UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE ORIGEN AGROINDUSTRIAL MEDIANTE SU TRANSFORMACIÓN ENZIMÁTICA

POR:

Q.B.P LAURA IDALÍ ESCÁRCEGA BUSTILLOS

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO NOVIEMBRE DE 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., a 20 de septiembre del 2021.
Oficio: 81/CA/SIP/21

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
P R E S E N T E

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: **"VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE ORIGEN AGROINDUSTRIAL MEDIANTE SU TRANSFORMACIÓN ENZIMÁTICA",** presentada por la **Q.B.P. Laura Idalí Escárcega Bustillos** alumna del programa de Maestría en Ciencias en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Después de la revisión, indicamos a la tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

A t e n t a m e n t e
"Por la ciencia para bien del hombre"

Dra. Layla Nayzzel Muñoz Castellanos
Asesora de tesis

Dra. María del Rocío Infante Ramírez
Asesora de tesis

Dra. Erika Salas Muñoz
Directora de tesis

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado

FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS
SECRETARIA
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

**El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Circuito Universitario
Campus Universitario #2 C.P. 31125
Tel. +52 (614) 236 6000
Chihuahua, Chihuahua, México
http://www.fcq.uach.mx

Martes 29 de Junio 2021

Dr. Ildebrando Pérez
Secretaría de Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua

P R E S E N T E

Por medio de este conducto me permito informarle que he revisado y libero la tesis de maestría de la alumna Laura Idalí Escárcega Bustillos. Sin más por el momento quedo de ustedes para cualquier aclaración,

ATENTAMENTE,

Erika Salas M.

Dra. Erika Salas Muñoz
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la vida por darme la oportunidad de estar aquí y poder seguir aprendiendo.

Quiero agradecer a mi hija Isabel y a mi esposo Alfredo por siempre apoyarme incondicionalmente en mis sueños y planes, ustedes son pieza fundamental en mi vida y les agradezco por su comprensión y amor infinito.

Agradezco a mis padres por estar presentes en cada etapa importante de mi vida, en cada uno de mis logros y fracasos, todo lo que soy se los debo a ustedes, gracias por siempre estar al pendiente y por su apoyo incondicional. Gracias papás.

Agradezco a la Dra. Erika Salas por la oportunidad de formar parte de este proyecto, por sus enseñanzas y regaños, también agradezco a mi comité de tesis, la Dra. Laila Muñoz y la Dra. Rocío Infante, por toda la enseñanza a lo largo de esta aventura.

Gracias a mis compañeros del laboratorio de analítica III por la ayuda brindada.

Gracias a la Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas y el CONACYT por el apoyo brindado durante la maestría.

"Un científico en su laboratorio no es un simple técnico; también es un niño frente a los fenómenos naturales que lo impresionan como si fueran cuentos de hadas":
Marie Curie.

I. ÍNDICE GENERAL

I. ÍNDICE GENERAL II

II. ÍNDICE DE TABLAS IV

III. ÍNDICE DE FIGURAS IV

IV. LISTA DE ABREVIATURAS V

V. RESUMEN VII

VI. ABSTRACT VIII

VII. INTRODUCCIÓN 1

VIII. ANTECEDENTES 4

8.1 Cáscara de granada 4

8.1.1 Subproducto agroindustrial 4

8.2 La cáscara como fuente de compuestos fenólicos 5

8.2.1 Taninos 6

8.2.2 Flavonoides 7

8.2.3 Ácidos fenólicos 7

8.3 Extracción de compuestos fenólicos a partir de residuos agroindustriales 8

8.3.1 Métodos no convencionales: Extracción verde 9

8.4 Extracción asistida con ultrasonido (EAU) 11

8.5 Solventes eutécticos profundos 12

8.6 Propiedades fisicoquímicas de los solventes eutécticos profundos 16

8.6.1 Punto de congelación 16

8.6.2 Densidad 16

8.6.3 Viscosidad 16

8.6.4 Polaridad, conductividad y acidez/alcalinidad 17

8.7 Lipofilización enzimática 17

IX. JUSTIFICACIÓN 19

X. HIPÓTESIS 20

XI. OBJETIVOS 20

11.1 Objetivo general 20

11.2 Objetivos específicos 20

XII. MATERIALES Y MÉTODOS 21

12.1 Diseño experimental 21

12.2 Materiales y equipo 21

12.3 Materia vegetal.....23

12.4 Preparación de Mezclas de solventes tipo DES 23

12.5 Extracción con solventes tipo DES 24

12.6 Cuantificación de elagitaninos totales por espectrofotometría.....24

12.6.1 Curva de calibración de ácido elágico 24

12.6.2 Cuantificación de elagitaninos totales 24

12.7 Lipofilización enzimática 25

XIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 25

13.1 Rendimiento y selección del mejor solvente eutéctico profundo para extracción de elagitaninos totales. 25

13.2 Lipofilización de elagitaninos totales.....32

XIV. CONCLUSIÓN.....40

XV. ESTUDIOS PROSPECTIVOS.....41

XVI. BIBLIOGRAFÍA 42

XVII. ANEXO I 51

17.1 Solventes eutécticos profundos preparados.....51

17.2 Curva estándar de ácido elágico 51

17.3 Cromatografía de capa fina 52

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proporciones de los DES utilizados en este estudio.
Tabla 2. Rendimiento de extracción de g de equiv. Ácido elágico por 100 g de muestra de cáscara de granada en base húmeda para diferentes sistemas DES.
Tabla 3. Sistemas de reacción utilizados para la lipofilización.

III. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Punicalagina.
Figura 2. Estructura genérica de una molécula flavonoide.
Figura 3. Mecanismo de liberación de compuestos bioactivos de la célula usando ondas ultrasonido.
Figura 4. Diagrama de fases mezcla eutéctica.
Figura 5. Esquema representativo de la lipofilización enzimática de la malvidina-3-glucósido.
Figura 6. Estrategia experimental.
Figura 7. Glicerol.
Figura 8. Ácido tartárico.
Figura 9. Concentración de elagitaninos totales g/100 g muestra.
Figura 10. Gráfico de los diferentes sistemas de reacción empleados y sus frentes de referencia (Eluyente: metanol).
Figura 11. Gráfico de los diferentes sistemas de reacción empleados y sus frentes de referencia (Eluyente: Agua ácida al 2%).
Figura 12. Gráfico de los diferentes sistemas de reacción empleados y sus frentes de referencia (Eluyente: etanol).
Figura 13. Placas cromatográficas de capa fina utilizando como eluyente metanol.

Figura 14. Placas cromatográficas de capa fina utilizando como eluyente metanol y etanol.

Figura 15. Placas cromatográficas de capa fina utilizando como eluyente agua ácida al 2%.

Figura 16. Mezclas DES preparadas.

Figura 17. Curva de calibración de ácido elágico.

IV. LISTA DE ABREVIATURAS

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación.

EAU. Extracción Asistida con Ultrasonido.

DES. Deep Eutectic Solvent (Solvente Eutéctico Profundo)

NADES. Natural Deep Eutectic Solvent (Solvente Eutéctico Profundo Natural)

ChCl. Cloruro de colina (Choline Chloride)

COOH. Grupo carboxílico

OH. Grupo alcohol

°C. Grados centígrados

cm^{-3}. Centímetros cúbicos

Kg. Kilogramos

kHz. Kilohertz

pH. Potencial hidrógeno

ppm. Partes por millón

ml. Mililitro

nm. Nanometros

mg. Miligramo

g. Gramo

rpm. Revoluciones por minuto

EAE. Equivalentes de ácido elágico

HBD. Hydrogen bond donor (Donador enlace hidrógeno)

HBA. Hydrogen bond acceptor (Aceptor enlace hidrógeno)

Cl. Cloro

EAG. Equivalentes ácido gálico

Mol. Moles
CALB. Candida antarctica lipase B

V. RESUMEN

La cáscara de granada representa un subproducto agroindustrial muy valioso ya que contiene compuestos bioactivos de gran importancia para la salud, es rica en elagitaninos totales principalmente punicalagina y destacan sus propiedades benéficas como su actividad antioxidante, antitumoral, antimicrobiana entre otras más. A partir de esto surge la idea de valorizar este tipo de subproductos a través de un enfoque verde que implique menos daños al medio ambiente y que emplee el uso de tecnologías y técnicas amigables con el medio ambiente mediante la extracción de estás moléculas, de aquí surge la importancia de abordar la funcionalización de estas moléculas a través de la lipofilización con lipasa B de *Candida antárctica*, añadiendo una cadena alifática de un ácido o alcohol graso a la molécula fenólica para aumentar su solubilidad. El primer paso para extraer elagitaninos totales es realizar la extracción con un nuevo tipo de solventes (Solventes Eutécticos Profundos) los cuales son el resultado de una mezcla de una sal y una sustancia donante de enlace hidrógeno que juntos al mezclarse son líquidos, acoplado a la extracción asistida con ultrasonido representan una opción verde al empleo de las técnicas convencionales por presentar procesos más amigables con el medio ambiente y menos tóxicos. El objetivo de este proyecto es la utilización de diferentes sistemas de solventes eutécticos (NADES) para la extracción de elagitaninos de la cáscara de granada, el sistema de solventes que resultó ser el mas prometedor fue el sistema 3 (ChCl: urea: glicerol y ChCl: glicerol) mostrando 4.373 g equivalentes de ácido elágico/100 g muestra y 4.27 g equivalente de ácido elágico/100 g de muestra respectivamente, mostrando diferencia significativa con otros solventes orgánicos, siendo una alternativa viable al uso de éstos.

VI. ABSTRACT

Pomegranate peel represents a high value agro-industrial by-product because it contains bioactive compounds of great importance for health, it is rich in total ellagitannins, mainly punicalagin, and among its beneficial properties are antioxidant, antitumor, antimicrobial and other activities. From this arises the idea of adding value to these type of by-products through a green approach that involves less damage to the environment and employs the use of greener technologies and techniques through the extraction of these important molecules, hence the importance of the functionalization of these molecules through lipophilization with lipase B from Candida antarctica, adding an aliphatic chain of a fatty acid or alcohol to the phenolic moiety to make it more hydrophobic. The first step to extract total ellagitannins is the extraction with a new type of solvents (Deep Eutectic Solvents) which are the result of a mixture of a salt and a hydrogen bond donor substance that, when mixed are liquids, coupled with ultrasound assisted extraction represent a green option to the use of conventional techniques by presenting more environmentally friendly and less toxic processes. The objective of this project is the use of different eutectic solvent systems for the extraction of ellagitannins from pomegranate peel, the solvent system that proved to be the most promising was system 3 (ChCl: urea: glycerol and ChCl: glycerol) showing 4.373 ellagic acid equivalents/100 g sample and 4.27 ellagic acid equivalents/100 g sample respectively, showing significant difference with other organic solvents.

Keywords: ellagitannin, valorization, deep eutectic solvents, extraction, peel.

VII. INTRODUCCIÓN

La industria del procesamiento de frutas y verduras genera grandes cantidades de desperdicios durante el proceso (selección, clasificación, pelado etc.), además de que las partes no comestibles de las frutas y verduras también son residuos alimentarios comunes y abundantes como desperdicios. Los residuos provenientes de frutas y verduras que se producen durante el proceso son cáscaras, semillas, hojas, tallos, cortezas etc., las cuales son generalmente descartadas y representan un serio problema, ya que ejercen un problema ambiental y surge la necesidad de su manejo apropiado y/o reciclaje (Mouratoglou *et al.*, 2016). Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), se estima que al menos 1.3 billones de toneladas métricas de alimentos es producida en el mundo y que los residuos corresponden en mayor porcentaje a productos hortícolas representando un 60% (FAO, 2014). Las pérdidas no representan solamente el desperdicio de frutas y verduras, sino que también de otro tipos de recursos como lo son el suelo, agua, fertilizantes, energía y mano de obra, lo que representa pérdidas millonarias además de generar problemas ambientales como lo son los gases de efecto invernadero (Vilariño *et al.*, 2017).

En México se ha reportado que el 96% de los desechos sólidos se disponen en rellenos sanitarios y que el 50% del total de éstos es atribuido a componentes orgánicos. Como es bien conocido en la cultura mexicana no está arraigado el término reciclaje debido a que hay una falta de orientación y políticas públicas para el manejo de los desechos. Así que el actual sistema de gestión de residuos de México presenta un retraso en materia de reciclaje y valorización energética y ofrece pocos incentivos normativos para evitar el desecho de alimentos (Rincón-Moreno *et al.*, 2019). La mayoría de los flujos de subproductos o residuos generados a lo largo de los procesos industriales

plantea inmensos problemas medioambientales, sociales y económicos. El desarrollo de estrategias para la valorización de estos residuos industriales no sólo permitirá abordar estos problemas, sino también promover la bioeconomía, satisfaciendo los principios del desarrollo (Charalampia *et al.*, 2017).

La economía circular pretende sustituir el concepto de fin de vida y el uso de energía renovable, y tiene como objetivo la eliminación de residuos a través de la nueva producción de productos, organizaciones e incluso modelos de negocio, dando un enfoque para una gestión más adecuada de los residuos mediante métodos de reciclaje, reutilización o recuperación (Ghisellini *et al.*, 2016). Estas fuentes residuales representan una importante reserva de compuestos bioactivos con un gran potencial para la fabricación de productos farmacéuticos, alimentarios y cosméticos, dentro de los compuestos objetivo más comunes de los subproductos de frutas y verduras se encuentran los polifenoles, los cuales están presentes en la cáscara, pulpa, semillas y bagazo. Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas y has sido ampliamente estudiados ya que ayudan en la prevención de enfermedades, debido a que poseen actividades biológicas importantes como anti-inflamatoria, antiviral, anticancerígena, antimicrobiana y antioxidante (Ruesgas-Ramón *et al.*, 2017).

La granada (*Punica granatum L.*) es una de las frutas comestibles más antiguas y que contiene la mayor concentración de polifenoles totales en comparación con otras frutas. Durante el procesamiento industrial del zumo de granada se generan grandes cantidades de subproductos entre ellos la cáscara, la cual es una fuente valiosa de polifenoles, diversos estudios han informado que esta fracción tiene mayor bioactividad que la pulpa, estas moléculas se pueden convertir en productos de valor añadido como antioxidantes, alimentos funcionales, nutracéuticos, aditivos alimentarios y suplementos (Goula *et al.*, 2015).

El paso primordial para obtener compuestos fenólicos de este tipo de subproductos es la extracción, actualmente el desarrollo de procedimientos de extracción innovadores y respetuosos con el medio ambiente es cada vez más demandado, ya

que esto es valioso para reducir el tiempo de extracción, así como el consumo de disolventes mediante la aplicación de estrategias rentables que se ajusten a los principios de la química verde. En los últimos años, los conceptos de economía verde y eco sostenibilidad han hecho que se preste mayor atención a los disolventes eutécticos profundos, nuevos disolventes que están surgiendo como una alternativa prometedora y más ecológica a los disolventes orgánicos convencionales. Los solventes eutécticos representan una nueva generación de disolventes que se basan en su mayoría en mezclas de componentes baratos y fácilmente disponibles: sales de amonio cuaternario no toxicas y un donante de enlace hidrógeno (Bonacci *et al.*, 2020).

Los solventes eutécticos se combinan con la extracción asistida con ultrasonido (EAU), la cual es un enfoque novedoso para la extracción de compuestos bioactivos de diferentes matrices vegetales. La EAU tiene varias ventajas: alta sensibilidad, especificidad, presenta altos rendimientos, es amigable con el medio ambiente y en comparación con los métodos tradicionales es menos costosa y puede utilizarse en laboratorio y a gran escala (Foujdar *et al.*, 2020). Este tipo de solventes (NADES) se puede utilizar como medio para reacciones de biocatálisis, un ejemplo de ello es la lipofilización enzimática, la cual es un proceso verde e importante para poder extender el uso de los polifenoles en medios lipídicos, debido a que estas moléculas son poco solubles en matrices a base de lípidos, el mejoramiento de la hidrofilia de estos compuestos mediante este tipo de reacción se ha aplicado ampliamente para hacer que estas moléculas funcionalizadas, sean activas en la interface aceite-agua, lo que hace que este tipo de compuestos tengan un mayor campo de aplicación en la industria (Kahveci *et al.*, 2015; Marquez-Rodriguez *et al.*, 2021).

El presente trabajo se centró en la extracción verde y la transformación enzimática de polifenoles de la cáscara de granada implementando métodos y tecnologías verdes como una forma de valorizar este tipo de subproducto y contribuir con la economía y el medio ambiente.

VIII. ANTECEDENTES

8.1 Cáscara de granada

8.1.1 Subproducto agroindustrial

La granada (*Punica granatum L.)* se cultiva desde la antigüedad, pertenece a la familia de las punicáceas y es conocida como una "súper fruta" de nueva generación, es originaria de Irán hasta la región del Himalaya, se cultiva extensamente en Irán, España, India y EUA., así como en la mayoría de los países del Cercano y Lejano Oriente. Se desarrolla en climas tropicales y subtropicales (Dhumal *et al.*, 2014). Su producción anual se cifra en unos 2.5 millones de toneladas, mientras que la India ocupa el primer lugar en producción a nivel mundial con 1.78 millones de toneladas (Foujdar *et al.*, 2020). Este fruto es muy apreciado por su buen sabor y por tener numerosos beneficios para la salud ya que su consumo puede prevenir o atenuar variedad de enfermedades como es el cáncer, diabetes, arterioesclerosis y desordenes cardiovasculares (Akhtar *et al.*, 2015).

En México la producción de granada en el 2018 fue de 5,210 toneladas de los cuales 1,980 toneladas fueron de residuos y el 38% de éstos correspondió a la cáscara, los principales productores de granada en el país son Morelos, Oaxaca, Hidalgo y Guanajuato (SIAP, 2018).

La industria del procesamiento de la granada genera cáscaras ricas en compuestos fenólicos que se desechan como residuos. Se generan 100 kg de granada fresca, de estos, 52.18 kg corresponden a la cáscara (Qu *et al.*, 2012; N. Seeram *et al.*, 2005). La cáscara de granada es una excelente fuente de elagitaninos, pertenecientes a la familia de los taninos hidrolizables, representa cerca del 40%-50% del peso total de la fruta. La punicalagina y sus isómeros (2,3-hexahidroxifenoil-4,6- galagilglucosa), punicalina, ácido elágico, y ácido gálico son los principales compuestos de elagitaninos que se encuentran en la cáscara de granada *(*Akhtar *et al.*, 2015; Fawole *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2002). Los elagitaninos poseen propiedades anticancerígenas, antidiabéticas, antiinflamatorias, antioxidantes y antibacterianas

que ayudan a reducir el riesgo de muchas enfermedades crónicas y potencialmente mortales (Foujdar *et al.*, 2020).

La valorización de subproductos de granada rica en valiosos compuestos bioactivos podría conducir a la producción de varios productos como 1) aditivos utilizados en el sector alimentario industrial para aumentar la vida útil de los productos, 2) ingredientes funcionales para mejorar la calidad de los alimentos y promover la salud humana. De este modo, no sólo se reformaría la estructura existente en el sector de la producción de jugo de granada, sino que también se daría lugar al desarrollo de nuevos productos con salidas comerciales diversificadas, tratando las cuestiones relacionadas con la gestión de residuos (Charalampia *et al.*, 2017).

8.2 La cáscara como fuente de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son el grupo más numeroso de fitoquímicos. Están presentes en casi todas las plantas como metabolitos secundarios, desempeñando un papel importante en sus procesos de crecimiento y reproducción o proporcionándoles protección contra patógenos y depredadores. Se caracterizan por tener uno o más grupos hidroxilos en su estructura química, y han sido ampliamente estudiados por sus propiedades biológicas. Además los polifenoles, incluidos los flavonoides (antocianos, flavonoles, flavanoles, taninos condensados o proantocianidinas) y los no flavonoides (ácidos fenólicos, estilbenos, galotaninos, elagitaninos y ligninas), son los antioxidantes más abundantes de origen natural (Ruesgas-Ramón *et al.*, 2017).

Cerca de 48 compuestos fenólicos han sido identificados en la cáscara y en otras partes de la granada. Los elagitaninos, son los antioxidantes más activos entre los taninos que contiene la cáscara. Se ha demostrado que estos compuestos (ácido elágico, punicalagina, punicalina y ácido gálico) tienen una gran actividad biológica antioxidante, sobre todo, que actúan conjuntamente de forma sinérgica (Akhtar *et al.*, 2015; Seeram *et al.*, 2006).

La cantidad de compuestos fenólicos depende de el cultivo o variedad de granada así como de las partes de la fruta, algunos estudios mencionan que la parte de la fruta con mayor cantidad de compuestos fenólicos es la cáscara (Gözlekçi *et al.*, 2011).

8.2.1 Taninos

Los taninos son polifenoles de alto peso molecular divididos en dos grupos química y biológicamente distintos: taninos condensados o proantocianidinas y taninos hidrolizables. Los primeros son polímeros de monómeros de polihidroxiflavan-3-ol y los segundos son ésteres de ácidos gálico y elágico (galotaninos y elagitaninos) y se encuentran dentro del grupo de los no flavonoides. La cáscara de granada es rica en taninos hidrolizables (punicalina, pedunculagina, y punicalagina). La punicalagina (Figura 1), es el compuesto bioactivo mayoritario y se le asigna como responsable de las propiedades biológicas (Smaoui *et al.*, 2019; Viuda-Martos *et al.*, 2010).

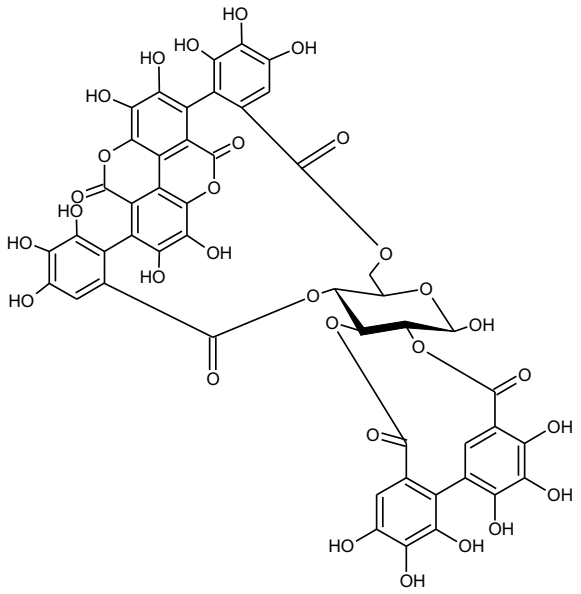

Figura 1. Punicalagina

8.2.2 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular formados por 15 átomos de carbono, dispuestos en una configuración C6-C3-C6. Esencialmente, la estructura consiste en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos (Figura 2), normalmente en forma de anillo heterocíclico (Balasundram *et al.*, 2006). Las variaciones en los patrones de sustitución del anillo C dan como resultado las principales clases de flavonoides (flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanoles y antocianos). La cáscara de granada es una fuente potencial de flavonoides como la catequina, epicatequina, quercetina, las antocianinas y las procianidinas. La concentración de flavonoles y flavonas en la cáscara varía entre los diferentes cultivares de granada (Singh *et al.*, 2018). Los flavonoides mayormente antocianinas contribuyen al color de la fruta. La cáscara contiene cerca del 30% del total de antocianinas presentes en la fruta (Zhao *et al.*, 2014).

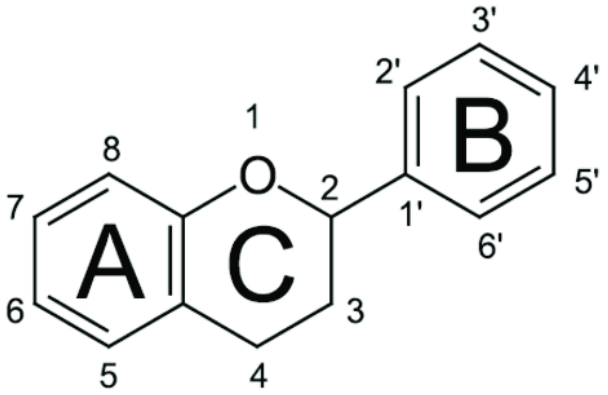

Figura 2. Estructura genérica de una molécula flavonoide

8.2.3 Ácidos fenólicos

Químicamente, los ácidos fenólicos pueden definirse como sustancias que poseen anillo aromático unido a uno o más sustituyentes hidrogenados, incluyendo sus derivados funcionales. Los ácidos fenólicos constan de dos subgrupos, los hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, los ácidos hidroxibenzoicos incluyen los ácidos

gálico p-hidroxibenzoico, protocatechuico, vanílico y siríngico, que contienen en común la estructura C6-C1, los ácidos hidroxicinámicos, por su parte, son compuestos aromáticos con una cadena lateral de tres carbonos C6-C3, siendo los ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico y sinápico los más comunes (Balasundram *et al.*, 2006). En la cáscara de granada se han identificado el ácido clorogénico, caféico, siríngico, sinápico, p-cumárico, vanílico, elágico, gálico y cinámico (Elfalleh, 2012).

8.3 Extracción de compuestos fenólicos a partir de residuos agroindustriales

El primer paso para la obtención de compuestos fenólicos a partir de residuos agroindustriales es la extracción. Existen diferentes métodos de extracción los cuales determinan los tipos y cantidades adecuadas de compuestos bioactivos que pueden obtenerse de los subproductos. Los métodos varían dependiendo del compuesto objetivo que se quiera obtener y se dividen en dos categorías: métodos convencionales y no convencionales (Singh *et al.*, 2002).

La extracción conlleva tomar en cuenta determinados factores como: la temperatura, el pH, tejido de la planta, presión, tipo de solvente, tiempo, relación sólido-líquido, tamaño de partícula de la muestra, ya que éstos factores pueden afectar el rendimiento de extracción (Sagar *et al.*, 2018). Los valores óptimos de los diferentes factores o variables de extracción se pueden obtener mediante una optimización de la extracción, la cual se lleva a cabo mediante un diseño experimental compuesto central y una metodología de respuesta (Mourtzinos *et al.*, 2019). La cantidad de solvente debe ser suficiente para garantizar que todo el tejido vegetal esté sumergido en el solvente durante todo el proceso de extracción. La temperatura es un factor importante, ya que los polifenoles se consideran termosensibles, y en algunos casos al aumentar la temperatura se produce una degradación o modificación de las moléculas, esto debido a las posibles interacciones covalentes con otros constituyentes en las matrices de las células vegetales. La utilización de materia vegetal pulverizada y seca, mejora la extracción ya que aumenta el área de superficie de contacto con la muestra, lo que promueve la ruptura de la pared celular de la planta. La elección del solvente adecuado depende de su selectividad, miscibilidad,

densidad, recuperación, precio, presión de vapor, viscosidad, estabilidad química y térmica y principalmente su polaridad (Haminiuk *et al.*, 2012).

La preparación de la muestra es otro factor crucial para determinar el tipo y la cantidad de compuesto bioactivo extraído. Antes de la extracción, la muestra puede ser triturada, molida o incluso homogeneizada, las muestras pueden ser secadas al aire o liofilizadas y se prefiere la extracción de muestra seca a la extracción de muestra fresca, porque las enzimas en las células frescas pueden degradar potencialmente a los ácidos fenólicos. Esto se ha reportado por varios autores, por ejemplo el proceso de congelación y almacenamiento congelado a largo plazo provocan la pérdida en el contenido fenólico y vitaminas que se encuentran en la materia vegetal (Haminiuk *et al.*, 2012; Pareek *et al.*, 2015). También el proceso de secado, incluida la liofilización, pueden provocar efectos no deseados en los perfiles constituyentes de las muestras, por lo que queda a consideración del analista o técnico el uso de éstas técnicas en la preparación de la muestra (Dai, Witkamp, *et al.*, 2013).

El principal objetivo de la extracción es maximizar el rendimiento del compuesto a extraer con un impacto mínimo o nulo en las propiedades del compuesto objetivo, mientras se minimiza la extracción de compuestos indeseables (Tiwari, 2015).

8.3.1 Métodos no convencionales: Extracción verde

Recientemente la tecnología de extracción verde, también conocida como tecnología no convencional, se ha convertido en el área de investigación más reciente, debido al alto rendimiento, la reducción del tiempo de proceso, los productos de alta calidad y la menor generación de residuos, estas tecnologías verdes han sustituido las tecnologías convencionales. La extracción verde significa reducir el uso de disolventes, la energía, los residuos y la contaminación ambiental, al tiempo que se obtiene un mayor rendimiento. La tecnología de extracción verde es el resultado de una competencia industrial más ecológica, económica e innovadora (Wen *et al.*, 2018).

Las técnicas convencionales de extracción sólido-líquido, como maceración, infusión y la extracción Soxhlet, requieren mucho tiempo y utilizan grandes cantidades de solventes. Los solventes utilizados como cloroformo, tetracloroetileno de carbono, clorobenceno, acetona, metanol y acetonitrilo, se utilizan para la extracción de diversas matrices, dependiendo de las propiedades del compuesto objetivo. Los riesgos de seguridad, la toxicidad de ciertos disolventes y la presencia de residuos de disolventes, han hecho crecer el interés por desarrollar nuevas tecnologías de extracción respetuosas con el medio ambiente, que disminuyan o eliminen el uso de disolventes orgánicos. Ha crecido el interés comercial por rutas de extracción más sostenibles y no tóxicas, impulsado por la creciente demanda de los consumidores por alternativas más ecológicas e ingredientes naturales que no impliquen productos químicos tóxicos y los riesgos medioambientales y sanitarios asociados al uso de disolventes químicos (Wang *et al.*, 2006).

Un reto importante en la extracción de moléculas de una matriz compleja de forma sostenible es que estas moléculas suelen estar incrustadas en la matriz. Aunque no cabe duda de que existe una clara necesidad de desarrollar técnicas de extracción asequibles, seguras, eficaces y ecológicas, es importante que dichas técnicas no solo permitan el etiquetado limpio, sino que también garanticen un mayor rendimiento con un impacto mínimo en la calidad del producto final.

Se han propuesto una serie de novedosas técnicas para la extracción, incluyendo extracción asistida por ultrasonido, extracción con fluidos supercríticos, extracción asistida por microondas, alta presión y campo eléctrico pulsado. Estas técnicas ofrecen un enorme potencial y mejoran la calidad del extracto. Éstas técnicas también pueden utilizarse como pretratamiento o en combinación con disolventes orgánicos seguros y respetuosos con el medio ambiente (Solventes eutécticos profundos) para mejorar la eficacia de la extracción al mejorar la permeabilidad de la membrana celular, que es el parámetro que rige la eficacia de la extracción (Tiwari, 2015) además este tipo de solventes se han aplicado como disolvente en compuestos fenólicos, son biodegradables y de fácil manipulación con una toxicidad muy baja (Ruesgas-Ramón *et al.*, 2017).

8.4 Extracción asistida con ultrasonido (EAU)

La EAU induce una mayor difusión del disolvente en los materiales celulares, mejorando así la transferencia de masa y debido a que las implosiones generadas por defecto de cavitación de la EAU, promueven el rompimiento de tejido o pared celular vegetal también facilitando la liberación de los compuestos bioactivos. El rendimiento de extracción está influenciado por la frecuencia de ultrasonido y por la naturaleza del material vegetal (Kumar *et al.*, 2017).

En la EAU se aplica un rango de 20 a 2000 kHz, es una técnica simple y de bajo costo que se basa en dos principios: uno es la difusión a través de las paredes celulares y el otro es el enjuague del contenido después de la ruptura celular, en ella se aplica el principio de cavitación en el que las ondas provocan expansión y compresión de la matriz, que provoca la permeabilización de la pared celular y da como resultado un mayor rendimiento del producto deseado (Figura 3), el mecanismo de cavitación se puede describir en cuatro pasos. En el primer paso, las burbujas de cavitación son generadas cerca de la superficie de la matriz de la planta con la aplicación de las ondas de ultrasonido, en el segundo paso, las burbujas colapsan, liberando presión y temperatura hacia la superficie, en el tercer paso la superficie de la matriz se rompe y establece un contacto directo entre los compuestos bioactivos dentro de la célula y el solvente. Finalmente, los compuestos activos se liberan y se transportan al disolvente, de esta forma las ondas de ultrasonido mejoran la transferencia de masa (Panja, 2018).

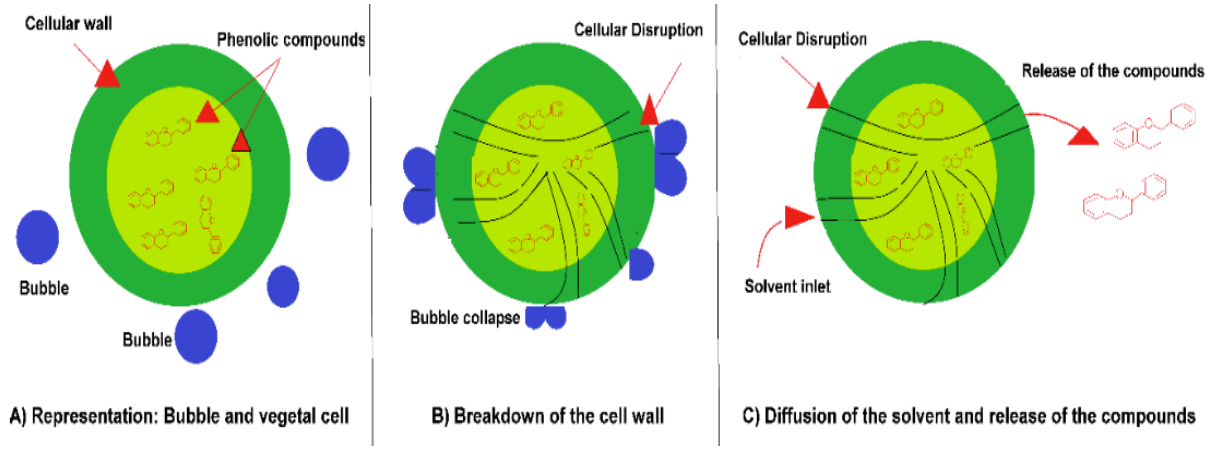

Figura 3. Mecanismo de liberación de compuestos bioactivos de la célula usando ondas ultrasonido (Panja, 2018).

La frecuencia es el principal factor y tiene un efecto en el rendimiento y en las propiedades del compuesto. Algunos autores reportan que usar frecuencias de más de 20 kHz afecta las propiedades fisicoquímicas de los compuestos bioactivos con la formación de radicales libres (Shen *et al.*, 2017).

La EAU se utiliza para la extracción de diversos compuestos fenólicos de diferentes partes de plantas: hojas, tallos, semillas, frutos, cáscaras., y muestra muchas ventajas en comparación con otras técnicas, como la baja temperatura, lo que resulta en una menor degradación térmica de compuestos bioactivos y un menor tiempo de extracción. Es un método rentable a escala de laboratorio, en la industria alimentaria el ultrasonido se utiliza para esterilización, extracción y conservación (Saini *et al.*, 2019).

8.5 Solventes eutécticos profundos

El término eutéctico deriva de la palabra griega que significa baja fusión y se aplica a una aleación o a un medio líquido. En términos generales, un sistema eutéctico representa una mezcla de componentes que, en virtud de proporciones especificas, tienen el punto de fusión más bajo. Como se muestra en la (Figura 4) en el diagrama de fases, la temperatura y la proporción de los componentes son dos factores

determinantes en un sistema eutéctico binario. El punto eutéctico es la temperatura mínima de fusión en el conjunto de las composiciones. Este fenómeno se produce con frecuencia cuando los átomos de los componentes son pequeños y pueden posicionarse en los espacios intersticiales de una red compuesta formada por átomos más grandes, alterando así su patrón cristalino al disminuir las fuerzas electrostáticas y, por tanto, provocando una disminución del punto de congelación de la mezcla eutéctica (Alonso *et al.*, 2016). Estos componentes interactúan a través de fuerzas intermoleculares, pero no a través de enlaces covalentes o iónicos, teóricamente la participación de las moléculas de otros componentes deslocaliza las unidades de la red molecular de los componentes, provocando una depresión del punto de fusión de la mezcla eutéctica (Liu *et al.*, 2018).

Los DES son sistemas formados por la complejación de una sal cuaternaria de amonio con una sal metálica o un donante de enlaces hidrógeno. Cunado los componentes de un DES son metabolitos primarios naturales y compuestos celulares de todos los tipos de células y organismos, se les asigna el término “Disolventes eutécticos profundos naturales” (NADES), sin embargo, puede afirmarse que no existe una diferencia clara entre un DES y un NADES, y algunas mezclas eutécticas preparadas a partir de metabolitos naturales, como el cloruro de colina y la glucosa, pueden considerarse tanto un DES como un NADES. La formación de un NADES se produce por el enlace hidrógeno intermolecular entre un aceptor de enlaces de hidrógeno y donante de enlaces hidrógeno (Savi *et al.*, 2019).

El desarrollo de un sistema de disolventes rentable y respetuoso con el medio ambiente es de suma importancia en la industria química. Una de las propuestas es la sustitución de los disolventes orgánicos volátiles peligrosos convencionales por alternativas no volátiles para que no emitan vapores tóxicos e inflamables a un amplio rango de temperaturas.

Durante los últimos años han aparecido algunos solventes verdes como agua, fluidos supercríticos, disolventes perfluorados, glicerol y solventes iónicos, sin embargo, su uso está limitado debido a que algunos compuestos, sustratos o reactivos tienen poca solubilidad o estabilidad en agua, se requieren equipos muy sofisticados como es el

caso de los fluidos supercríticos, el proceso de síntesis para líquidos iónicos es complejo y costoso además es difícil de purificar, estas son algunas de las razones por las cuales se ha impedido su uso generalizado en procesos químicos (Liu *et al.*, 2015).

La era de la química verde ha empujado a la comunidad científica a investigar y aplicar nuevos disolventes en extracción de compuestos fenólicos como alternativas a los disolventes orgánicos, que son tóxicos y pueden ser peligrosos. Recientemente los solventes eutécticos profundos se han aplicado como disolventes ya que son biodegradables, son fáciles de manipular y tienen una toxicidad muy baja (Ruesgas-Ramón *et al.*, 2017).

Los solventes eutécticos profundos suelen formarse mezclando dos o tres tipos de componentes orgánicos, donantes de enlaces hidrógeno como la urea, ácidos carboxílicos y los polioles, los cuales se mezclan con aceptores de enlace de hidrógeno para formar la mezcla eutéctica. El cloruro de colina ChCl es uno de los aceptores de enlace hidrógeno más utilizados en los solventes eutécticos. Estas mezclas eutécticas poseen puntos de fusión mucho más bajos que cualquiera de sus componentes individuales, debido al efecto en los enlaces de hidrógeno intermoleculares. Se han utilizado para la catálisis, síntesis orgánica y material electroquímico (Cui *et al.*, 2015).

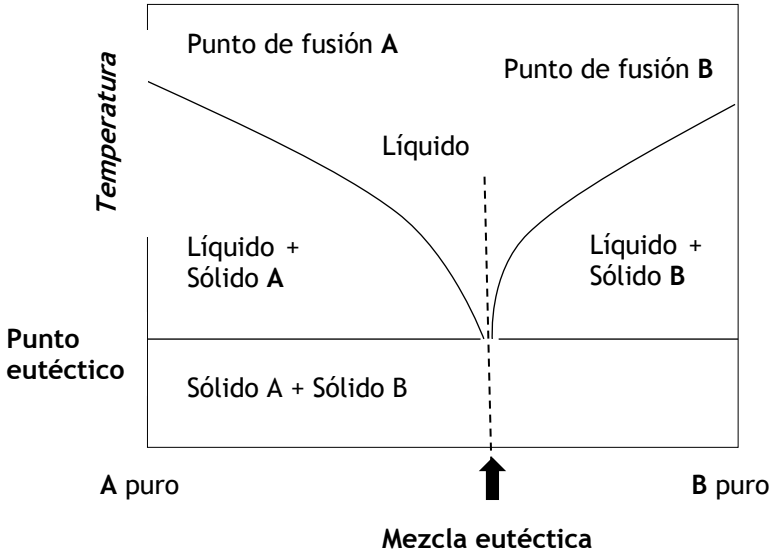

Figura 4. Diagrama de fases mezcla eutéctica, modificado (Alonso *et al.*, 2016).

Los solventes eutécticos profundos muestran excelente potencial como solventes para la extracción de una amplia gama de solutos químicos. Su uso como solvente en la extracción depende de sus propiedades físicas, como la viscosidad, densidad, la miscibilidad y la polaridad. Es conveniente seleccionar un disolvente de baja viscosidad para facilitar la mezcla, pero con una gran diferencia de la densidad de la matriz para facilitar la separación de fases (Cunha *et al.*, 2018).

Hasta la fecha hay tres tipos de métodos disponibles para preparar mezclas eutécticas: a) Método de calentamiento y agitación: los componentes se colocan en un frasco con una barra de agitación y una tapa, se calientan en un baño de agua (50-90°C) con agitación hasta que se forme un líquido claro, b) Método de evaporación: los componentes se disuelven en agua y se evaporan a 50°C con un evaporador rotatorio. El líquido obtenido se coloca en un desecador con gel de sílice hasta peso constante, c) Método de liofilización: basado en la liofilización de soluciones acuosas de las contrapartes individuales (Gomez *et al.*, 2018).

8.6 Propiedades fisicoquímicas de los solventes eutécticos profundos

8.6.1 Punto de congelación

Se caracterizan por puntos de congelación menores a los de los componentes individuales. Los puntos de congelación están influenciados por la proporción de la sal y el donador de enlace hidrógeno, sin embargo, no existe una correlación establecida entre el punto de congelación de los DES y los puntos de fusión de los componentes puros. El punto de congelación depende de la energía reticular de los DES, la interacción entre el par anión donador de enlace hidrógeno y los cambios de entropía que surgen de la formación de la fase líquida (Pätzold *et al.*, 2019).

8.6.2 Densidad

La mayoría de los DES son más densos que el agua. La notable diferencia de densidad puede atribuirse a una organización molecular diferente o empaquetamiento de los DES. Los valores de densidad más comunes varían entre 1.04 y 1.63 cm^{-3} a 25°C y esta fuertemente afectada por el radio molar de la sal orgánica y el donador de enlace hidrógeno *(*Achkar *et al.*, 2019).

8.6.3 Viscosidad

Muchos de los DES son muy viscosos a temperatura ambiente. Para su aplicación potencial como disolvente verde, los DES con viscosidades bajas son muy deseables. La viscosidad de la mezcla eutéctica binaria se rige por enlaces hidrógeno, Van der Waals e interacciones electrostáticas y también depende de la naturaleza del donador de enlace hidrógeno y la relación molar de los componentes. La viscosidad cambia en función de la temperatura, a medida que aumenta la temperatura, la viscosidad disminuye. El agua juega un papel importante en la superación de la alta viscosidad y puede ser parte de la mezcla y permite el ajuste cuantitativo de propiedades fisicoquímicas, como la conductividad, polaridad, viscosidad y densidad, lo cual facilita la aplicación como disolvente. El contenido óptimo de agua en los DES depende de la composición y la polaridad (Gonzalez *et al.*, 2019).

8.6.4 Polaridad, conductividad y acidez/alcalinidad

Los enlaces hidrógeno hacen polares a este tipo de solventes. Los DES muestran una conductividad iónica deficiente debido a una viscosidad más alta y cambian con la composición y temperatura. Los DES polares y próticos pueden ser de naturaleza ácida o básica. Si un disolvente presenta una naturaleza ligeramente ácida o básica, también puede actuar como catalizador. Las propiedades de acidez o coordinación se pueden ajustar de acuerdo con los requisitos de diferentes reacciones o procesos cambiando la combinación de sus cationes y aniones.

Es posible que una gran cantidad de DES tengan varias combinaciones de cationes y aniones que brindan una oportunidad para diseñar la condición catalítica más adecuada con un enfoque ecológico. Los caracteres iónicos debido a la presencia de interacción de enlace hidrógeno entre el catión y anión muestran actividades catalíticas mejoradas con respecto a las realizadas en disolvente orgánico convencional, así que los DES pueden ser utilizados no solo como un modesto y económico solvente sino también como organocatalizadores reciclables y reutilizables, pueden desempeñar un papel doble en las transformaciones orgánicas (Khandelwal *et al.*, 2016).

8.7 Lipofilización enzimática

El agua es el disolvente más utilizado en biocatálisis. Uno de los principales inconvenientes del agua como disolvente en las transformaciones biocatalíticas es su alta polaridad en contraste con la naturaleza hidrofóbica de muchos reactivos de interés, lo que conduce a una baja solubilidad de los sustratos en los medios de reacción acuosos. Se ha utilizado con éxito una amplia gama de enzimas para las biotransformaciones en DES. El enfoque principal se centra en las reacciones catalizadas por lipasas con enzimas libres e inmovilizadas, especialmente para la síntesis de ésteres y reacciones de transesterificación utilizando DES ya sea como disolvente, co-solvente o incluso como disolvente y sustrato combinado (Pätzold *et al.*, 2019).

Las lipasas (triacilglicerol hidrolasas) son enzimas capaces de actuar sobre los enlaces ésteres carboxílicos de cadena larga, no solo se utilizan por su función hidrolizante natural, sino que también catalizan las reacciones de síntesis de ésteres, interesterificación y transesterificación en medios no acuosos. Siguiendo el contexto verde, varios estudios han intentado reducir el impacto medioambiental y han tratado de llevar a cabo reacciones catalizadas por lipasas en disolventes verdes.

Los ácidos fenólicos presentan baja solubilidad en matrices lipídicas, esto hace que su aplicación sea limitada como antioxidantes naturales, conservadores, aditivos etc. La hidrofobicidad de los ácidos fenólicos se puede cambiar a través de la lipofilización enzimática, esterificando la función de -COOH con alcohol graso o el fenol -OH con un ácido graso (Figueroa-Espinoza *et al.*, 2013). El interés de esta reacción es modificar o realzar las propiedades funcionales del compuesto fenólico original. Este tipo de lipofilización es altamente selectiva y es considerada un proceso verde ya que es amigable con el medio ambiente debido a que implica condiciones de reacción más suaves, menos pasos de purificación y baja producción de residuos. La lipasa b de *Candida antarctica* es la ideal para este tipo de reacciones, se puede utilizar en operaciones de reacción discontinua y en columna; su temperatura de operación es de 40°C-60°C, y se puede recuperar fácilmente de la mezcla de reacción (Grajeda-Iglesias *et al.*, 2016; Guyot *et al.*, 1997; Marquez-Rodriguez *et al.*, 2021).
Las reacciones de lipofilización son especialmente ventajosas y eficaces, y pueden considerarse como una llave de vectorización que abre la barrera lipídica que encuentra la molécula bioactiva, manteniendo sus propiedades funcionales originales. La lipofilización de los antioxidantes fenólicos se puede realizar químicamente o enzimáticamente Figura 5 (Cruz *et al.*, 2017). Las estrategias químicas son poco utilizadas debido a la inestabilidad de estas moléculas a altas temperaturas y en ambientes alcalinos. Al mismo tiempo, la alternativa enzimática (usando lipasa como biocatalizador) tiene muchas ventajas: condiciones de reacción suaves, selectividad, reducción de subproductos, menos pasos de purificación, y

también permite implementar procesos más respetuosos con el medio ambiente de acuerdo con esta nueva era de la química verde (Durand *et al.*, 2015).

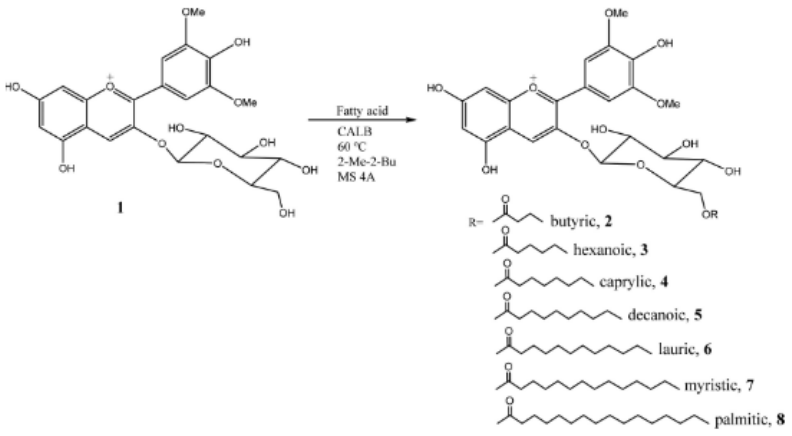

Figura 5. Representación esquemática de la lipofilización de malvidina-3-glucósido con diferentes ácidos grasos por catálisis enzimática con lipasa B de *Candida antarctica*.

IX. JUSTIFICACIÓN

La presente investigación se enfocó a la valorización de la cáscara de granada mediante un método de extracción verde, mediante el uso de solventes eutécticos profundos para la obtención de elagitaninos totales y la utilización de este tipo de solvente como medio para la lipofilización enzimática para mejorar la solubilidad de las moléculas empleando técnicas verdes que tienen un mínimo impacto ambiental y que son de creciente interés para la industria por ser alternativas sustentables que además de ayudar a disponer de los residuos agroindustriales representan menores costos de proceso, tiempo y ahorro de energía.

X. HIPÓTESIS

La lipofilización enzimática de elagitaninos totales extraídos de cáscara de granada utilizando como medio de reacción solvente eutéctico profundo, cambiará la polaridad de los mismos.

XI. OBJETIVOS

11.1 Objetivo general

Obtener elagitaninos totales de la cáscara de granada enzimáticamente modificados.

11.2 Objetivos específicos

- Implementar el uso de solventes eutécticos profundos en la extracción de elagitaninos totales.
- Evaluar el rendimiento de extracción mediante espectrofotometría.

XII. MATERIALES Y MÉTODOS

12.1 Diseño experimental

Se clasificaron los solventes DES en tres grupos o sistemas (S1, S2 y S3), en función de su polaridad, S1 sistema muy polar, S2 sistema medianamente polar y S3 sistema apolar.

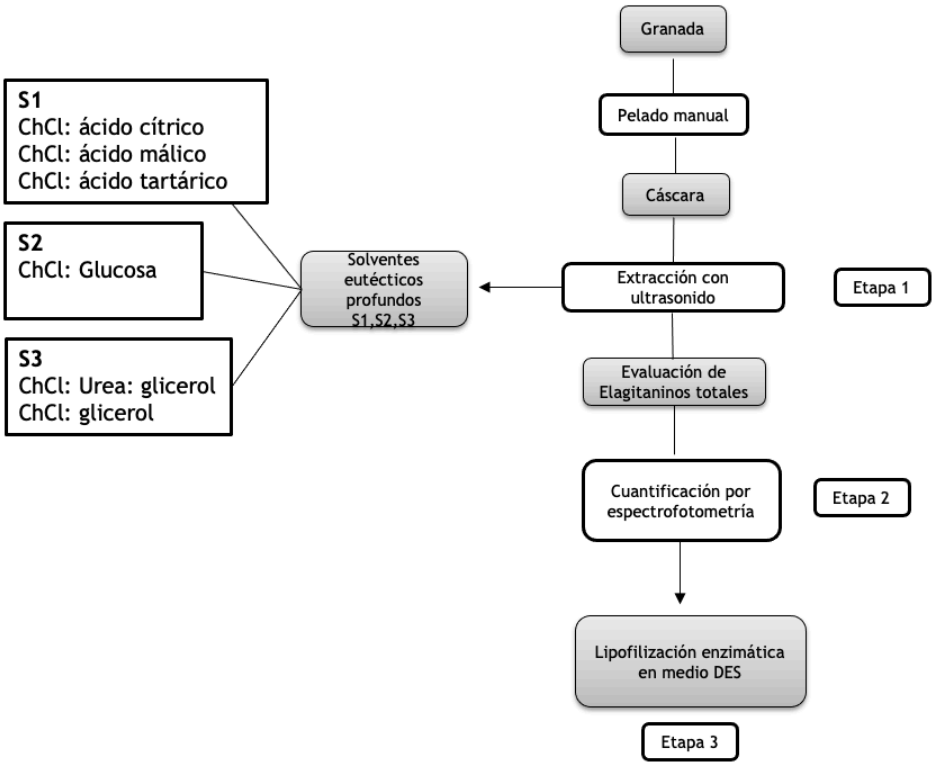

Figura 6. Estrategia experimental

12.2 Materiales y equipo

Los reactivos fueron:

- Cloruro de colina $C_5H_{14}ClNO$ (≥98 %, SIGMA ALDRICH)
- Ácido cítrico $C_6H_8O_7$*
- Ácido tartárico $C_4H_6O_6$*
- Ácido málico $C_4H_6O_5$ *

- Glucosa $C_6H_{12}O_6$ de SIGMA ALDRICH
- Urea (Laboratorio de micología FCQ UACH)
- Glicerol $C_3H_8O_3$ *
- Buffer de pH de 4,7 y 10 Laboratorio de alimentos FCQ UACH

*Reactivos de Distribuidora REMEKE (Chihuahua, Chih)

- Agua destilada
- Etanol (J.T. Baker)
- Ácido acético (J.T. Baker)
- Ácido elágico (Sigma Aldrich)
- Ácido hexanóico (Sigma Aldrich)
- Octanol (Sigma Aldrich)
- Metanol (J.T. Baker)
- Cloroformo (Golden bell reactivos)
- Acetato de etilo (Golden bell reactivos)
- Cristales de yodo (Jalmek)
- Placas cromatográficas de sílica gel 60 F254 (MERCK)
- Lipasa B de *Candida antárctica* (Sigma Aldrich)
-

Equipos:

- Balanza analítica (marca OHAUS)
- Parrilla de calentamiento con agitación thermo scientific
- Desecador
- Potenciómetro HANNA edge H12020-01
- Baño ultrasonido Fisher Scientific 15337417 110W 40 KHZ ±6
- Centrífuga Eppendorf centrifuge
- Licuadora marca OSTER
- Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS
- Incubadora con agitador orbital (MRC)
- Programa Win Lab

- Programa Minitab 2018

12.3 Materia vegetal

Granada de la variedad Wonderful obtenida de un supermercado local (Chihuahua, México), se lavó con agua destilada y se peló manualmente la cáscara y se guardó en congelación hasta la extracción.

12.4 Preparación de Mezclas de solventes tipo DES

Previamente los reactivos se secaron en el desecador 24 horas antes de su uso.
Para obtener las mezclas eutécticas se mezcló el cloruro de colina con el donante de enlace hidrógeno en las proporciones que a continuación se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Proporciones molares de los DES utilizados en este estudio.

Sal Aceptor de enlace hidrógeno	Donante de enlace hidrógeno	Proporción	Código	Sistema
ChCl	Ácido cítrico	1:1	DES1	S1
ChCl	Ácido málico	1:1	DES2	S1
ChCl	Ácido tartárico	1:1	DES3	S1
ChCl	Glucosa	1:1	DES4	S2
ChCl	Glicerol	1:1	DES5	S3
ChCl	Urea:Glicerol	1:1:1	DES6	S3

Una vez mezclados completamente se mantuvieron en constante agitación a una temperatura de 80°C de 2 a 4 horas hasta la aparición de un liquido transparente, y se agregó el 30% de agua para cada DES, se les hizo la medición de pH para finalmente guardarlos en un frasco ámbar con tapa a temperatura ambiente.

12.5 Extracción con solventes tipo DES

Se trituró la cáscara en la licuadora y se pesó 1g de cáscara en un vaso de precipitado de 50 ml (Todos los solventes DES se hacen por triplicado incluyendo los controles Etanol y agua). Se añadieron 10 ml de solvente (Relación cáscara solvente 1:10) y se cubrió la boca del vaso de precipitado con parafilm, se pusieron las muestras en el baño ultrasonido asegurándose de que el nivel de agua cubriera completamente la solución y se agregó hielo al baño para mantener la temperatura. El baño ultrasonido se programó para un tiempo de 10 minutos., una vez cumplido este tiempo se retiraron las muestras del baño y se colaron, el liquido sobrante se depositó en un tubo falcón. Una vez coladas las muestras, se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos. Las muestras se filtraron con filtro whatman #40 con el fin de obtener un líquido sin materia vegetal y finalmente se guardaron en congelación a -4°C hasta su uso posterior.

12.6 Cuantificación de elagitaninos totales por espectrofotometría

12.6.1 Curva de calibración de ácido elágico

Se determinó de curva de calibración de ácido elágico a partir de una solución madre de 1000 ppm de ácido elágico y a partir de la solución madre de 1000 ppm de ácido elágico se preparan soluciones de 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm,100 ppm. Se midieron absorbancias de cada solución a 378 nm para posteriormente construir la curva y calcular la ecuación de la recta.

12.6.2 Cuantificación de elagitaninos totales

Se diluyó el extracto 25 veces o 50 veces (en agua) según sea el caso. (1ml y aforar a 25 ml en matraz aforado), se midió la absorbancia a 378 nm en espectrofotómetro y se registraron las mediciones de absorbancia para cada uno de los DES y los controles. Se calculó la concentración de elagitaninos totales de cada muestra y se realizó el análisis estadístico ANOVA y TUKEY.

12.7 Lipofilización enzimática

Se siguió el procedimiento de Durand, 2013 modificado.

Los ensayos se llevaron a cabo en frascos herméticamente sellados los cuales contenían 1 ml de DES (ChCl: urea: glicerol y ChCl:glicerol), los cuales contenían 1.44 x 10^{-4} mol y 1.46 x 10^{-4} mol equivalentes de ácido elágico respectivamente). Se hicieron tres repeticiones de controles (DES sin enzima con alcohol graso y ácido graso), DES con enzima y ácido hexanóico/octanol. Para la muestra de ChCl: glicerol la cual contenía en 1 ml; 1.46 x 10^{-4} moles de equivalentes de ácido elágico, se añadió 8.76 x 10^{-4}moles de ácido hexanóico y al otro frasco de reacción se añadieron 8.76 x 10^{-4}moles de octanol (el ácido hexanóico y octanol están en moles equivalentes de ácido elagico). Para la muestra de ChCl: urea: glicerol la cual contenía en 1 ml; 1.44 x 10^{-4} moles de equivalentes de ácido elágico, se añadió 8.64 x 10^{-4} mol de ácido hexanóico, para la otra muestra de reacción se añadieron 8.64 x 10^{-4} mol de octanol (siguiendo lo establecido por Durand,2013). La reacción se inició añadiendo 150 mg de enzima (Lipasa B de *Candida antárctica*), luego la reacción se mantuvo en constante agitación a 200 rpm a 60ºC por 72 horas. La reacción fue monitoreada por cromatografía de capa fina. Se utilizaron para la reacción de lipofilización los DES a base de glicerol, los cuales resultaron mejor en la extracción de elagitaninos totales.

XIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

13.1 Rendimiento y selección del mejor solvente eutéctico profundo para extracción de elagitaninos totales.

Los resultados de la extracción con solventes tipo DES con ultrasonido se muestran en la Tabla 2, con la media de sus valores y su desviación estándar.

Tabla 2. Rendimiento de extracción con solventes eutécticos. En g de equiv. Ácido elágico por 100 g de muestra de cáscara de granada en base húmeda para diferentes sistemas DES.

DES	Concentración g equivalentes ácido elágico por 100 g de muestra
ChCl: urea: glicerol S3	4.37376238±0.0517416[A]
ChCl: glicerol S3	4.2754125±0.1235844[AB]
ChCl: ácido tartárico S1	4.116667±0.1648346[ABC]
ChCl: glucosa S2	3.863036±0.1084897[C]
ChCl: ácido cítrico S1	2.161964±0.0230029[D]
ChCl: ácido málico S1	1.954373±0.1498587[D]
CT Etanol	2.07392739±0.04912[D]
CT Agua ácida 2%	4.05924092±0.0393567[BC]

Los valores presentados son las medias de 3 réplicas ± desviación estándar. Las medias por fila con letras diferentes presentan diferencia significativa, prueba de Tukey ($p < 0.05$). Orden de mayor a menor extracción, con los controles etanol y agua al final.

El sistema 3 (ChCl: urea: glicerol y ChCl: glicerol) y el sistema 1 (ChCl: ácido tartárico) fueron los sistemas y mezclas que presentaron mayor rendimiento de gramos de equivalentes ácido elágico en 100 g de muestra, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los sistemas, por lo que cualquiera se puede utilizar para la extracción de elagitaninos totales de la cáscara de granada. Comparando la extracción utilizando solventes eutécticos y el etanol como solvente convencional, se obtuvo un menor rendimiento utilizando etanol en comparación con los sistemas de los cuales se obtuvo mayor rendimiento, esto es positivo ya que estos solventes eutécticos representan una opción o alternativa al uso de solventes orgánicos, para así tener un proceso verde, que sea amigable con el ambiente, sin ser tóxico y biodegradable.

La extracción utilizando DES en cáscara de granada se llevó a cabo en otro estudio (Rajha *et al.*, 2019), donde utilizaron 8 diferentes DES, entre los principales resultados obtuvieron que el DES-3 compuesto por glicerol: glicina 3:1 fue el que presentó mejor rendimiento de extracción con 114 mg/g materia seca de polifenoles

con la técnica de ultrasonido, y compararon este tipo de solventes contra un solvente convencional, el etanol, obteniéndose rendimientos mayores. Aunque no se puede hacer una comparación de resultados con esta investigación debido a que se utilizaron DES diferentes y condiciones de extracción, así como también las variedades de granada que se utilizaron fueron diferentes en los estudios; sin embargo, podemos resaltar al glicerol como componente de las mezclas en ambos estudios donde se obtuvieron altos rendimientos, en nuestro estudio la mezcla del sistema de solventes 3 esta compuesta por ChCl: glicerol y ChCl: urea: glicerol, los cuales contienen glicerol como compuesto en común el cual es catalogado como un poliol (Figura 7), los polioles son alcoholes con más de dos grupos hidroxilo.

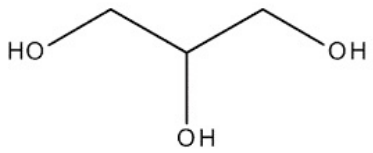

Figura 7. Glicerol

Los disolventes formados por polialcohol (glicerol) tienen menor viscosidad en comparación con los formados por ácido o azúcar, en ese orden porque las moléculas más pequeñas como el polialcohol, proporcionan interacciones moleculares más débiles (Dai *et al.*, 2013), la viscosidad baja de estas mezclas DES conduce a un aumento de la difusividad, lo que puede ser factor importante para mejorar la eficacia de extracción. En comparación con el sistema de solventes 1 (ChCl: ácido tartárico), el cual está compuesto por el ácido tartárico, un ácido orgánico polifuncional, cuyo grupo funcional principal es el carboxilo, contiene dos grupos carboxílicos y dos grupos alcohol en una cadena de hidrocarburo lineal y es considerado un ácido débil (Figura 8).

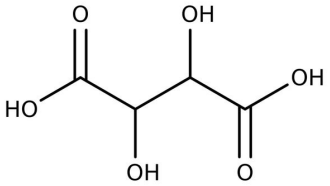

Figura 8. Ácido tartárico

Como se puede observar en la figura 9, no hubo diferencia significativa entre estos sistemas de solventes y el rendimiento que tuvieron se podría atribuir a que estos presentaron una viscosidad menor en comparación con los demás solventes, la alta viscosidad es una de las limitantes en la aplicación de estos ya que limita la transferencia de masa entre la muestra y la fase de extracción (Dai *et al.*, 2015). Los disolventes con grupos carboxílicos como el ácido cítrico (tres grupos carboxílicos) son mas viscosos debido al aumento de las fuerzas intermoleculares (Savi *et al.*, 2019)

La alta viscosidad de las mezclas DES se disminuyo agregando el 30% de agua a la mezcla, resultando favorablemente para el manejo de la misma en el proceso de extracción. El contenido de agua en el DES además de disminuir la viscosidad, promueve la transferencia de masa, promueve la eficiencia de extracción, cambia la polaridad del DES, si esta se agrega en proporciones del 20-30%, si se agrega mas de esta cantidad puede resultar negativo ya que puede generar la interrupción de los enlaces hidrógeno entre los componentes del DES y limita las interacciones de hidrógeno entre los compuestos fenólicos y el DES, lo cual no favorece la extracción (Vilková *et al.*, 2020).

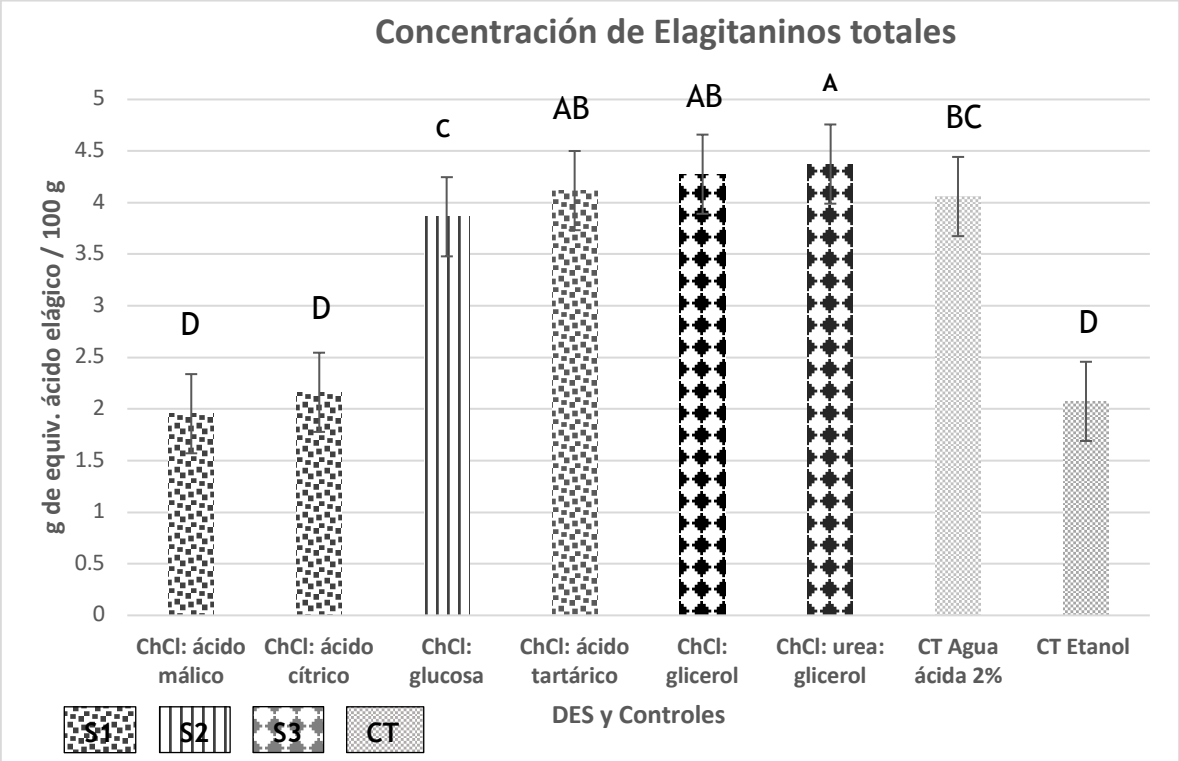

Figura 9. Concentración de elagitaninos totales. Concentración en gramos de equivalente de ácido elágico por 100 g de muestra de acuerdo a la extracción asistida con ultrasonido. Cada barra representa la media de cada DES por triplicado n=3. Análisis estadístico mediante ANOVA de un solo factor y análisis de medias por el método de Tukey para identificar los DES diferentes. Las medias que no comparten una letra son significativamente distintas ($P < 0.05$).

Según lo que dice la literatura respecto a los DES y la extracción se menciona que los DES a base de ácidos orgánicos son más polares, seguido de los de base amino-azúcar y por último los DES a base de polialcoholes, los cuales son menos polares (Bosiljkov *et al.*, 2017; Radošević *et al.*, 2016) por lo que la polaridad esta relacionada con la eficiencia de extracción siendo los más polares los que mejor rendimiento presentarían, el DES a base de ácido orgánico que resulto tener el mejor rendimiento fue el DES conformado por ácido tartárico, este DES con grupos carboxílico extrajo una mayor cantidad de polifenoles respecto al ácido cítrico y ácido málico, puede deberse a que este presentaba una viscosidad baja en comparación con los otros ácidos y debido a su estructura compuesta por grupos carboxilo, se puede decir que interactuó mas fuertemente con los polifenoles formando enlaces hidrógeno.

Esto sugiere que los DES con estructuras cortas o pequeñas de tipo poliol o ácido policarboxílico interactúan más fácilmente con los compuestos fenólicos objetivo que los DES con estructuras grandes. Esto indicaría que la eficiencia de extracción de los compuestos fenólicos objetivo se ve afectada por el obstáculo estérico alrededor del donante de enlace hidrógeno en los DES a base de ChCl (Fu *et al.*, 2017).

El hecho de que los DES a base de glicerol mostró eficiencias mucho más altas que los otros solventes, evidenciaron que su polaridad coincidía mejor con la de los constituyentes polifenólicos presentes en la cáscara de granada. Dado que no existe un único parámetro físico asociado con las interacciones soluto-disolvente a nivel molecular, la evaluación de la polaridad del disolvente debe basarse en las respuestas de los solutos que tienen amplia variedad de funcionalidades. La cáscara contiene una amplia variedad de polifenoles, derivados del ácido fenólico, flavonoides, antocianinas, taninos hidrolizables (Pandey *et al.*, 2014).

La polaridad de los DES indica que puede que no sea el parámetro que defina la capacidad de extracción de las mezclas eutécticas, sino que también deben de tenerse en cuenta otras propiedades, incluida la viscosidad. Se debe enfatizar que la polaridad puede regularse mediante la combinación con agua; si se conoce la naturaleza de los polifenoles a extraer, el contenido de agua podría optimizarse. También otro factor a considerar sobre la capacidad de extracción puede ser el papel de la relación HBD: HBA, como en el caso de un estudio donde aumentaron la proporción molar de cloruro de colina glicerol de 1:2 a 1:4, obteniendo una recuperación de catequina significativa (Zhang *et al.*, 2014).

Otro factor que se tendría que considerar es el pH de los disolventes DES en la extracción. El pH varía en función de los componentes del disolvente. En general, los disolventes eutécticos profundos de base ácida (pH bajo), presentan una excelente propiedad de disolución debido a la capacidad de donar protones y aceptar electrones, y pueden utilizarse para recuperar compuestos de baja polaridad como

la catequina, así como compuestos polares como las antocianinas (Bosiljkov *et al.*, 2017). Por otro lado, los DES constituidos por polialcoholes como el 1,2-propilenglicol, con pH neutro, presentan una alta capacidad de extracción de ácido fenólico. Los DES constituidos por componentes azúcar, también con pH neutro, presentan una alta recuperación de flavonoides (Ivanović *et al.*, 2018). Así que además de la viscosidad y la polaridad, también se debe de tomar en cuenta el pH y las estructuras químicas tanto del DES como de el o los compuestos objetivo que se quieren extraer.

Mouratoglou y colaboradores utilizaron DES a base de cloruro de colina y glicerol donde obtuvieron mayor eficiencia de extracción de compuestos fenólicos a partir de diferentes residuos agroindustriales con respecto a etanol acuoso, obteniendo un total de 53.76 mg EAG $g^{-1}{}_{\text{muestra seca}}$ a partir de cáscara de limón, y con etanol acuoso 27.08 mg EAG $g^{-1}{}_{\text{muestra seca}}$ (Mouratoglou *et al.*, 2016).
En otro estudio se comenta que también tiene que ver el método de extracción, se comparó la extracción con temperatura 60°C, temperatura ambiente y extracción con ultrasonido donde a temperatura de 60°C con agitación dio resultados más altos de flavonoides en comparación con las otras dos técnicas, así mismo probaron diferentes radios de ChCl/HBD donde se seleccionó una relación molar de 1:5 mol/mol (Bi *et al.*, 2013).

Se tienen que tomar en cuenta las propiedades fisicoquímicas de los DES ya que son factores que afectan la eficacia de extracción, además se debe de tomar en cuenta la estructura de los polifenoles para en base a ellos poder elegir el mejor DES para la extracción, y tomar en cuenta el proceso y condiciones para la obtención de los compuestos bioactivos y optimizarlos.

13.2 Lipofilización de elagitaninos totales

Se utilizaron los DES a base de glicerol que corresponden al sistema 3 (apolar) para llevar a cabo las reacciones de lipofilización, se utilizó octanol y ácido hexanóico como cadena alifática para determinar cual es mejor para la reacción enzimática, cada prueba se hizo por triplicado para posteriormente hacer cromatografía de capa fina en la cual se utilizaron como solventes de elución metanol y agua ácida al 2%.

Tabla 3. Sistemas de reacción utilizados para la lipofilización.

Código	*DES*	*Enzima*	*Sin enzima*	*Ácido graso / alcohol graso*
1	Control ChCl: urea: glicerol	✕	✓	Octanol
2	ChCl: urea: glicerol	✓	✕	Octanol
3	Lavado de la enzima	✕	✕	✕
4	Control ChCl: urea: glicerol	✕	✓	Ácido hexanóico
5	ChCl: urea: glicerol	✓	✕	Ácido hexanóico
6	Lavado de la enzima	✕	✕	✕
7	Control ChCl: glicerol	✕	✓	Octanol
8	ChCl: glicerol	✓	✕	Octanol
9	Lavado de la enzima	✕	✕	✕

(Continuación)

10	Control ChCl: glicerol	✕	✓	Ácido hexanóico
11	ChCl: glicerol	✓	✕	Ácido hexanóico
12	Lavado de la enzima	✕	✕	✕

Se realizó un análisis ANOVA y prueba de Tukey para comparar los diferentes sistemas de reacción y se utilizó la cromatografía en capa fina con el fin de monitorear la reacción en tres diferentes eluyentes (metanol, etanol y agua) a través de sus frentes de referencia y se obtuvieron los siguientes resultados:

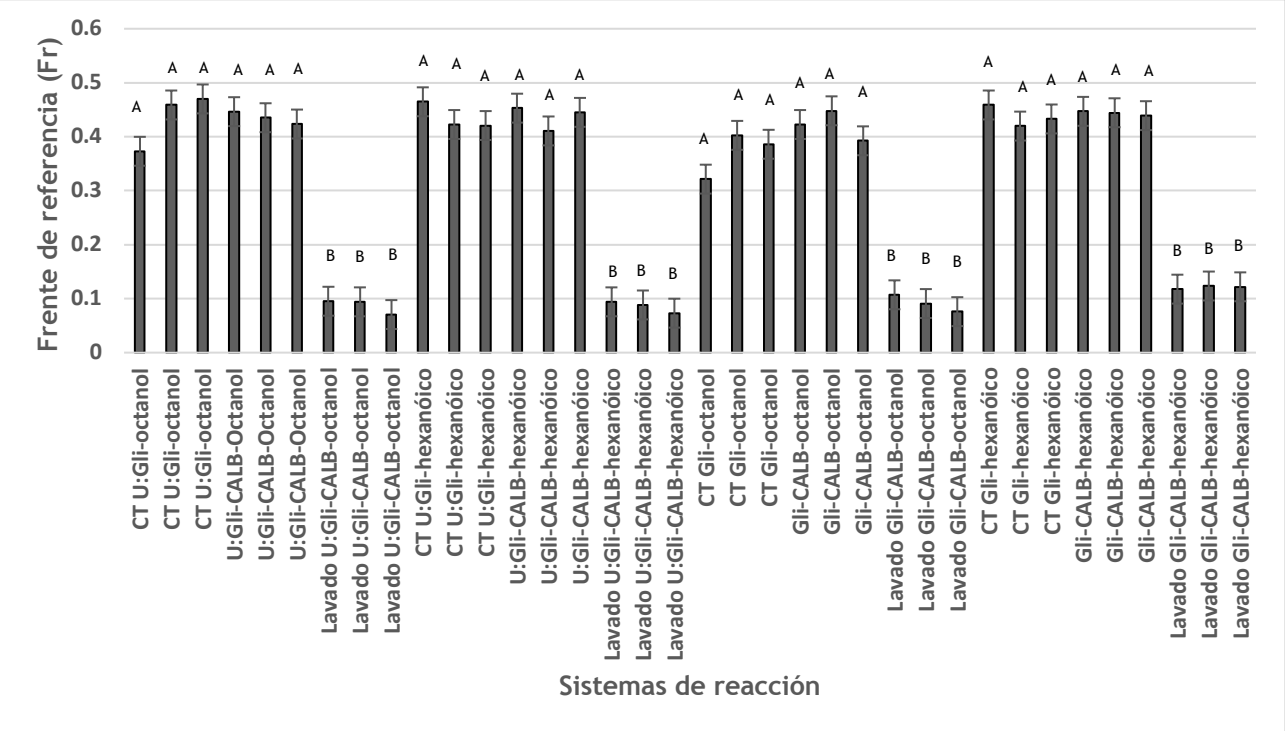

Figura 10. Gráfico de los diferentes sistemas de reacción empleados y sus frentes de referencia. Cada barra representa la media de cada sistema de reacción por triplicado n=3. Análisis estadístico mediante ANOVA de un solo factor y análisis de medias por el método de Tukey para identificar los sistemas de reacción diferentes. Las medias que no comparten una letra son significativamente distintas ($P < 0.05$). (Eluyente utilizado en la capa fina: Metanol)

Se llevaron a cabo varias pruebas para poder revelar la capa fina, primero se utilizó como eluyente una mezcla de cloroformo: metanol, acetato de etilo, cloroformo, no se obtuvieron buenos resultados debido a que con estos solventes no se alcanzaba a ver ningún cambio en la migración de las moléculas, por lo que se decidió utilizar metanol, etanol y agua.

La figura 10 nos muestra que no hubo diferencia significativa entre los controles y las muestras, excepto para los lavados los cuales fueron significativamente diferentes a los controles de cada sistema de reacción.

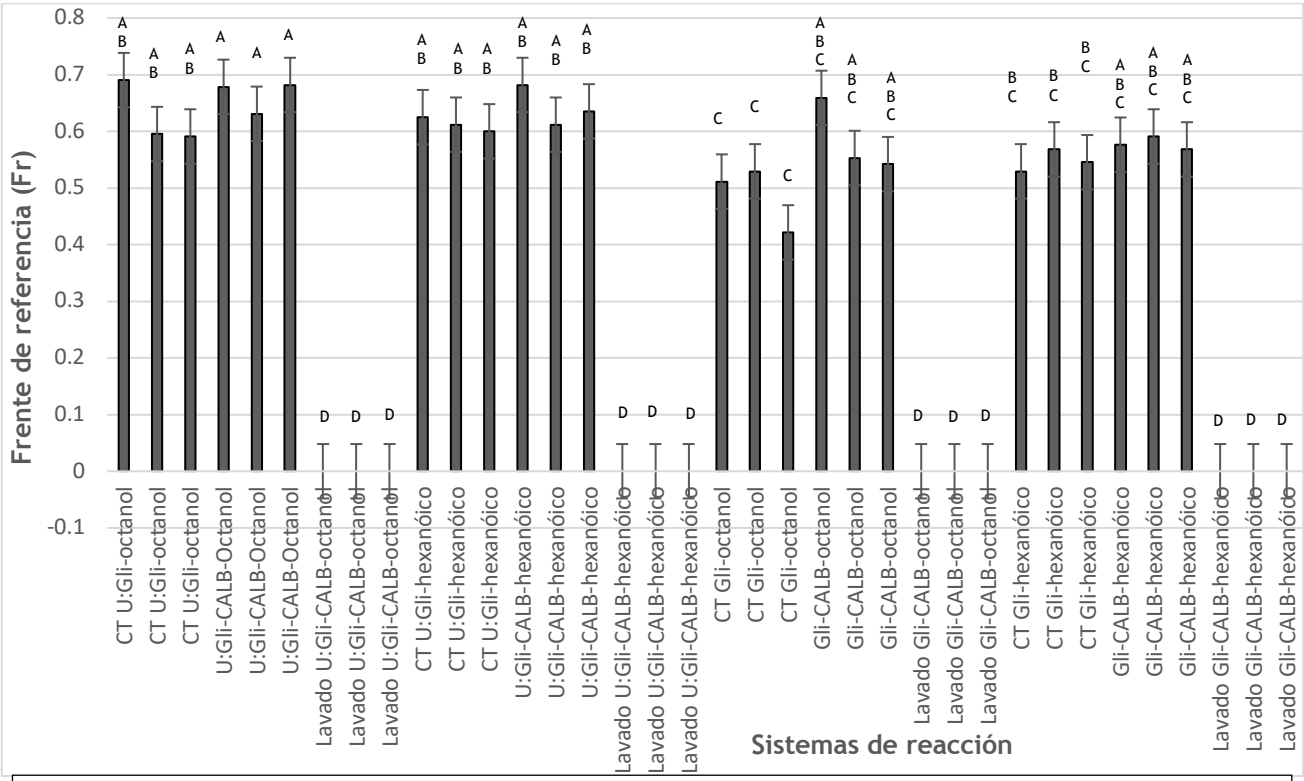

Figura 11. Gráfico de los diferentes sistemas de reacción empleados y sus frentes de referencia. Cada barra representa la media de cada sistema de reacción por triplicado n=3. Análisis estadístico mediante ANOVA de un solo factor y análisis de medias por el método de Tukey para identificar los sistemas de reacción diferentes. Las medias que no comparten una letra son significativamente distintas ($P < 0.05$). (Eluyente utilizado en la capa fina: Agua).

En la figura 11 podemos observar que no hay diferencia significativa entre los diferentes controles y los sistemas, es decir todos se comportan igual.

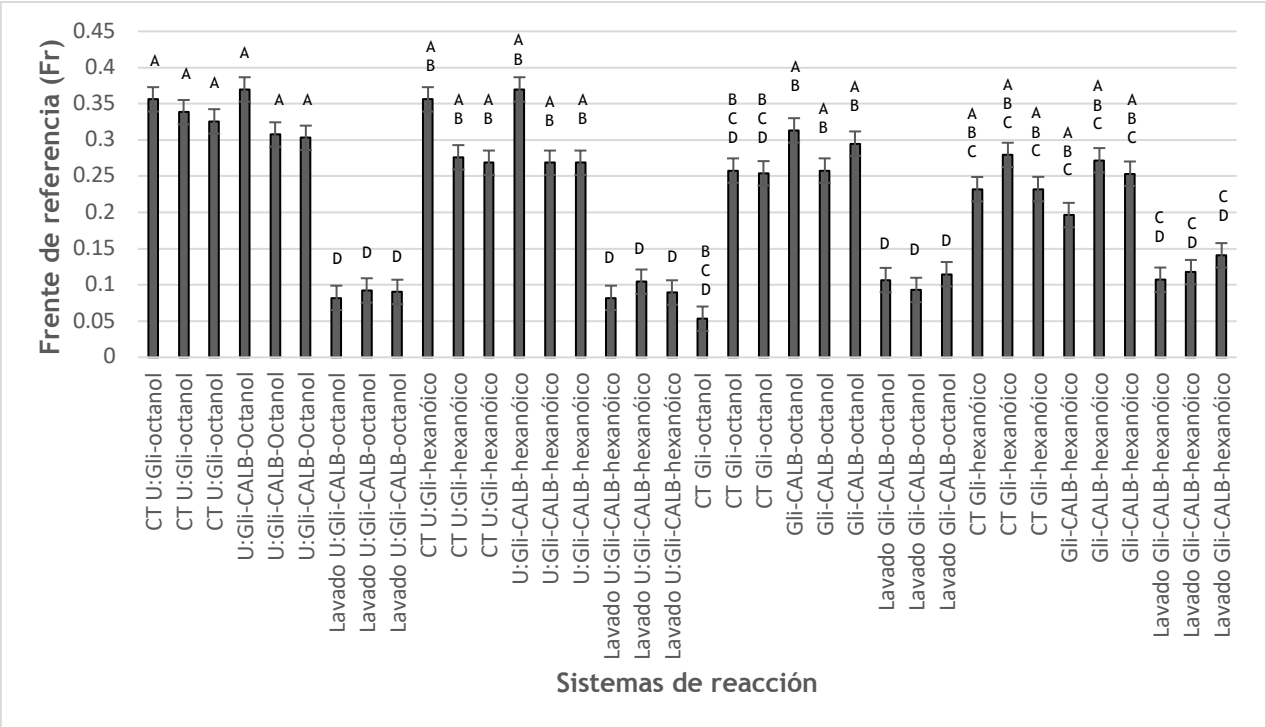

Figura 12. Gráfico de los diferentes sistemas de reacción empleados y sus frentes de referencia. Cada barra representa la media de cada sistema de reacción por triplicado n=3. Análisis estadístico mediante ANOVA de un solo factor y análisis de medias por el método de Tukey para identificar los sistemas de reacción diferentes. Las medias que no comparten una letra son significativamente distintas ($P < 0.05$). (Eluyente utilizado en la capa fina: Etanol).

Al igual que en los demás análisis estadísticos la figura 12 muestra que no hay diferencia significativa entre controles y muestras con la enzima, aun utilizando diferentes longitudes de cadena tanto de ácido hexanóico y octanol, lo que llama la atención es que en todos los sistemas de reacción los lavados resultaron ser estadísticamente diferentes a los controles y reacciones con lipasa, esto podría indicar que la reacción se saturó y al hacer los lavados con metanol algunas moléculas o compuestos que interferían se descartaron, quedando un complejo mas puro.

A continuación, se muestran algunas imágenes de las diferentes reacciones en la placa cromatográfica donde se puede apreciar que en efecto si existe algún complejo

de moléculas o compuestos los cuales se puede notar que migraron a través de la placa al teñirla con cristales de yodo.

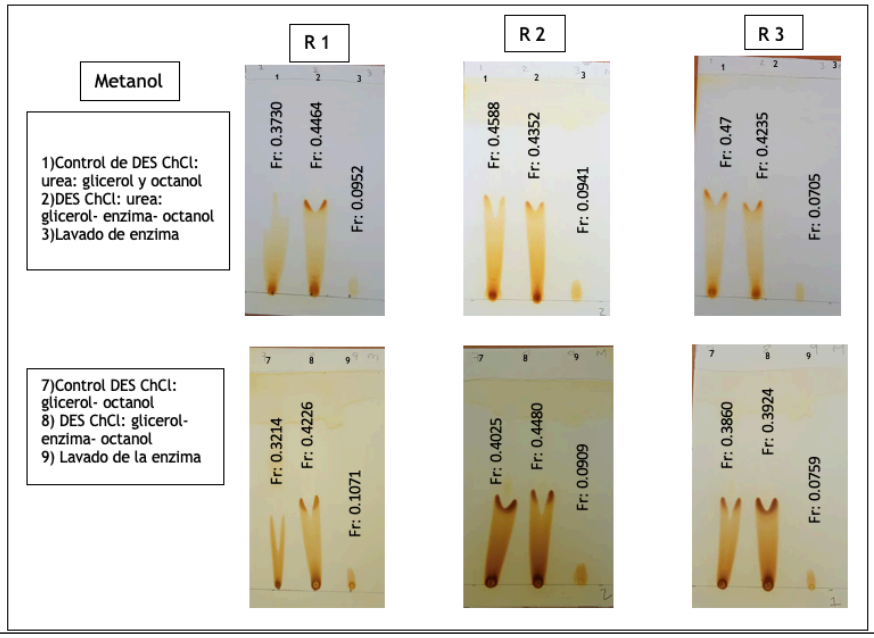

Figura 13. Placas cromatográficas de capa fina utilizando como eluyente metanol.

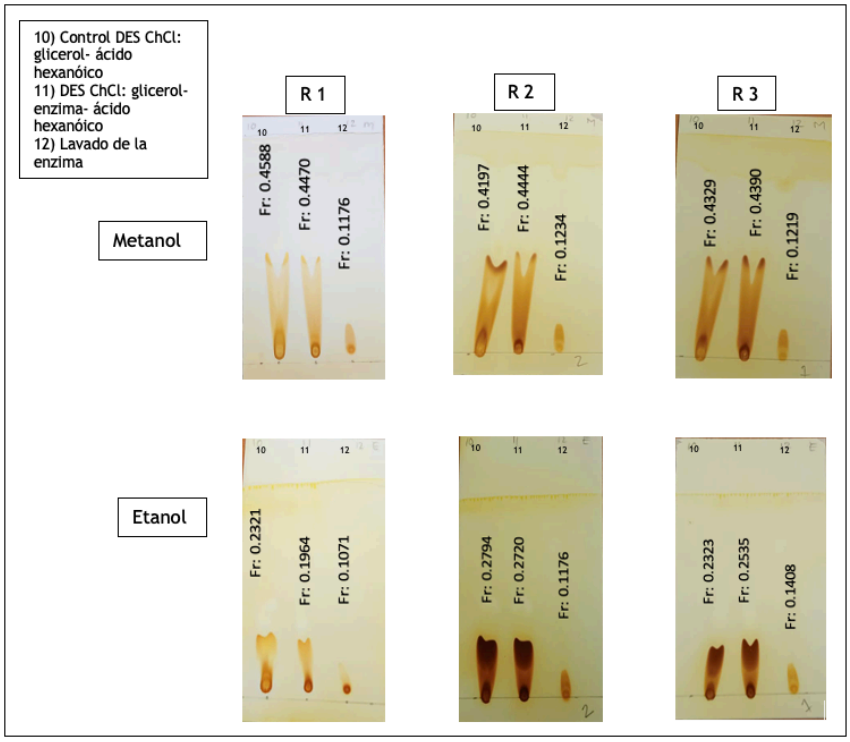

Figura 14. Placas cromatográficas de capa fina utilizando como eluyente metanol y etanol.

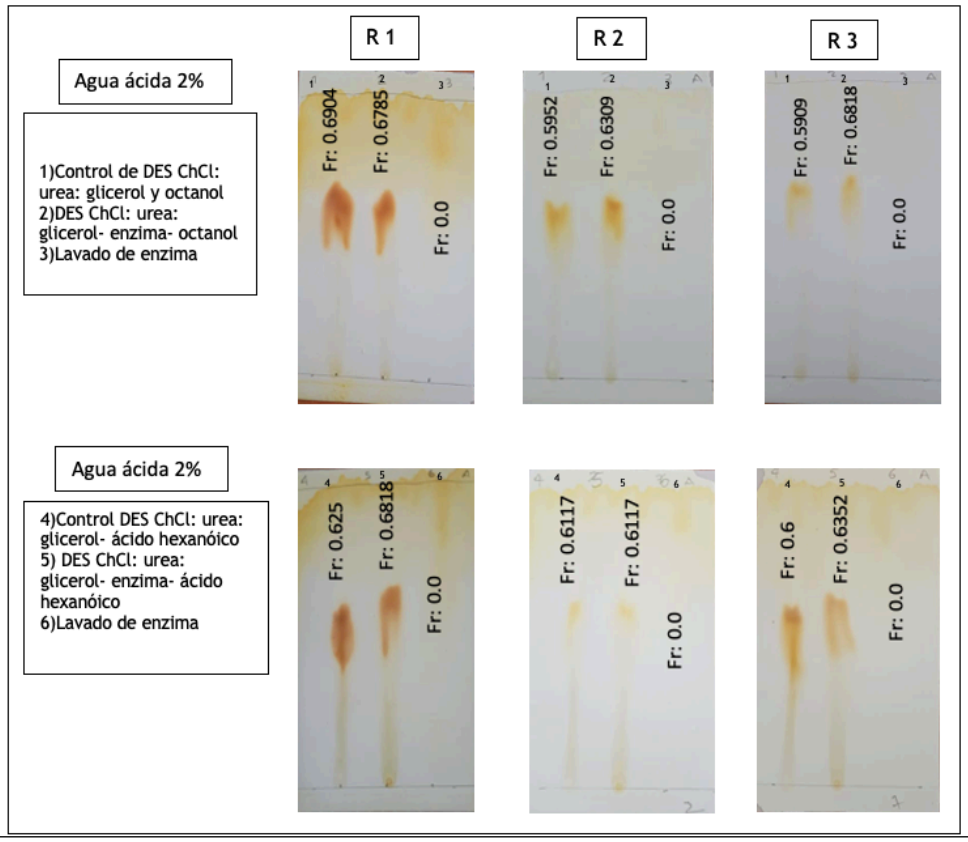

Figura 15. Placas cromatográficas de capa fina utilizando como eluyente agua ácida al 2%.

Como se puede observar en las figuras anteriores, se alcanza a observar como los compuestos o moléculas migran a través de la placa, siendo unos más polares que otros.

Estadísticamente no hay diferencia entre controles y sistemas de reacción en ácido hexanóico y octanol, si hay compuestos en la muestra, pero no se sabe que son. La cromatografía en capa fina es una técnica útil para la separación e identificación de compuestos fenólicos y su comparación con el comportamiento de patrones. No obstante, las conclusiones que se obtienen con esta técnica, no pueden considerarse como definitivas, sino simplemente como apoyo a otras técnicas (Arias-Camison, 1994). En este caso se tendría que hacer uso de técnicas como HPLC para saber que moléculas o compuestos conforman las mezclas de reacción y en base a ello poder decidir sobre la forma en que se podría trabajar o modificar la reacción.

Los sistemas de reacción utilizados están formados por o son resultado de la extracción de elagitaninos totales, es decir están compuestas por un consorcio de moléculas que no están identificadas por otro método analítico.

La lipofilización de estas moléculas no sucedió, esto se puede atribuir a ciertos factores los cuales podrían ser que no se tenia un extracto puro con la molécula o compuesto objetivo para lipofilizar, el pH, temperatura, la naturaleza de los sustratos, el agua, todos estos implicados en la reacción.

El pH puede afectar el estado de ionización básica o ácida de los aminoácidos de las cadenas laterales de la enzima lo cual provoca que la forma de la proteína se altere lo que da como resultado que pueda perder actividad o volverse inactiva (González Bacerio *et al.*, 2010). Estos cambios de pH pueden deformar la enzima y cambiar sus propiedades de forma que el sustrato ya no puede unirse al sitio activo. La temperatura del sistema, los enlaces hidrógeno de baja energía que intervienen en la conservación de la estructura y la formación de complejos sustrato-enzima, se ven favorecidos a bajas temperaturas pueden volverse frágiles al aumentar la temperatura. Al aumentar la temperatura del sistema también aumenta la energía interna de las moléculas al igual que la energía implicada en los enlaces químicos inter e intramoleculares, lo que hace que la energía potencial química aumente lo que provoca la ruptura de enlaces débiles que determinan la estructura de la proteína activa, y da como resultado la desnaturalización de la proteína y, por tanto, su inactivación. Al ser inactiva la enzima no se pueden llevar a cabo las reacciones (Gupta *et al.*, 2004).

La naturaleza de los sustratos también tiene un efecto en la reactividad y actividad de la enzima. La naturaleza química de el donante de acilo también puede influir en la eficacia de la reacción. Por ejemplo, el uso de un ácido graso donante de acilo en un proceso de esterificación directa dará lugar a la formación de agua y esta agua liberada durante la reacción será un nuevo sustrato nucleófilo potencial para la lipasa, y en este sentido, participará en la reversibilidad de la reacción. Un alternativa para eliminar el agua formada es el uso de tamices moleculares (Villeneuve, 2007).

Se pueden utilizar otros donantes de acilo, como los ésteres de metilo o etilo. El uso de tales ésteres es mas ventajoso en comparación con los ácidos grasos libres, ya que la eliminación de alcoholes formados es térmicamente más fácil que la eliminación del agua, también se pueden utilizar donantes de acilo del tipo vinilo.

Investigadores como Durand han llevado a cabo este tipo de reacciones modelo (Catálisis del laurato de vinilo) con alcoholes primarios de diferentes longitudes de cadena, utilizando el éster de vinilo como donante acilo y una forma de evaluar las actividades de la lipasa en solventes eutécticos profundos donde describen que en este tipo de solventes el donante de enlace hidrogeno desempeña un papel de nucleófilo o de donante de acilo y compite con uno de los sustratos de reacción, siendo este uno de los parámetros mas importante para la validación de un solvente eutéctico como medio para reacciones catalizadas por la lipasa. En ese estudio determinaron que hacer una molienda previa del catalizador era factible para obtener una cinética rápida y con resultados reproducibles, como se sabe los solventes eutécticos profundos son viscosos y esta propiedad influye en la transferencia de masa, lo que dificulta la homogeneización del medio con un catalizador no molido (Durand, 2013).

En esa misma investigación se llevo a cabo la alcohólisis del p-cumarato de metilo en los diferentes solventes eutécticos, al final de la reacción obtuvieron una conversión casi nula, sin formación del derivado lipofílico, y dedujeron que el p-cumarato se asoció a la red de enlaces hidrogeno de el solvente eutéctico ya que estos presentan propiedades de solvatación fuertemente influenciadas por enlaces hidrogeno y da lugar a una alta afinidad por compuestos que donan electrones o protones y el p-cumarato siendo un compuesto fenólico que contiene un anillo aromático sustituido con diferentes grupos funcionales los cuales establecen enlaces de hidrogeno intermoleculares con el solvente, por lo cual siendo esta asociación tan fuerte que apenas esta disponible para la reacción. Concluyeron que era necesario la adición de un co-solvente (agua) para poder reducir la interacción entre el solvente eutéctico y

el sustrato, haciéndolo mas disponible para la reacción. Lo cual resultó en un aumento significativo de la tasa de conversión.

En la investigación anterior se sintetizaron derivados lipofílicos de ácido ferúlico y cumárico de C_4 a C_{16} (cadena alifática) en altos rendimientos (Durand *et al.*, 2012; Durand *et al.*, 2013).

Los factores anteriores descritos pudieron haber afectado nuestros sistemas de reacción. El dominio y la comprensión de estos parámetros son necesarios para la optimización de la catálisis enzimática. Se tienen que tomar en cuenta varios factores desde el momento de la síntesis del solvente eutéctico hasta las condiciones de reacción de la lipasa en este tipo de medios.

Otros autores han reportado la lipofilización enzimática con gran éxito, como el caso de otros polifenoles (definidina 3-O-sambubiosido) el cual fue esterificado con ácido octanóico utilizando la lipasa B de *Candida antárctica,* obteniendo un compuesto con diferente lipofilicidad además de muy estable lo cual amplia su campo de aplicación a otro sectores (Marquez-Rodriguez *et al.*, 2021)

XIV. CONCLUSIÓN

La cáscara de granada es una fuente importante de compuestos fenólicos (Elagitaninos totales).

El sistema de solventes S3 (ChCl: urea: glicerol y ChCl: glicerol) mostraron mayor rendimiento en la extracción de elagitaninos totales. En segundo lugar, el sistema de

solventes S1 (ChCl: ácido tartárico), ambos sistemas mostraron mejores rendimientos que el etanol (solvente convencional).

La extracción asistida con ultrasonido en combinación con los solventes eutécticos profundos mejoró el proceso de extracción, ya que se utilizaron cortos tiempos de extracción, se ahorraron grandes cantidades de solvente y se ahorro energía.

Las tecnologías VERDES como los solventes eutécticos profundos y ultrasonido son más amigables con el medio ambiente, son biodegradables, no tóxicas, de fácil operación en comparación con técnicas convencionales.

No fue viable la lipofilización enzimática de elagitaninos totales de la cáscara de granada debido a que todos los sistemas de reacción no mostraron diferencia significativa entre ellos, es decir se comportaron igual agregando la enzima así como no agregando enzima al sistema se esperaba que en las placas cromatográficas se visualizara algún cambio en la migración de las moléculas implicadas, por lo cual se recomienda la utilización de equipos mas especializados para poder identificar los compuestos que forman parte de la mezcla de reacción y poder monitorear paso a paso lo que ocurre para así darnos una idea de el progreso de la reacción.

XV. ESTUDIOS PROSPECTIVOS

En base a los resultados obtenidos se recomienda optimizar los diferentes factores de extracción con las mezclas eutécticas, probando y comparando desde la proporción molar de los solventes, la cantidad de agua, los tiempos de extracción, la temperatura, para poder optimizar estos parámetros y tener al final un proceso fijo que nos ayude a obtener los compuestos objetivo que se planeen extraer.

Se recomienda optimizar la reacción de lipofilización en medio no acuoso y tomar en cuenta los factores ya antes mencionados, así mismo identificar los compuestos que forman parte de los sistemas de reacción.

XVI. BIBLIOGRAFÍA

Akhtar, S., Ismail, T., Fraternale, D., & Sestili, P. (2015). Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chemistry*, *174*(November), 417–425. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.035

Alonso, D. A., Baeza, A., Chinchilla, R., Guillena, G., Pastor, I. M., & Ramón, D. J. (2016). Deep Eutectic Solvents: The Organic Reaction Medium of the Century. *European Journal of Organic Chemistry*, *2016*(4), 612–632. https://doi.org/10.1002/ejoc.201501197

Arias-camison, E. M. C. (1994). *•Udihmum * 5309556495*.*

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, *99*(1), 191–203. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042

Bi, W., Tian, M., & Row, K. H. (2013). Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *Journal of Chromatography A*, *1285*, 22–30. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.041

Bonacci, S., Di Gioia, M. L., Costanzo, P., Maiuolo, L., Tallarico, S., & Nardi, M. (2020). Natural deep eutectic solvent as extraction media for the main phenolic compounds from olive oil processing wastes. *Antioxidants*, *9*(6), 1–14. https://doi.org/10.3390/antiox9060513

Bosiljkov, T., Dujmić, F., Cvjetko Bubalo, M., Hribar, J., Vidrih, R., Brnčić, M., Zlatic, E., Radojčić Redovniković, I., & Jokić, S. (2017). Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food and Bioproducts Processing*, *102*(16), 195–203.

https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.12.005

Charalampia, D., & Koutelidakis, A. E. (2017). *From Pomegranate Processing By-Products to Innovative value added Functional Ingredients and Bio-Based Products with Several Applications in Food Sector*. *3*(1).

Charalampia et al., 2017. (2017). *From Pomegranate Processing By-Products to Innovative value added Functional Ingredients and Bio-Based Products with Several Applications in Food Sector*. *3*(1), 1–7.

Cruz Figueroa-Espinoza, M., Laguerre, M., Villeneuve, P., & Lecomte, J. (2013). From phenolics to phenolipids: Optimizing antioxidants in lipid dispersions. *Lipid Technology*, *25*(6), 131–134. https://doi.org/10.1002/lite.201300277

Cruz, L., Guimarães, M., Araújo, P., Évora, A., De Freitas, V., & Mateus, N. (2017). Malvidin 3-Glucoside-Fatty Acid Conjugates: From Hydrophilic toward Novel Lipophilic Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(31), 6513–6518. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05461

Cui, Q., Peng, X., Yao, X. H., Wei, Z. F., Luo, M., Wang, W., Zhao, C. J., Fu, Y. J., & Zu, Y. G. (2015). Deep eutectic solvent-based microwave-assisted extraction of genistin, genistein and apigenin from pigeon pea roots. *Separation and Purification Technology*, *150*, 63–72. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.06.026

Cunha, S. C., & Fernandes, J. O. (2018). Extraction techniques with deep eutectic solvents. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *105*, 225–239. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.001

Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, *766*, 61–68. https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019

Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in carthamus tinctorius L. *Analytical Chemistry*, *85*(13), 6272–6278. https://doi.org/10.1021/ac400432p

Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2015). Tailoring properties of

natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chemistry*, *187*, 14–19. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.123

Dhumal, S. S., Karale, A. R., Jadhav, S. B., & Kad, V. P. (2014). Recent Advances and the Developments in the Pomegranate Processing and Utilization: A Review. *Journal of Agriculture and Crop Science*, *1*, 1–17.

DURAND, E. (2013). Solvants de type Eutectic Profonds : Nouveaux milieux reactionnels aux reactions de lipophilisation biocatalysees par les lipases? *Thèse de Doctorat En Biochimie - Chimie Des Aliments, Sous La Direction de Pierre Villeneuve, Université de Monpélier 2*, 25. https://doi.org/http://agritrop.cirad.fr/577603/

Durand, E., Lecomte, J., Baréa, B., Piombo, G., Dubreucq, E., & Villeneuve, P. (2012). Evaluation of deep eutectic solvents as new media for Candida antarctica B lipase catalyzed reactions. *Process Biochemistry*, *47*(12), 2081–2089. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.027

Durand, Erwann, Lecomte, J., Baréa, B., Dubreucq, E., Lortie, R., & Villeneuve, P. (2013). Evaluation of deep eutectic solvent-water binary mixtures for lipase-catalyzed lipophilization of phenolic acids. *Green Chemistry*, *15*(8), 2275–2282. https://doi.org/10.1039/c3gc40899j

El Achkar, T., Fourmentin, S., & Greige-Gerges, H. (2019). Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds. *Journal of Molecular Liquids*, *288*, 111028. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111028

Elfalleh, W. (2012). Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*(32), 4724–4730. https://doi.org/10.5897/jmpr11.995

Erwann, D., Jérôme, L., & Pierre, V. (2015). *12TH EURO FED LIPID CONGRESS : OILS , FATS AND LIPIDS : FROM LIPIDOMICS TO INDUSTRIAL INNOVATION A ccess D ossier Are emerging deep eutectic solvents (DES) relevant*. *22*(4), 1–14.

FAO. (2014). Food Wastage Footprint: Fool cost-accounting. In *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*.

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjYgbWn0pDKAhWHCI4KHUlyCEUQFggoMAE&url=http://www.fao.org/3/a-i3991e.pdf&usg=AFQjCNH7yX7VQI_OF8sfkIIR3yUbjJG06w&sig2=uKA9X-6f2YpJF4i-ZgmBcw&bvm=bv.110151844,d.c2E

Fawole, O. A., & Opara, U. L. (2013). Changes in physical properties, chemical and elemental composition and antioxidant capacity of pomegranate (cv. Ruby) fruit at five maturity stages. *Scientia Horticulturae*, *150*, 37–46. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.10.026

Foujdar, R., Bera, M. B., & Chopra, H. K. (2020). Optimization of process variables of probe ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from the peel of Punica granatum Var. Bhagwa and it's chemical and bioactivity characterization. *Journal of Food Processing and Preservation*, *44*(1), 1–16. https://doi.org/10.1111/jfpp.14317

Fu, N., Lv, R., Guo, Z., Guo, Y., You, X., Tang, B., Han, D., Yan, H., & Row, K. H. (2017). Environmentally friendly and non-polluting solvent pretreatment of palm samples for polyphenol analysis using choline chloride deep eutectic solvents. *Journal of Chromatography A*, *1492*, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.036

Ghisellini, P., Cialani, C., & Ulgiati, S. (2016). A review on circular economy: The expected transition to a balanced interplay of environmental and economic systems. *Journal of Cleaner Production*, *114*, 11–32. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.09.007

Gomez, F. J. V., Espino, M., Fernández, M. A., & Silva, M. F. (2018). A Greener Approach to Prepare Natural Deep Eutectic Solvents. *ChemistrySelect*, *3*(22), 6122–6125. https://doi.org/10.1002/slct.201800713

González Bacerio, J., Rodríguez Hernández, J., & Del Monte Martínez, A. (2010). Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial: [revisión]. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *12*(1), 113–140.

Gonzalez, C. G., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2019). Preanalytical treatments: Extraction with deep eutectic solvents. In *Liquid-Phase Extraction* (Issue II). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00019-0

Goula, A. M., & Lazarides, H. N. (2015). Integrated processes can turn industrial food waste into valuable food by-products and/or ingredients: The cases of olive mill and pomegranate wastes. *Journal of Food Engineering*, *167*, 45–50. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.01.003

Gözlekçi, Ş., Saraçoğlu, O., Onursal, E., & Özgen, M. (2011). Total phenolic distribution of juice, peel, and seed extracts of four pomegranate cultivars. *Pharmacognosy Magazine*, *7*(26), 161–164. https://doi.org/10.4103/0973-1296.80681

Grajeda-Iglesias, C., Salas, E., Barouh, N., Baréa, B., Panya, A., & Figueroa-Espinoza, M. C. (2016). Antioxidant activity of protocatechuates evaluated by DPPH, ORAC, and CAT methods. *Food Chemistry*, *194*, 749–757. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.119

Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *64*(6), 763–781. https://doi.org/10.1007/s00253-004-1568-8

Guyot, B., Bosquette, B., Pina, M., & Graille, J. (1997). Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from Candida antarctica in solvent-free medium. *Biotechnology Letters*, *19*(6), 529–532. https://doi.org/10.1023/A:1018381102466

Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V., & Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, *47*(10), 2023–2044. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x

Ivanović, M., Alañón, M. E., Arráez-Román, D., & Segura-Carretero, A. (2018). Enhanced and green extraction of bioactive compounds from Lippia citriodora by tailor-made natural deep eutectic solvents. *Food Research International*, *111*, 67–76. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.014

Kahveci, D., Laguerre, M., & Villeneuve, P. (2015). Phenolipids as New Antioxidants: Production, Activity, and Potential Applications. In *Polar Lipids: Biology, Chemistry, and Technology*. AOCS Press. https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-044-3.50011-X

Khandelwal, S., Tailor, Y. K., & Kumar, M. (2016). Deep eutectic solvents (DESs) as eco-friendly and sustainable solvent/catalyst systems in organic transformations. *Journal of Molecular Liquids*, *215*, 345–386. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.12.015

Kumar, K., Yadav, A. N., Kumar, V., Vyas, P., & Dhaliwal, H. S. (2017). Food waste: a potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. *Bioresources and Bioprocessing*, *4*(1). https://doi.org/10.1186/s40643-017-0148-6

Liu, P., Hao, J. W., Mo, L. P., & Zhang, Z. H. (2015). Recent advances in the application of deep eutectic solvents as sustainable media as well as catalysts in organic reactions. *RSC Advances*, *5*(60), 48675–48704. https://doi.org/10.1039/c5ra05746a

Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S. N., & Pauli, G. F. (2018). Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *Journal of Natural Products*, *81*(3), 679–690. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00945

Marquez-Rodriguez, A. S., Guimarães, M., Mateus, N., de Freitas, V., Ballinas-Casarrubias, M. L., Fuentes-Montero, M. E., Salas, E., & Cruz, L. (2021). Disaccharide anthocyanin delphinidin 3-O-sambubioside from Hibiscus sabdariffa L.: Candida antarctica lipase B-catalyzed fatty acid acylation and study of its color properties. *Food Chemistry*, *344*(October). https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128603

Mouratoglou, E., Malliou, V., & Makris, D. P. (2016). Novel Glycerol-Based Natural Eutectic Mixtures and Their Efficiency in the Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Polyphenols from Agri-Food Waste Biomass. *Waste and Biomass Valorization*, *7*(6), 1377–1387. https://doi.org/10.1007/s12649-016-9539-8

Mourtzinos, I., & Goula, A. (2019). Polyphenols in Agricultural Byproducts and Food Waste. In *Polyphenols in Plants* (2nd ed.). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813768-0.00002-5

Pandey, A., Rai, R., Pal, M., & Pandey, S. (2014). How polar are choline chloride-based deep eutectic solvents? *Physical Chemistry Chemical Physics*, *16*(4), 1559–1568. https://doi.org/10.1039/c3cp53456a

Panja, P. (2018). Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science*, *23*, 173–182. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.012

Pareek, S., Valero, D., & Serrano, M. (2015). Postharvest biology and technology of pomegranate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*(12), 2360–2379. https://doi.org/10.1002/jsfa.7069

Pätzold, M., Siebenhaller, S., Kara, S., Liese, A., Syldatk, C., & Holtmann, D. (2019). Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents in Biocatalysis. *Trends in Biotechnology*, *37*(9), 943–959. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.007

Qu, W., Breksa, A. P., Pan, Z., & Ma, H. (2012). Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. *Food Chemistry*, *132*(3), 1585–1591. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.106

Radošević, K., Ćurko, N., Gaurina Srček, V., Cvjetko Bubalo, M., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., & Radojčić Redovniković, I. (2016). Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT - Food Science and Technology*, *73*, 45–51. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.037

Rajha, H. N., Mhanna, T., El Kantar, S., El Khoury, A., Louka, N., & Maroun, R. G. (2019). Innovative process of polyphenol recovery from pomegranate peels by combining green deep eutectic solvents and a new infrared technology. *Lwt*, *111*(December 2018), 138–146. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.004

Rincón-Moreno, J., Franco-García, M.-L., Carpio-Aguilar, J. C., & Hernández-Sarabia, M. (2019). *Share, Optimise, Closed-Loop for Food Waste (SOL4FoodWaste): The Case of Walmart-Mexico*. 165–190. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92931-

6_9

Ruesgas-Ramón, M., Figueroa-Espinoza, M. C., & Durand, E. (2017). Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(18), 3591–3601. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01054

Sagar, N. A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E. M., & Lobo, M. G. (2018). Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*(3), 512–531. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12330

Saini, A., Panesar, P. S., & Bera, M. B. (2019). Valorization of fruits and vegetables waste through green extraction of bioactive compounds and their nanoemulsions-based delivery system. *Bioresources and Bioprocessing*, *6*(1). https://doi.org/10.1186/s40643-019-0261-9

Savi, L. K., Dias, M. C. G. C., Carpine, D., Waszczynskyj, N., Ribani, R. H., & Haminiuk, C. W. I. (2019). Natural deep eutectic solvents (NADES) based on citric acid and sucrose as a potential green technology: a comprehensive study of water inclusion and its effect on thermal, physical and rheological properties. *International Journal of Food Science and Technology*, *54*(3), 898–907. https://doi.org/10.1111/ijfs.14013

Seeram, N., Lee, R., Hardy, M., & Heber, D. (2005). Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and Purification Technology*, *41*(1), 49–55. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.04.003

Seeram, N. P., Schulman, R. N., & Heber, D. (2006). Pomegranates: Ancient roots to modern medicine. In *Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine*.

Shen, X., Shao, S., & Guo, M. (2017). Ultrasound-induced changes in physical and functional properties of whey proteins. *International Journal of Food Science and Technology*, *52*(2), 381–388. https://doi.org/10.1111/ijfs.13292

Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2018). Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (Punica granatum L.) peel: A review. *Food*

Chemistry, *261*(April), 75–86. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.039

Singh, R. P., Chidambara Murthy, K. N., & Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(1), 81–86. https://doi.org/10.1021/jf010865b

Smaoui, S., Hlima, H. Ben, Mtibaa, A. C., Fourati, M., Sellem, I., Elhadef, K., Ennouri, K., & Mellouli, L. (2019). Pomegranate peel as phenolic compounds source: Advanced analytical strategies and practical use in meat products. *Meat Science*, *158*(July), 107914. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107914

Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *71*, 100–109. https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013

Vilariño, M. V., Franco, C., & Quarrington, C. (2017). Food loss and waste reduction as an integral part of a circular economy. *Frontiers in Environmental Science*, *5*(MAY), 5. https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00021

Vilková, M., Płotka-Wasylka, J., & Andruch, V. (2020). The role of water in deep eutectic solvent-base extraction. *Journal of Molecular Liquids*, *304*. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112747

Villeneuve, P. (2007). Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnology Advances*, *25*(6), 515–536. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.06.001

Viuda-Martos, M., Fernández-Lóaez, J., & Pérez-álvarez, J. A. (2010). Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*(6), 635–654. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00131.x

Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, *17*(6), 300–312. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004

Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., Ma, H., & Luo, X. (2018). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *48*, 538–549.

https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018

Zhang, H., Tang, B., & Row, K. (2014). Extraction of catechin compounds from green tea with a new green solvent. *Chemical Research in Chinese Universities*, *30*(1), 37–41. https://doi.org/10.1007/s40242-014-3339-0

Zhao, X., Yuan, Z., Fang, Y., Yin, Y., & Feng, L. (2014). Flavonols and flavones changes in pomegranate (Punica granatum L.) fruit peel during fruit development. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *16*, 1649–1659.

XVII. ANEXO I

17.1 Solventes eutécticos profundos preparados

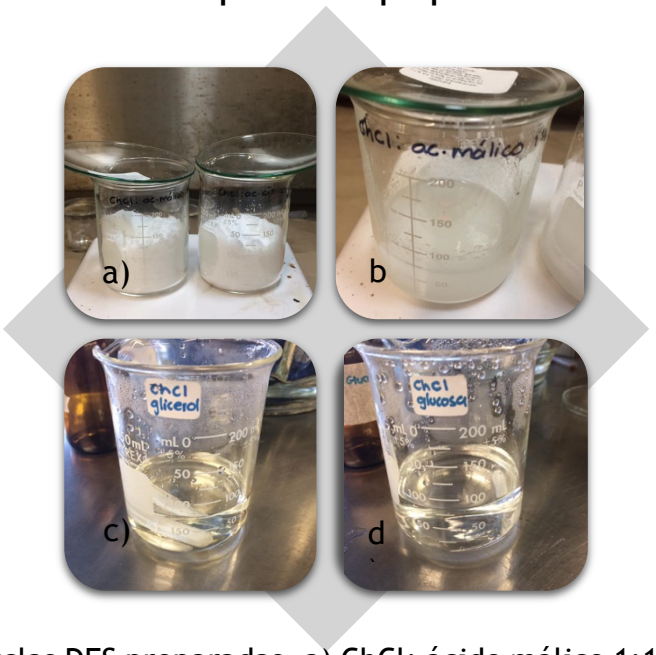

Figura 16. Mezclas DES preparadas. a) ChCl: ácido málico 1:1, ChCl: ácido cítrico 1:1, b) ChCl: ácido málico mezcla pastosa, c) y d) ChCl: glicerol 1:2 y ChCl: glucosa 1:1 mezclas líquidas con agua.

17.2 Curva estándar de ácido elágico

Se obtuvo una curva de calibración con estándar de ácido elágico a concentraciones de 20, 40, 60,80 y 100 ppm, a una absorbancia de 378 nm. La curva y la ecuación de la misma, se muestran en la figura 8.

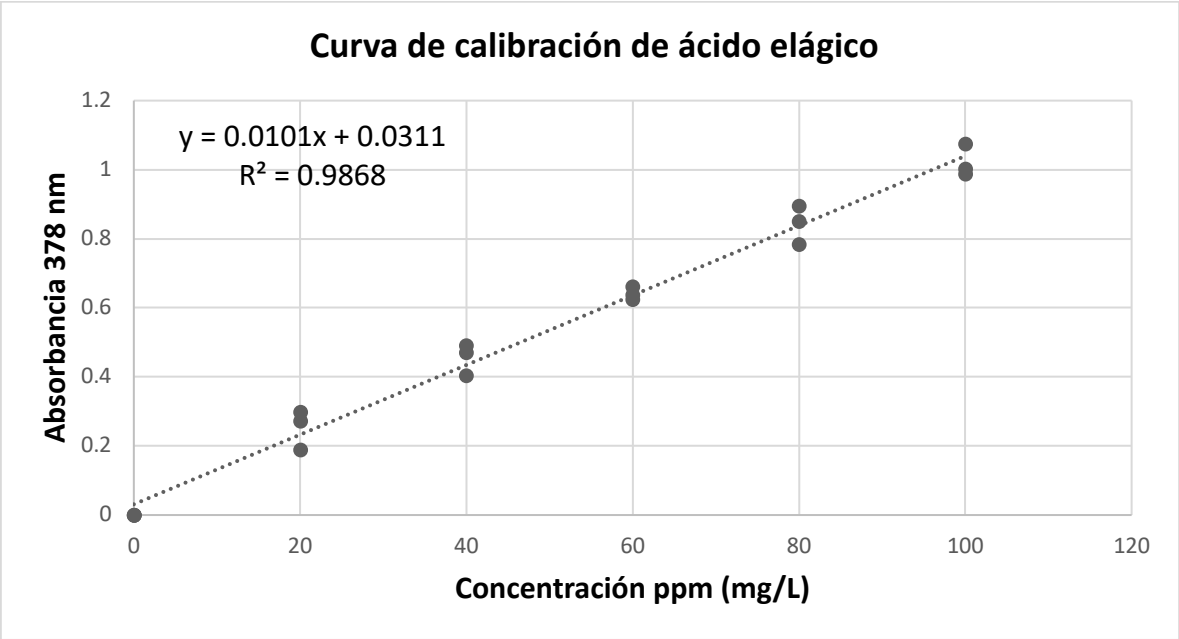

Figura 17. Curva de calibración de ácido elágico

La curva de calibración se determinó y en base a ella se calcularon las concentraciones para experimentos de extracción para cada DES usando la ecuación de la recta para determinar concentraciones. El R^2 (Coeficiente de correlación) se puede observar se ajusta al modelo obtenido a la variable que se pretende explicar que es la concentración en ppm(mg/L); dando un valor de 98%.

17.3 Cromatografía de capa fina

1. Cortar las placas cromatográficas con mucho cuidado de una medida aproximada de 10 cm de largo por 6 cm de ancho.
2. Tomar con un capilar un poco de la muestra de reacción y depositar la muestra en la placa cromatográfica cuidando dejar espacio entre muestras.
3. Una vez depositada la muestra, se pone la placa cromatográfica en el vaso de precipitado que contiene el solvente de nuestra elección cuidando que el solvente quede por debajo de donde depositamos la muestra.
4. Dejamos la placa de forma vertical y tapamos el vaso de precipitado con un vidrio de reloj para evitar la evaporación del solvente.
5. Después de unos minutos sacamos la placa y la dejamos secar.
6. Revelar la placa poniendo cristales de yodo en un vaso de precipitado y taparlo para que se llene de vapores el vaso y colocar la placa dentro del vaso.
7. Calcular los frentes de referencia de los compuestos que se tiñeron.

$$Fr = \frac{Distancia\ que\ recorre\ la\ muestra}{Distancia\ que\ recorre\ el\ disolvente}$$