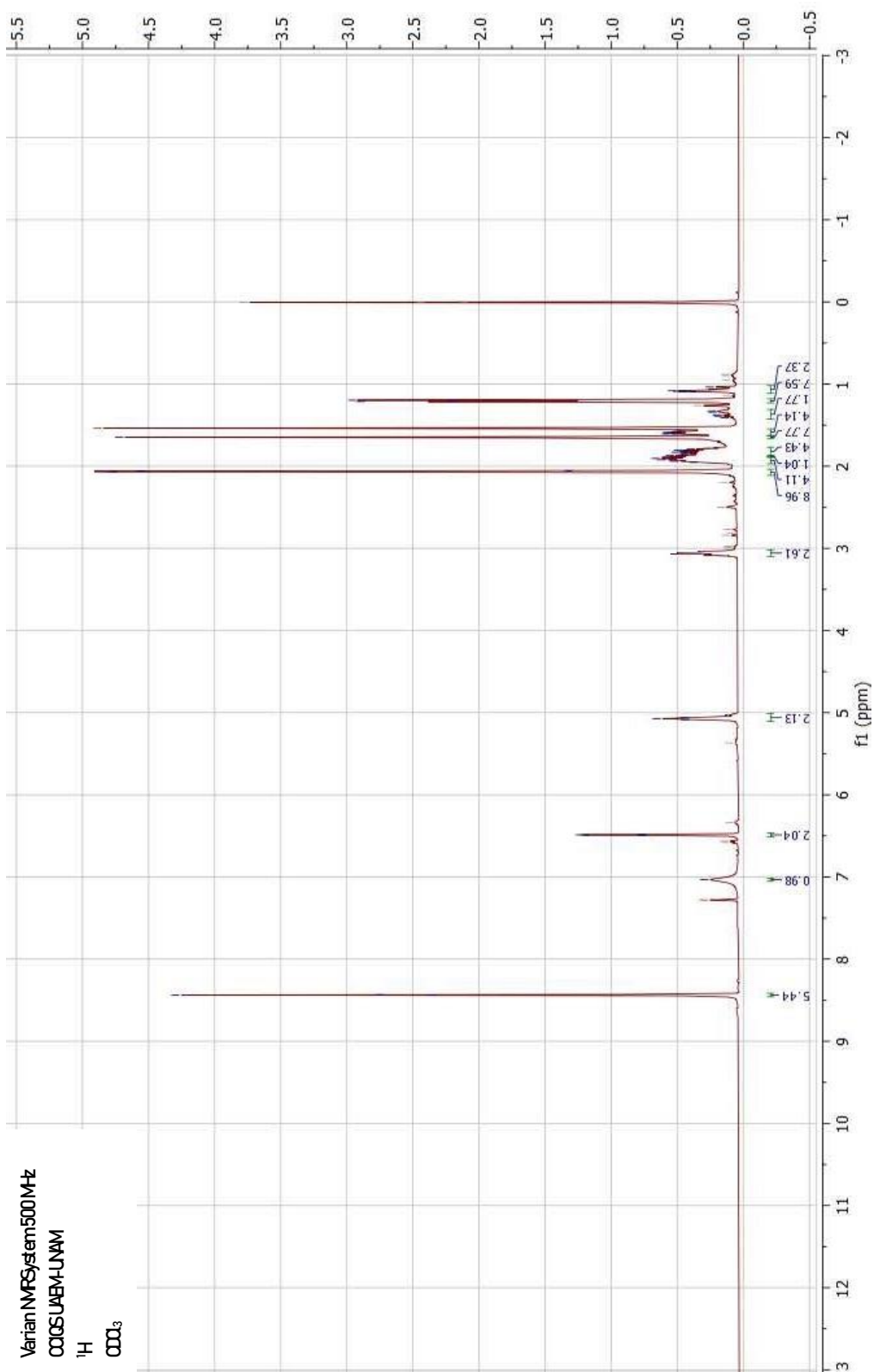
Espectro 18 de RMN ¹H (CDCl₃) a 500 MHz, de la extracción con CO₂ SC 3.- 12 h



Espectro 19 de RMN ¹H (CDCl₃) a 500 MHz, de la extracción con CO₂ SC 4.- 24 h



Espectro 20 de RMN ¹H (CDCl₃) a 500 MHz, de la extracción con CO₂ SC 4.- 24 h



Espectro 21 de RMN ¹H (CDCl₃) a 500 MHz, de la extracción con CO₂ SC 4.- 24 h