

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CENTRO DEL PERÚ

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS**



**EXTRACCIÓN POR DICLOROMETANO Y CO₂ SUPERCRÍTICO DE
ISOTIOCIANATO DE BENCILO A PARTIR DE HOJAS DE
MASTUERZO (*Tropaeolum majus L.*)**

TESIS

PRESENTADO POR LAS BACHILLERES:

GAMARRA QUEZADA FLOR DE MARIA NELLY

RAMOS FILIO MARIANELA VILMA

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA EN INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS**

HUANCAYO - PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CENTRO DEL PERÚ
FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

JURADO EXAMINADOR

M.Sc. EDUARDO S. BALVIN CALDERON

PRESIDENTE

Dra. CLARA R. ESPINOZA SILVA

JURADO

M.Sc. NORMA N. GAMARRA MENDOZA

JURADO

M.Sc. VILMA REYES DE LA CRUZ

JURADO

Ing. LILIAN BAÑOS MEDINA

SECRETARIA

ASESORA:

Dra. Clara Raquel Espinoza Silva

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) de acuerdo al contrato 323-PNICP-PIAP-2015, por el financiamiento de este trabajo de investigación.

A la Dra. Clara Espinoza Silva por su asesoramiento, comprensión, confianza y apoyo incondicional, durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Dr. Miguel Quispe Solano por el co-asesoramiento durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la UNCP, por la formación que nos brindó.

Al QF. Miguel Valverde, por su considerable e importante apoyo en la finalización del trabajo de investigación.

Y a todas aquellas personas que nos brindaron su ayuda con algunas dificultades que se nos presentó durante el desarrollo de la investigación.

DEDICATORIA

Dedicado a Dios, a mis padres Arturo y Cristina, y hermanos, quienes me apoyaron incondicionalmente y me dieron la fortaleza de seguir adelante haciendo posible la realización de este trabajo.

Flor de María N, Gamarra Quezada

Dedicado a mi madre Sra. Vilma Filio Andrade y hermanos Raúl, Mariela, Mónica, Tania por impulsarme a seguir adelante y ser perseverante para cumplir mis metas.

Marianela V, Ramos Filio

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	12
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. EL MASTUERZO	14
2.1.1. Origen	14
2.1.2. Morfología	14
2.1.3. Clasificación taxonómica	17
2.1.4. Producción nacional	18
2.1.5. Estados de madurez y fisiología	18
2.1.6. Usos del mastuerzo.....	19
2.1.7. Composición fisicoquímica	21
2.2. GLUCOSINOLATOS	21
2.2.1. Glucosinolato del mastuerzo	22
2.2.2. Hidrólisis del glucosionolato	23
2.2.3. Antecedentes de la extracción de bencil glucosinolato del <i>mastuerzo</i>	24
2.2.4. Bencil isotiocianato.....	26
2.3. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	30
2.3.1. Técnicas de extracción.....	31
2.4. EXTRACCIÓN POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.....	33
2.4.1. Fluidos supercríticos	33
2.4.2. Diagrama de fases general para una sustancia pura.....	34
2.4.3. Propiedades de los fluidos supercríticos.....	35
2.4.4. Dióxido de carbono supercrítico	36
2.4.5. Solubilidad de los fluidos supercríticos	37
2.4.6. Factores que afectan el rendimiento de extracción por CO ₂ supercrítico	38
2.5. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	41
2.5.1. Determinación del factor R _f	42

2.5.2. Elección del eluyente para determinar el bencil isotiocianato	43
2.5.3. Visualización del cromatograma.....	44
2.6. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)	44
2.6.1. Cuantificación por HPLC del isotiocianato de bencilo	45
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.....	47
3.2. MATERIALES.....	47
3.2.1. Materia prima.....	47
3.2.2. Equipos e instrumentos para análisis	47
3.2.3. Materiales.....	47
3.2.4. Reactivos.....	48
3.3. MÉTODOS	48
3.3.1. Acondicionamiento de la materia prima:	48
3.3.2. Extracción de bencil isotiocianato por diclorometano.....	50
3.3.3. Extracción por dióxido de carbono supercríticos de bencil isotiocianato de hojas de mastuerzo	50
3.3.4. Identificación del bencil isotiocianato por cromatografía de capa fina	51
3.3.5. Cuantificación del bencil isotiocianato	51
3.3.6. Diseño experimental estadístico	55
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	57
4.1. Características de las hojas de <i>Tropaeolum majus L.</i> acondicionadas para la extracción de bencil isotiocianato.....	57
4.2. Rendimiento de oleorresina obtenida en la extracción por CO ₂ supercrítico.....	58
4.3. Identificación por cromatografía de capa fina del bencil isotiocianato obtenido a partir de hojas de <i>Tropaeolum majus L.</i>	59
4.4. Identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) del bencil isotiocianato obtenido a partir de hojas de <i>Tropaeolum majus L.</i> por CO ₂ supercrítico y diclorometano.....	62
V. CONCLUSIONES	72

VI.	RECOMENDACIONES	73
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
	ANEXOS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mastuerzo (<i>Tropaeolum majus</i> L.)	14
Figura 2. Morfología del <i>Tropaeolum majus</i> L.	15
Figura 3. Clasificación de las etapas de desarrollo de maduración de flores, frutos y hojas de <i>Tropaeolum majus</i> L.	19
Figura 4. Estructura química de la glucotropaeolina	22
Figura 5. Degradación del glucosinolato por la enzima mirosinasa que caracteriza la formación de la aglicona	24
Figura 6. Desarrollo del bencilglucosinolato en el mastuerzo	25
Figura 7. Contenido de bencilglucosinolato de la flor en desarrollo y semilla	26
Figura 8. Proceso del bencil isotiocianato mediante la acción de la enzima mirosinasa	27
Figura 9. Características genéricas de los fluidos supercríticos	34
Figura 10. Diagrama de fases de una sustancia pura	35
Figura 11. Determinación del valor R_f en cromatografía de capa fina	43
Figura 12. Espectrograma del bencil isotiocianato	46
Figura 13. Diagrama de flujo del acondicionamiento de la materia prima para la extracción de bencil isotiocianato por diclorometano y dióxido de carbono supercrítico	49
Figura 14. Diagrama de flujo para la extracción, identificación y cuantificación del bencil isotiocianato extraído a partir de hojas de mastuerzo por diclorometano.	54
Figura 15. Diagrama de flujo para la extracción, identificación y cuantificación del bencil isotiocianato extraído a partir de hojas de mastuerzo por CO ₂ supercrítico	55
Figura 16. Cromatograma del estándar de bencil isotiocianato	62
Figura 17. Cromatogramas de los tratamientos T1 (P = 300 bar ^ T = 50°C), T2 (P = 300 bar ^ T = 60 °C) y T3 (P = 300 bar ^ T = 70 °C)	63
Figura 18. Cromatogramas de los tratamientos T4 (P = 200 bar ^ T=50 °C), T5 (P = 200 bar ^ T = 60 °C) y T6 (P = 200 bar ^ T = 70°C)	64
Figura 19. Cromatograma de la extracción de bencil isotiocianato por diclorometano	65
Figura 20. Prueba de comparación de medias por TUKEY	68

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica del mastuerzo (<i>Tropaeolum majus</i> L.).	17
Tabla 2. Usos del mastuerzo	20
Tabla 3. Composición fisicoquímica en 100 g de hojas de mastuerzo	21
Tabla 4. Comparación de los métodos de extracción tradicional y extracción no convencional.	33
Tabla 5. Propiedades críticas de los fluidos supercríticos	36
Tabla 6. Efecto beneficioso y adverso sobre la solubilidad del CO ₂ supercrítico respecto a los grupos funcionales de los solutos:	38
Tabla 7. Áreas de la solución estándar de seis inyecciones repetidas para determinar el %RSD.	53
Tabla 8. Características de las hojas de mastuerzo	57
Tabla 9. Rendimiento de oleoresina obtenida de la extracción de bencil isotiocianato por CO ₂ supercrítico	58
Tabla 10. Cromatografía de capa fina del bencil isotiocianato obtenido a partir de hojas de mastuerzo por diclorometano y CO ₂ supercrítico	60
Tabla 11. Cantidad de bencil isotiocianato extraído con CO ₂ supercrítico a partir de hojas de mastuerzo	66
Tabla 12. Análisis de varianza ANOVA de la cantidad de bencil isotiocianato obtenido en los seis tratamientos realizados con CO ₂ supercrítico en hojas de mastuerzo	67
Tabla 13. Cantidad de bencil isotiocianato obtenidas por extracción con diclorometano y con CO ₂ supercrítico	69

RESUMEN

Los compuestos bioactivos presentes en plantas ornamentales va creciendo con el fin de combatir y prevenir distintas enfermedades, tanto en alimentos como en personas, por ello en esta investigación se realizó la extracción de bencil isotiocianato a partir de hojas de mastuerzo por diclorometano y CO₂ supercrítico. Para ambas metodologías se usaron hojas liofilizadas a una humedad de 6% con módulo de finura 4,8. Para la extracción por diclorometano se usó hojas desengrasadas, se utilizó buffer fosfato de potasio pH 7 para acondicionar la hidrólisis y se purificó con columnas Resprep C18. Para la extracción con CO₂ supercrítico, se trabajó a dos presiones (200 y 300 bar) y tres temperaturas (50, 60 y 70 °C).

Se utilizó el patrón de bencil isotiocianato al 98% para la identificación y cuantificación del compuesto, que se realizó por cromatografía de capa fina y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) respectivamente. El mejor rendimiento de oleorresina de la extracción por CO₂ supercrítico se obtuvo a 300 bar y 60°C, con un 35%; y la mayor cantidad de bencil isotiocianato se obtuvo a 200 bar y 70°C siendo $113,615 \pm 0,03$ mg de BIT/100 gms; y el contenido de bencil isotiocianato en la extracción por diclorometano se obtuvo $252,53 \pm 0,11$ mg de BIT/100 gms.

Llegando a la conclusión que las mejores condiciones de extracción para obtener un compuesto libre de impurezas es mediante CO₂ supercrítico pese a que el rendimiento es menor a comparación de la extracción por diclorometano.

I. INTRODUCCIÓN

El *Tropaeolum majus* L. tiene origen en América del Sur, es una especie versátil, ya que además de ser utilizado en los alimentos se puede utilizar en algunas recetas y practicas medicinales, como formas alternativas de la medicación con menor costo y una mayor accesibilidad (Demetti, 1999) citado en (Souto *et al.*, 2012), además es fuente de vitaminas A y C, hierro y antioxidantes (Ugas, 2014); presenta distintas propiedades así lo mencionan Garzón (2008) y Nanzi (1999) ya que esta planta contiene un glucósido sulfurano llamado glucotropaeolina, el cual es un potente antibiótico para combatir infecciones, impide la proliferación de las bacterias por la presencia del isotiocianato de bencilo producto de la hidrólisis de la glucotropaeolina por acción de la enzima mirosinasa que es activada al sufrir un daño físico.

El bencil isotiocianato está siendo investigado con el fin de combatir y prevenir distintas enfermedades, tanto en alimentos como en personas, la investigación realizada por Troncoso (2005) demuestra que la aplicación del bencil isotiocianato tiene un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de la infección de tomate por *Alternaria alternata* (hongo patógeno), además evaluó diariamente el efecto del bencil isotiocianato sobre la fisiología poscosecha y la calidad del tomate durante el almacenamiento. El bencil isotiocianato también es el principal componente bioactivo para contrarrestar el cáncer, así lo menciona Colbert (2010) cuando afirma que este compuesto fomenta la apoptosis o muerte celular programada en células cancerosas de la mama y ovarios, sin afectar a las células sanas algo que la quimioterapia no puede garantizar

Esta investigación realizada tiene como título “Extracción por diclorometano y CO₂ supercrítico de isotiocianato de bencilo a partir de hojas de mastuerzo (*Tropaeolum majus* L.)” y tiene por finalidad hacer una comparación de los dos tipos de extracción. Se realizó la extracción de bencil isotiocianato de forma convencional usando como solvente orgánico el diclorometano, este tipo de extracción presenta una desventaja frente a la extracción por CO₂ supercrítico debido a que se obtiene compuestos que son difíciles de purificar y con restos de productos tóxicos, por el contrario la extracción con CO₂ supercrítico es ideal para la extracción de un compuesto mucho más puro y sin residuos gracias a una buena interacción entre la presión y temperatura de trabajo.

El dióxido de carbono presenta características que lo hace un método de extracción favorable como son la compresibilidad, baja viscosidad, tensión superficial muy baja lo que aumenta la operación de extracción dada a la rápida penetración de este por los poros de la matriz, la alta difusividad es una de las variables más importantes debido a

que al aumentar la presión del fluido supercrítico la difusividad disminuye y aumenta con el incremento de la temperatura.

Se tomó como referencia la investigación realizada el 2011 por Rodríguez quien realizó la extracción de bencil isotiocianato a partir semillas de Papaya de Monte (*Carica pubescens*), del cual se tomó como referencia parte de su metodología con algunas modificaciones para la extracción por diclorometano, la identificación del bencil isotiocianato se realizó por cromatografía de capa fina y la cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Así mismo se tomó como antecedente al trabajo realizado por Barroso *et al.* (2016) quien realizó la extracción de aceite de las semillas de *Carica papaya L.* con CO₂ supercrítico, a tres temperaturas (40, 60 y 80 °C) y tres presiones (100,150 y 200 bar), una rama de la industria alimentaria se ocupa de la tecnología de extracción y purificación de compuestos biológicamente activos, es por ello que para nuestra investigación estas metodologías fueron el punto de partida para sustentar la hipótesis que nos planteamos, de que se logrará obtener mayor cantidad de bencil isotiocianato durante la extracción por CO₂ supercrítico en comparación con la extracción por diclorometano, debido a una adecuada interacción de presión y temperatura durante la extracción. Los objetivos planteados para esta investigación son:

a. Objetivo general

- Evaluar el proceso de extracción del bencil isotiocianato por diclorometano respecto a la extracción con CO₂ supercríticos de hojas de mastuerzo (*Tropaeolum majus L.*).

b. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la presión y temperatura de extracción por CO₂ supercrítico en el rendimiento de oleorresina de hojas de mastuerzo (*Tropaeolum majus L.*).
- Determinar el efecto de la presión y temperatura de extracción por CO₂ supercrítico en el rendimiento de bencil isotiocianato de hojas de mastuerzo (*Tropaeolum majus L.*).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. EL MASTUERZO

2.1.1. Origen

Bazylko y Granica (2003) mencionan que el mastuerzo es proveniente de América del Sur y América Central específicamente de las zonas montañosas el cual ha sido cultivado en Europa desde el siglo XVII debido a sus usos en la medicina herbaria y como planta ornamental, es nativo de Perú y Bolivia.

Es conocida también popularmente como: Capuchina, nastúrcio, chaguinha, chagas, mastuerzo del Perú, flor de sangre, flor de amor, espuela de galán, cachaco de muladar, jacinto, marañuelas, pelón, pensamiento, taco de reina, mastuerzo de indias, cappuccina (Italiano), capucine (Francés), large indian cress (Inglés), kapuzinerkresse (Alemán), mastru, papagaios (Portugués), berro de México. Pertenece a la familia tropaeolaceae que incluye solo dos géneros que son únicos en América del Sur, como centros de atención de diversidad primaria a Colombia, Brasil y Perú (Souto, Alves y Cavalcante, 2012; Nanzi, 1999). En la figura 1 se muestra la imagen del mastuerzo.



Figura 1. Mastuerzo (*Tropaeolum majus* L.) [Nanzi,1999].

2.1.2. Morfología

Garzón (2008) menciona que la Capuchina (*Tropaeolum majus* L.) es una planta nativa que crece durante todo el año y es muy conocida por sus propiedades ornamentales, también porque sus hojas y flores son comestibles, en los que imparten un sabor picante debido a la presencia de glucosinolatos.

Nanzi (1999) menciona que cada parte de la planta contiene un glucósido sulfurado, que es la glucotropaeolina, y que por la acción de la enzima mirosinasa presente en la misma planta que es activada al sufrir daño mecánico produce entre otras sustancias un aceite esencial azufrado de potente acción antibiótica, impidiendo el crecimiento y multiplicación bacteriana. Al respecto Guillot (2009) menciona que el mastuerzo es una planta anual herbácea, a menudo robusta, trepadora que contiene un glucosinolato.




MORFOLOGÍA DEL <i>Tropaeolum majus</i> L.		
FLORES	HOJAS	SEMILLAS
		

Figura 2. Morfología del *Tropaeolum majus* L.

a) Raíz

La raíz del mastuerzo es de tipo fibrosa, también llamada difusa y presenta una estructura radicular que se caracteriza por tener numerosas raíces de igual tamaño, llegando a medir en promedio unos 40 cm (Castellani, 1997). En el desarrollo de la planta pueden crecer raíces a partir de los nudos del tallo siendo estas más frágiles (Colonio, 2015) citado en (Espinoza, Quispe & Cairampoma, 2016).

b) Tallo

El tallo del mastuerzo es carnoso y flexible, tienen una forma transversal redondeada alcanzando 1 cm de diámetro en la parte baja de la planta; se desarrollan formando ángulos de 120 – 135° y llega a 5 m en promedio de longitud, son de color verde brillante presentando un moteado color rojo salmón particularmente en la parte central (Espinoza *et al.*, 2016).

c) *Hojas*

En el 2009, Guillot sostuvo que las características de la hojas del mastuerzo son hojas peltadas con estipulas pequeñas caducas, de 20 cm de longitud, láminas de 10 x 10 o en ocasiones suborbicular, con nervios principales no ramificado, margen entero u ondulado, ápice no mucronado en las hojas adultas. Al respecto Loja (2002) menciona que las hojas son peltadas y que presentan un peciolo verdoso rojizo de 12 – 40 cm de largo, un limbo orbicular 7 – 12 cm de diámetro peltinervado, margen lobulado y ligeramente crenado, tal como se observa en la figura 2.

d) *Flores*

Espinoza *et al.* (2016) sostienen que las flores de mastuerzo son hermafroditas, solitarias y que se desarrollan a partir de las yemas axilares, presentan una forma irregular, asimétrica vertical y zogomorfa. En el 2009, Garzón mencionó que las flores de mastuerzo son comúnmente de color amarillo, rojo o naranja, siendo el de color naranja el más común (figura 2). Al respecto Loja (2002) sostiene también que las flores de mastuerzo son hermafroditas, hipógina con el receptáculo alargado por detrás y formando con la base de los tres sépalos posteriores un espolón más o menos largo; cáliz con cinco sépalos tres posteriores unidos formando el espolón, dos anteriores libres, corola amarilla, rojiza, roja anaranjada, cinco pétalos unguiculados 23 – 38 x 24 – 35 mm, tres anteriores laciniados libres, dos posteriores unidos al espolón sin lacinias; androceo, ocho estambres de diferente tamaño, en dos ciclos de cuatro estambres; gineceo sincárpico, ovario supero, tricarpelar, trilocular, en cada lóculo hay un ovulo péndulo de placentación axial, estilo cilíndrico, estigma trífido, ramas filiformes.

e) *Frutos*

El fruto del mastuerzo es un esquizocarpo con 3 mericarpios acostillados y monospermos. Se propaga mediante semillas y también de forma vegetativa a través de los brotes de sus raíces tuberosas (Gonzales, 2007). Estos frutos en la madurez son de aspecto arrugado y presentan manchas de color rojizo. Los frutos están conectadas al tallo por un pedúnculo fino y largo; y conforme se va desarrollando el fruto este pedúnculo se va alargando más, llegando a medir

hasta 27 cm de longitud (Zanetti, 2004 y Colonio, 2015) mencionado en (Espinoza *et al.*, 2016).

f) *Semillas*

Colonio (2015) sostuvo que las semillas del mastuerzo son de forma ovoideas y ligeramente aplanadas de 1 – 1,8 x 1 – 1,5 mm, de color marrón claro y con la testa muy rugosa (figura 2). Cada semilla tiene un embrión grande y recto, presenta dos cotiledones gruesos y el endospermo bien constituido, mencionado en (Espinoza *et al.*, 2016).

2.1.3. Clasificación taxonómica

La tabla 1 muestra la clasificación taxonómica del mastuerzo.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del mastuerzo

Nombre científico	<i>Tropaeolum majus L.</i>
Reino	Plantae.
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares).
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas).
División	Magnoliophyta (planta con flor).
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae.
Orden	Geraniales.
Familia	Tropaeolaceae.
Género	Tropaeolum.
Epíteto específico	majus.
Epíteto específico	L.

Nota: Tomado de: [Espinoza, C., Quispe, M., & Cairampoma, J. (2016).]

2.1.4. Producción nacional

En algunos huertos frutales el mastuerzo se usa como planta trampa porque los pulgones lo prefieren, y mientras lo atacan, sirven de alimento a algunos insectos, de esta manera se reduce el ataque de pulgones al frutal (Ugas, 2014). El mastuerzo o Capuchina es una planta fácil de cultivar debido a su rusticidad, ya que se reproduce por medio de semillas, aunque también puede hacerlo en menor medida vegetativamente, rebrotando cada año de las raíces tuberosas. Su polinización es entomófila, es decir, por medio de mariposas, y su diseminación, barócora (Taboada, 2013) citado en (Cabezas, 2014).

2.1.5. Estados de madurez y fisiología

En el 2006, Taiz y Zeiger definen al crecimiento de la planta como un aumento irreversible en el tamaño o volumen de la célula acompañado por la biosíntesis de los nuevos componentes del protoplasma. Por lo que el más grande componente del crecimiento de las plantas es la expansión celular, que está regulada por la presión de turgencia.

En el 2005, Souza y Lorenzi realizaron una clasificación de los estados de madurez de las hojas, flores y frutos del *Tropaeolum majus L.* donde observaron que las hojas presentan un máximo de desarrollo entre las etapas XVII y XIX teniendo como diámetro longitudinal de 10,6 a 15,7 mm, diámetro transversal de 12,1 a 16,6 mm; para las flores el máximo de su desarrollo se dio entre las etapas XIII y XVI teniendo como diámetro longitudinal de 14,46 a 53,58 mm, diámetro transversal de 12,56 a 50,4 mm, longitud lateral de 48,5 a 71,2 cm, longitud del péndulo de 34,11 a 48,62 mm y para los frutos alcanzan su máximo desarrollo entre las etapas XIX y XXI teniendo como diámetro basal de 13,14 a 16,98 mm, diámetro medio de 15,8 a 20,1 mm y diámetro apical de 13,92 a 17,48 mm.

Mientras que Souto *et al.* (2012) señalan que durante las etapas de desarrollo las flores que pueden ser consumidas en fresco y son las más atractivas, están entre los estados de maduración de X y XII, este mismo paso se obtuvo en las hojas entre las etapas de maduración XIII y XV, donde las hojas estaban buscando buen tamaño y el peso fresco manteniendo todos sus componentes con mayor potencial, mientras que en los frutos, se observó esta maduración entre las etapas X y XIII

La figura 3 muestra la clasificación de las etapas de desarrollo de las flores, hojas y semillas de mastuerzo.

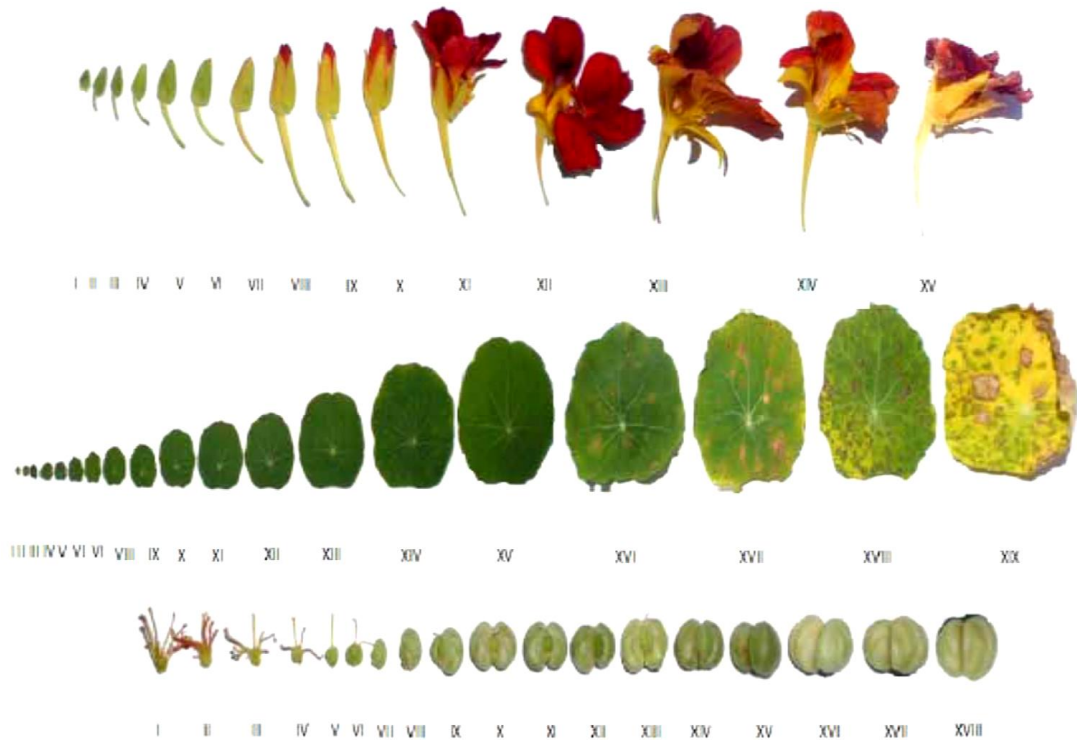


Figura 3. Clasificación de las etapas de desarrollo de maduración de flores, frutos y hojas de *Tropaeolum majus* L. [Souto *et al.* (2012)].

2.1.6. Usos del mastuerzo

El *Tropaeolum majus* L. es una especie versátil, ya que además de ser utilizado en los alimentos, se puede utilizar en algunas recetas y prácticas medicinales, como formas alternativas de la medicación, con menos costo y una mayor accesibilidad. También es ampliamente utilizado en el cultivo intercalado como una planta de compañía, vegetales ornamentales o simplemente como una trampa para atraer a las plagas (Dematti, 1999) citado en (Souto *et al.*, 2012). La tabla 2 muestra los usos que presenta el mastuerzo (Ugas, 2014).

Tabla 2. Usos del mastuerzo

Valor Nutricional	<ul style="list-style-type: none"> • Fuente de vitaminas A y C • Fuente de hierro y antioxidantes
Medicina	<ul style="list-style-type: none"> • Las hojas machacadas o en emplasto se usan para aliviar hematomas o para manchas causadas por hongos en la piel. • Tiene propiedades antibióticas y antisépticas. • Para tratar infecciones respiratorias y del tracto urinario
Alimentación	<ul style="list-style-type: none"> • Las hojas tiernas en ensaladas agregan un sabor fresco parecido al del rabanito o la mostaza; también se usan en sopas o picantes. • Las flores son consumidas en ensaladas. • Los frutos verdes se encurten y se comen como las alcaparras.

Jiang *et al.*, 2010; Kamii y Isshiki, 2009, mencionan que una de las principales actividades del mastuerzo es su actividad antimicrobiana, por la presencia del compuesto isotiocianato de bencilo (un producto de degradación de glucotropaeolina). Así mismo Virtanen (1969) sustenta que la actividad antimicrobial del isotiocianato de bencilo ha sido ampliamente estudiada, mencionada en (Bazylko *et al*, 2013). Los estudios fitoquímicos de *tropaeolum majus L.* han informado sobre la aparición de compuestos de azufre (glucotropaeolin), flavonoides (quercetina y kaempferol glicósidos), antocianinas (delphinidin, cianidina y derivados de pelargonidina), carotenoides (luteína, zeaxantina, beta - caroteno), ácido clorogénico, cucurbitacinas y vitamina C (Bazylko *et al*, 2013).

2.1.7. Composición fisicoquímica

La tabla 3 muestra la composición fisicoquímica en 100 g de hojas de mastuerzo según la tabla peruana de composición de alimentos.

Tabla 3. Composición fisicoquímica en 100 g de hojas de mastuerzo

Composición	Cantidad
Fisicoquímica	
Energía (kcal)	48
Humedad (g)	86,3
Proteínas (g)	1,8
Grasa total(g)	1,3
Carbohidratos totales(g)	9,3
Fibra(g)	0,5
Cenizas (g)	1,4

Nota: Tomado de: “Tabla Peruana de Composición de los Alimentos. Instituto Nacional de Salud (2009)”

2.2. GLUCOSINOLATOS

Palencia (1999) nos menciona que los glucosinolatos son sustancias liposolubles, que son absorbidos en el intestino delgado y son eliminados por las vías urinarias y respiratorias sin alterar al organismo. Este es el motivo por el que los aceites aromáticos de las raíces y hojas picantes de las plantas son efectivos en las inflamaciones de la vejiga urinaria y contra la tos.

Acosta (2006) menciona que los glucosinolatos volátiles han mostrado un amplio rango de efectos antibacteriales y antifúngicos. Estos están presentes en varias especies de la familia de las cruciferae, como la coliflor, brócoli, rábano entre otros; también se conoce su presencia en algunas variedades de la familia de las Capparaceae y de las Tropaeolaceae, dentro de esta última es donde se encuentra el mastuerzo o capuchina.

2.2.1. Glucosinolato del mastuerzo

Wallsgrave (1995) menciona que el *Tropaeolum majus L.* contiene un solo glucosinolato, que es la glucotropaeolina, que se deriva del aminoácido fenilalanina aromático. Fahey *et al.*, (2001) menciona que existe más de 120 estructuras de glucosinolatos, distribuidos en dieciséis familias, dentro de la cual en la familia Tropaeolaceae se pueden encontrar ocho glucosinolatos del tipo B,C,E y G, de lo cual el glucosinolato del mastuerzo que es la glucotropaeolina pertenece al tipo G.

a. *Glucotropaeolina*

Las células cultivadas de *Tropaeolum majus L.* producen cantidades significativas de glucosinolato de bencilo (Spiridon, kintzios y Barberaki. 2003). Se ha demostrado que la glucotropaeolina o bien conocida como bencil glucosinolato se acumula en plantas maduras de *Tropaeolum majus L.* La capacidad biosintética para la síntesis de bencil glucosinolato y el contenido total de bencil glucosinolato ha sido Investigado durante el desarrollo de la planta y en diferentes tejidos (Lykkesfeldt y Lindberg, 1993).

Font (1985) sostuvo que el principio activo tóxico principal del *Tropaeolum majus L.* es un aceite esencial glucósido llamado glucotropaeolina que ingerido en dosis terapéuticas se le atribuyen propiedades bacteriostáticas y antimicóticos. Mencionado en (Benedi y Simon, 2013). La figura 4 muestra la estructura química de la glucotropaelina.

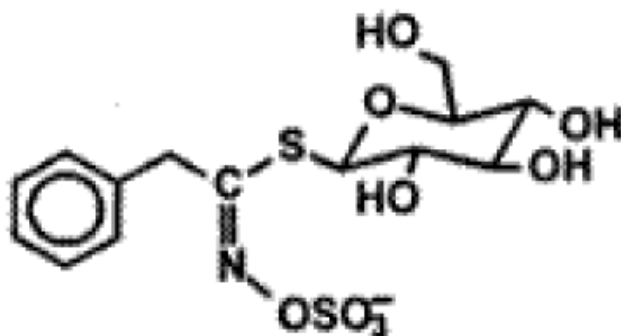


Figura 4. Estructura química de la glucotropaelina

[Fahey *et al.*, 2001].

2.2.2. Hidrólisis del glucosionolato

La hidrólisis en los glucosinolatos se lleva a cabo cuando el tejido del vegetal se rompe como consecuencia de un daño mecánico o físico, es entonces cuando la enzima mirosinasa entra en contacto con el sustrato y libera moléculas de glucosa, de bisulfato y de la correspondiente aglucona; posteriormente, esta última experimenta un acomodamiento (Olga *et al.*, 2009) mencionado en (Rincón, 2014).

Los glucosinolatos son compuestos estables, localizados en las vacuolas y están separados físicamente de la enzima mirosinasa en plantas intactas, sin embargo, los glucosinolatos se hidrolizan rápidamente cuando se mezcla con mirosinasa, que elimina el azúcar de los glucosinolatos, dando como resultado isotiocianatos, nitrilos, cianuros orgánicos y tiocianato iónico (Fahey *et al.*, 2001). Al respecto Rosa *et al.* (1997) sostiene que después de la cosecha ocurre una ruptura física de las plantas cuando los productos son sometidos a picado, mezclado, prensado, cocción, congelación, descongelación y alta temperatura esto conduce a una pérdida de la estructura celular y la posterior mezcla de los glucosinolatos y la mirosinasa para formar isotiocianatos, mencionado en (Rincón, 2014).

Los glucosinolatos al hidrolizarse producen una amplia gama de productos de degradación, estos incluyen una glucosa y una aglicona inestable, que posteriormente se reordena para formar diferentes productos, dependiendo de la estructura de aglicona, pH, concentración de iones ferrosos y proteínas epitiospecíficas, la reorganización de la aglicona dará lugar a la formación de un isotiocianato a pH neutro (Rincón, 2014). La figura 5 muestra la degradación del glucosinolato por la enzima mirosinasa que caracteriza la formación de aglicona

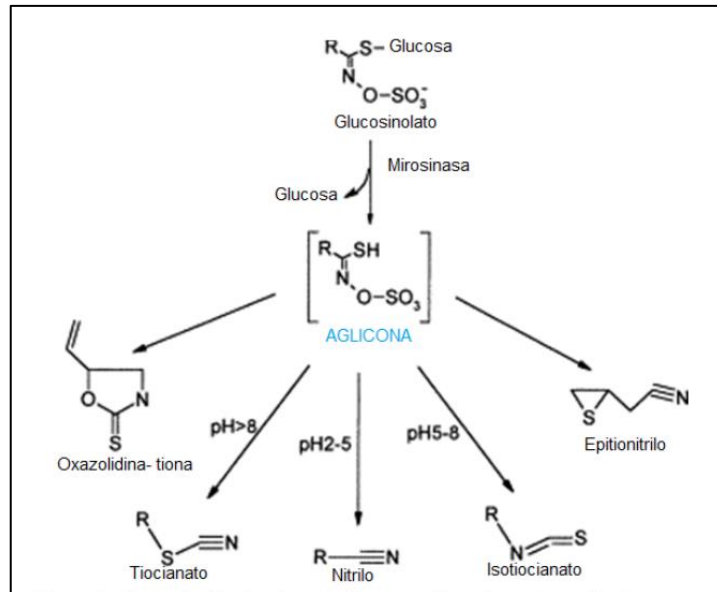


Figura 5. Degradación del glucosinolato por la enzima mirosinasa que caracteriza la formación de aglicona [Rincón, 2014, p.8].

a. Sistema mirosinasa - glucosinolato

Ayambo (2006) menciona que la mirosinasa es la enzima que hidroliza los glucosinolatos, estos están acompañados en la planta por esta enzima, las mirosinasas se encuentran en idioblastos, que contienen proteínas llamadas células de mirosina que se encuentran separados en el tejido parenquimático hasta que se produce daño tisular o autólisis, generado durante el proceso de molienda .

La hidrólisis de los glucosinolatos producida por la mirosinasa puede producir: Isotiocianatos que es el principal fitoquímico con actividad anticarcinogénica, entre ellos el Sulforafano cuando la hidrólisis se produce en un pH normal; Nitrilos que son sustancias tóxicas no deseadas cuando la hidrólisis ocurre a pH ácido; Cianoepitioalcanos y Tiocianatos (Ayambo, 2006).

2.2.3. Antecedentes de la extracción de bencil glucosinolato del mastuerzo

En 1993, Lykkesfeld y Lindberg detallan en su investigación la presencia y contenido del Bencil glucosinolato en *Tropaeolum majus L.* en diferentes etapas del desarrollo de floración y semilla. Donde el contenido de bencilglucosinolato en las flores aumentó rápidamente durante el proceso de floración, disminuyeron durante el florecimiento de las flores y aumentaron de nuevo durante la formación

de la semilla. Las diferentes etapas florales reflejaban así el transporte de bencilglucosinolato a partir de las hojas y los brotes. Los experimentos biosintéticos en los que se usan semillas vecinas en desarrollo no mostraron un aumento detectable de su capacidad biosintética en comparación con otras hojas.

En la figura 6 se muestra el contenido total de bencilglucosinolato durante en desarrollo de la planta de mastuerzo donde se puede observar que las semillas de *Tropaeolum majus L.* contiene aproximadamente 5 mg de glucosinolato de bencilo y que durante la germinación y durante la etapa de plántulas, el nivel de glucosinolato fue casi constante.

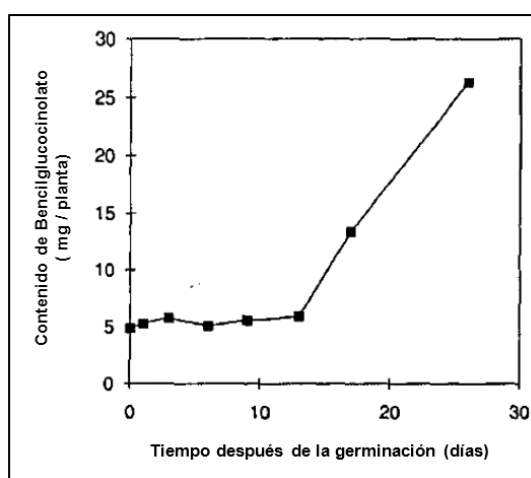


Figura 6. Desarrollo del bencilglucosinolato en el mastuerzo. [Lykkesfeld J. & Lindberg M. B., 1993].

El contenido total aumentó rápidamente durante los siguientes semanas para alcanzar 200 a 400 mg en plantas adultas (3 a 4 meses de edad) dependiendo del tamaño. Este resultado demostró la presencia de un sistema activo de enzima de síntesis de bencilglucosinolato durante las etapas de crecimiento tardías de *Tropaeolum majus L.* (Lykkesfeld y Lindberg, 1993). En la figura 7 se muestra el contenido de bencilglucosinolato de la flor en desarrollo y la semilla.

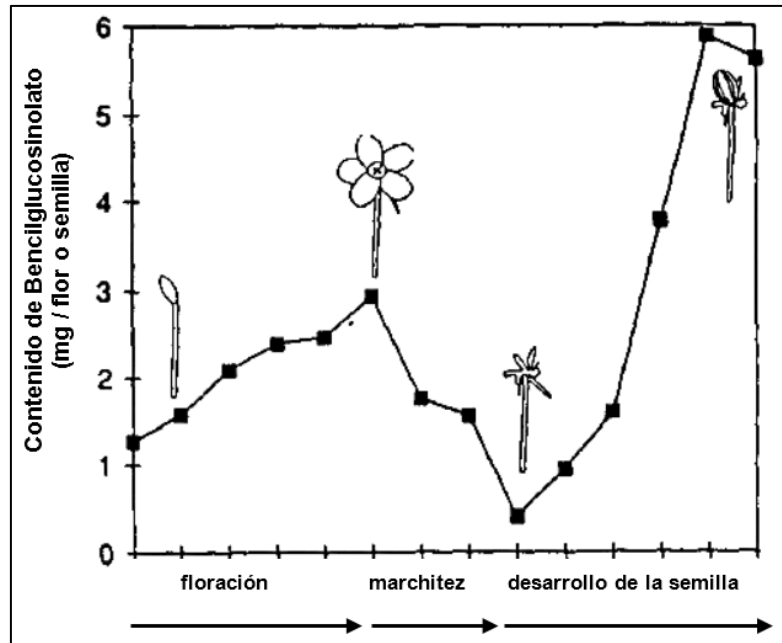


Figura 7. Contenido de bencilglucosinolato de la flor en desarrollo y semilla. [Lykkesfeld J. & Lindberg, 1993].

2.2.4. Bencil isotiocianato

Liangcheng & Halkier (1996) menciona que la glucotropaeolina del *Tropaeolum majus L.* es hidrolizada por la mirosinasa a bencil isotiocianato.

El bencil isotiocianato es un compuesto antifúngico, puede usarse como tratamiento en post-cosecha para controlar la podredumbre por manipulación, hongos y malas prácticas de cosecha, Troncoso *et al.* (2005) evaluaron el efecto del bencil isotiocianato sobre hongos, por tal motivo ensayó la eficacia del isotiocianato de bencilo para controlar el crecimiento de *Alternaria alternata* in vitro e in vivo en tomate. Evaluaron diariamente el efecto del bencil isotiocianato sobre la fisiología post-cosecha y la calidad del tomate a lo largo del almacenamiento a 20 °C mediante el control de la tasa de respiración y la producción de etileno, mientras que los sólidos solubles totales, el pH, la acidez titulable y la pérdida de peso fresco se midieron cada tres días. Los resultados mostraron que la concentración inhibitoria mínima de bencil isotiocianato in vitro fue de 0,1 mg ml⁻¹.

El bencil isotiocianato fomenta la apoptosis (muerte celular programada) en células cancerosas de mama interfiriendo en su capacidad de utilizar energía. En células cancerosas de ovario, el bencil isotiocianato estimula las señales celulares que informan al cáncer de que es momento de cerrarse y morir, cualquiera de

estas detenciones en el ciclo de la célula de cáncer prevendrá o encogerá los tumores. El bencil isotiocianato normalmente desencadena la apoptosis de estas células sin afectar a células sanas, algo que la quimioterapia no puede hacer. Además el bencil isotiocianato inhibe la promoción de cáncer obstaculizando que las enzimas citocroma actúen sobre células iniciadas, previniendo así el cáncer (Colbert, 2010).

Uno de los productos de hidrólisis de glucosinolatos convincentes en estudios de cáncer es el isotiocianato de bencilo. Se ha demostrado que el isotiocianato de bencilo induce apoptosis celular en células de cáncer de páncreas y reducen el crecimiento de tumores sólidos (Lykkesfeldt y Lindberg, 1993). Al respecto Spiridon *et al.* (2003) menciona que las propiedades anticancerígenas in vitro del bencil isotiocianato frente a una variedad de líneas de células tumorales humanas y murinas han sido estudiadas por dos métodos independientes; ensayos clonogénicos y conteo de células.

Palencia (1999) menciona que los isotiocianatos pertenece a los agentes quimiopreventivos más efectivos. Asimismo existe una diversidad de isotiocianatos que previenen el cáncer de diferentes tejidos incluyendo el de pulmón, glándula mamaria, esófago, hígado, intestino delgado, colon y vesícula biliar. Entre los isotiocianatos naturales se encuentra: el fenetilisotiocianato y bencilisotiocianato. La figura 8 muestra el proceso de formación del bencil isotiocianato por la acción de la enzima mirosinasa.

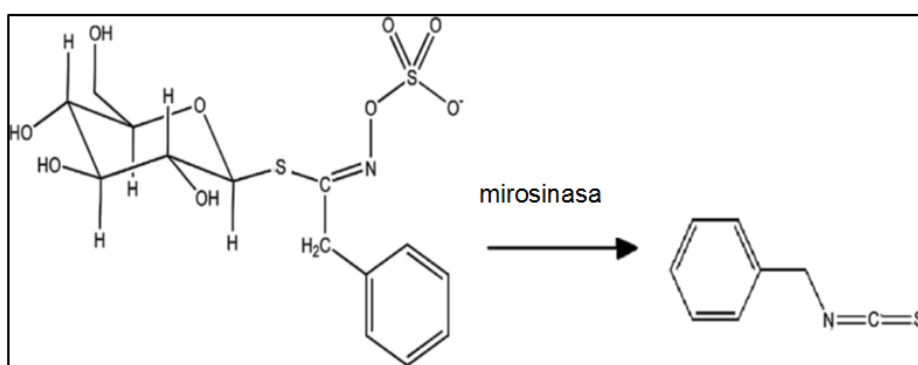


Figura 8. Proceso del bencil isotiocianato mediante la acción de la enzima mirosinasa. [Barroso *et al.* (2016)].

a) *Antecedentes sobre la extracción de isotiocianato de bencilo por diclorometano*

Rodriguez (2011) realizó la extracción de bencil isotiocianato a partir semillas de Papaya de Monte (*Carica pubescens*), que obtuvo mediante extracción diclorometánica. Identificó, aisló y cuantificó por cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En su metodología usó semillas que fueron secadas bajo sombra y por estufa a una temperatura de 42 °C, fueron trituradas hasta obtener un polvo fino, la muestra se desengrasó para luego realizar la hidrólisis a pH 7 con 30 mL de buffer fosfato de potasio, luego añadió 80 mL de diclorometano para la extracción del bencil isotiocianato, haciendo uso de un shaker por 48 horas. Para la saturación del extracto usó 10 g de NaCl y 10 g de NaSO₄, filtró el extracto con papel Whatman # 01, y finalmente el extracto obtenido lo dejó en la campana de gases por seis horas obteniendo así como extracto final 1,72 ml para luego diluirlo en metanol y así poder cuantificar la cantidad de isotiocianato de bencilo que presenta las semillas de papaya por HPLC obteniendo así que la concentración de bencil isotiocianato en semillas de papaya es de 17,44 % (997 mg/100g), teniendo como tiempo de retención entre los picos del bencil isotiocianato obtenido de las semillas de *carica pubescens* y el BIT 98% estándar de 1,72 min y 1,75 min.

Wen-Zhao *et al.* (2014) realizó el trabajo de investigación: Formación optimizada de la extracción de isotiocianato de bencilo por enzima endógena de *Carica* Semilla de papaya, estas semillas fueron secadas bajo la luz del sol hasta un contenido de agua de hasta 10 %, luego fueron molidas de donde usó 50 g de polvo y lo mezcló con 50 mL de solución tampón pH 7 (0,1 mol / L de ácido cítrico y 0,2 mol / L solución disódica de fosfato de hidrógeno), agitó la mezcla en un dispositivo Vortex durante 5 minutos y luego incubó a 35 °C en baño maría durante 2 h, para optimizar la conversión de glucosinolato de bencilo en bencil isotiocianato el investigador realizó variaciones de los parámetros en tamaño de partícula de polvo, pH de solución tampón, temperatura y tiempo de emzimolisis. La extracción la realizó por destilación, para luego ser mezclado este con diclorometano, posteriormente mediante decantación separó la fase diclorometanica que contenía el bencil isotiocianato; determinando como optimas las condiciones de tamaño de partícula de polvo de semilla de 90 a 120 µm, pH de la solución tampón 4,8; temperatura de enzimolisis de 40 °C; y tiempo de enzimolisis de 27 min. La identificación del bencil isotiocianato lo realizó por cromatografía de capa fina usando como estándar el bencil isotiocianato al 98% y como fase móvil diclorometano y éter de petróleo.

b) *Antecedentes de extracción de isotiocianato de bencilo por CO₂ supercrítico*

Barroso *et al.* (2016) realizó la evaluación de la eficiencia y composición del aceite extraído de semillas de *Carica papaya* con dióxido de carbono supercrítico. El experimento lo realizó en una unidad que contenía principalmente una bomba de alta presión y un extractor de acero inoxidable con 42 mL de volumen. El muestreo lo realizó cada 20 min hasta la saturación del proceso. Utilizó aproximadamente 6,5 g de muestra y trabajó a tres temperaturas que fueron de 40, 60 y 80 °C bajo las presiones de 100, 150 y 200 bar. Después de la recolección de papaya, las semillas fueron trituradas y secadas a 60 °C durante un tiempo de 60 min. Llegando a la conclusión que el mejor tratamiento se encontró a 80 °C y 200 bar (2,56%) seguidas por 40 °C y 150 bar (1,33%), para el rendimiento de aceite extraído. Para poder identificar el bencil isotiocianato usaron la cromatografía de gases y el análisis de resonancia magnética nuclear.

Barroso *et al.* (2016) también mencionan con respecto a la investigación que todos los extractos fueron homogéneos en su composición. La presencia de bencil isotiocianato se detectó en todas las muestras extraídas con la mayor concentración a 40 °C y 150 bar; 80 °C y 200 bar, con 11 y 7% respectivamente. Determinó que aunque el aceite extraído, a 40 °C y 150 bar, tiene la mayor concentración de bencil isotiocianato en términos absolutos, la condición de 80 °C y 200 bar extrajo mayores rendimiento de bencil isotiocianato. El dióxido de carbono supercrítico mostró viabilidad técnica en la extracción del aceite de *Carica papaya* de las semillas. Obtuvo como mejor resultado en el rendimiento a las condiciones de 80 °C y 200 bar con un 2,5% de aceite extraído, indica también que la eficiencia aumentaba con el aumento de la presión, a temperatura constante, el aumento de temperatura causa la disminución en la eficiencia del proceso, excepto a 80 °C. El bencil isotiocianato se presentó en todos los extractos, pero se concentró más a 80 °C y 200 bar, indicando que las condiciones más altas de temperatura y presión son mejores para extraer más cantidad de bencil isotiocianato. Las concentraciones de bencil isotiocianato de los extractos extraídos por soxhlet y CO₂ supercrítico fueron similares, sin embargo los extractos extraídos por CO₂ supercrítico presentaron una baja cantidad del componente bioactivo.

Lizhong, Zheng & Zhang (2015) realizó la extracción supercrítica con CO₂ de polvo de Maca desactivado por enzimas para extraer componentes solubles en grasa, eliminar impurezas tales como esteroles por un método de precipitación en frío, llevar a

cabo la esterificación de etilo sobre la grasa en el extracto mediante un método de alcoholisis catalizada por enzima y finalmente llevar a cabo destilación molecular de dos etapas para obtener isotiocianato de bencilo y glucosinolato. Realizó la extracción con CO₂ supercrítico con los parámetros de 15 a 24 MPa, con un control de temperatura entre 46 a 65°C.

Turgut & Temelli (1996) realizaron el estudio del efecto de las condiciones de extracción de dióxido de carbono supercrítico teniendo en cuenta la temperatura, presión, tiempo de extracción y contenido de humedad de las muestras; sobre la actividad de la mirosinasa y la hidrólisis de glucosinolato en semillas de canola en escamas y enteras. Utilizaron efectos combinados de alta temperatura de 75 ° C, presión de 62,1 MPa y humedad de 20% p / p. Se observó una degradación significativa del glucosinolato después de 5 horas de extracción de semillas de canola enteras de bajo contenido de humedad (8,5% p / p). La degradación del glucosinolato en copos de canola fue mínima a todos los niveles de humedad estudiados. Por lo tanto, la inactivación de la mirosinasa antes de la extracción con CO₂ supercrítico de copos de canola puede no ser necesaria.

2.3. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Azmir *et al.* (2013) señalan que la distribución de un compuesto de dos fases inmiscibles: la muestra y la fase disolvente, es el principio básico de la extracción, lo que permite la posterior recuperación y separación de los compuestos extraídos.

Los compuestos pueden encontrarse: adsorbidos sobre la superficie de la muestra, disueltos en el mismo, en un micro o nanoporo, enlazados químicamente a la muestra o disueltos en la disolución a granel. La extracción y recuperación de un conjunto de compuestos a partir de una muestra sólida puede resumirse en cinco pasos:

- ✓ el disolvente se transfiere y la impregna desde la fase fluida a la superficie de la muestra.
- ✓ el disolvente penetra a la muestra por difusión molecular.
- ✓ el material es solubilizado por desorción de la muestra y solvatación en el disolvente.
- ✓ la disolución con los compuestos por difusión molecular retorna a la superficie del sólido.
- ✓ la disolución es transferida de la superficie sólida por convección natural o forzada a la fase fluida.

Palma *et al.* (2013) citado en Ortega (2014) sustentan que uno de los parámetros de mayor importancia en la extracción es el disolvente, dado que, su naturaleza determina la eficiencia del proceso en términos de la solubilidad de los compuestos de interés y la penetrabilidad en las partículas de la muestra.

La selectividad y la toxicidad son aspectos fundamentales a considerar al elegir un disolvente, particularmente en el contexto de las tendencias en procesos innovadores de extracción de productos naturales (Azmir *et al.*, 2013).

Smith (2003) mencionado en Azmir *et al.* (2013) señala que todas las técnicas tienen objetivos comunes como:

- ✓ Extraer compuestos bioactivos específicos.
- ✓ Aumentar la selectividad.
- ✓ Aumentar la sensibilidad aumentando la concentración de compuestos.
- ✓ Convertir los compuestos bioactivos en una forma más adecuada para la detección y separación.
- ✓ Proporcionar un método óptimo y reproducible.

2.3.1. Técnicas de extracción

La creciente demanda de extracción de compuestos bioactivos de plantas fomenta la búsqueda continua de métodos de extracción convenientes, la importancia económica de los compuestos bioactivos y los productos ricos en estos compuestos bioactivos puede conducir a encontrar métodos de extracción más sofisticados (Azmir *et al.*, 2013).

Palma *et al.* (2013) citado en Ortega (2014) mencionan que las técnicas de extracción deben enfocarse al sistema tecnológico y condiciones experimentales, tales como la naturaleza del disolvente, tiempo, temperatura, entre otros, bajo los cuales se lleva a cabo el proceso extractivo, de tal modo que una misma técnica puede dar origen a varios métodos de extracción.

Existen numerosas técnicas para la obtención de extractos de origen natural, las cuales han sido clasificadas por diversos autores como técnicas tradicionales y técnicas no convencionales.

- a) *Las técnicas de extracción tradicionales*: han sido utilizadas desde hace años, ya que su implementación es simple y accesible, aunque requieren de periodos prolongados de tiempo con consumos importantes de disolvente como son: maceración, percolación, destilación y soxhlet. Estas técnicas no se consideran eficientes, en tanto que los rendimientos y selectividad proporcionados son bajos, en general (Azmir *et al.*, 2013). Los mayores desafíos de la extracción convencional son el tiempo de extracción más largo, el requerimiento de disolvente costoso y de alta pureza, la evaporación de la enorme cantidad de disolvente, la baja selectividad de extracción y la descomposición térmica de compuestos termo lábiles (Luque de Castro *et al.*, 1993).
- b) *Las técnicas no convencionales*: en algunos casos denominadas como innovadoras o emergentes, corresponden a las tecnologías desarrolladas y promovidas en el marco de la química verde como: Extracción con fluidos supercríticos, Extracción asistida por microondas y Microextracción en fase sólida. (Azmir *et al.*, 2013).

La cromatografía y la conciencia sobre el medio ambiente son dos factores significativos para el desarrollo de la mayoría de los procesos de extracción no convencionales. Los métodos no convencionales, son más respetuosos con el medio ambiente debido a la disminución en el uso de productos químicos sintéticos y orgánicos, también reducen el tiempo de operación y mejoran el rendimiento y la calidad del extracto. Algunas de estas técnicas son consideradas como técnicas verdes, ya que estos incluyen síntesis química menos peligrosa; diseño de productos químicos más seguros, solventes auxiliares, uso de materia prima renovable, reducen derivados, diseño para prevenir la degradación, y análisis del tiempo para la prevención de la contaminación y química inherentemente más segura para la prevención de accidentes (Azmir *et al.*, 2013). La tabla 4 muestra la comparación que realiza Tornero (2012) entre la extracción tradicional con el uso de solventes y la extracción no convencional.

Tabla 4. Comparación de los métodos de extracción tradicional y extracción no convencional.

Extracción tradicional	Extracción convencionales	no
Baja selectividad	Alta selectividad	
Poder disolvente difícil de modificar	Poder disolvente ajustable	
Disolventes dañinos para el medio ambiente	Disolventes amigables con el medio ambiente	
Dificultad en purificar y recuperar el disolvente	Fácil de purificar, produce extractos más puros de alto valor comercial	

Nota: Tomado de [Tornero (2012)].

2.4. EXTRACCIÓN POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Es una técnica de separación de sustancias disueltas dentro de una matriz, basada en la capacidad que tienen determinados fluidos en estado supercrítico de modificar su poder disolvente dependiendo de las condiciones de presión y temperatura que se le dé (Raventos, 2005).

2.4.1. Fluidos supercríticos

Raventos (2005) menciona que los fluidos supercríticos son gases o líquidos en condiciones ambientales, presentan su elevado poder disolvente en estado supercrítico. Al respecto Luque de Castro *et al.* (1993) sostienen que un fluido supercrítico está en estado compresible, se comporta como un gas, también puede definirse como un gas denso con poder disolvente controlable, también como una forma de la materia en la que los estados líquidos y gaseoso son indistinguibles en sí. La técnica del fluido supercrítico ha atraído un amplio interés científico y se ha utilizado con éxito en aplicaciones ambientales, farmacéuticas, y análisis de alimentos (Azmir *et al.*, 2013). La figura 9 muestra las características de los fluidos supercríticos mencionado en Luque de Castro *et al.* (1993), donde se observa que los fluidos supercríticos tienen características como: Compresibilidad (densidad variable y poder solubilizante variable), baja viscosidad (buenas características

dinámicas), tensión superficial muy baja, alta difusividad (favorecen el transporte), no son gases ni líquidos pero tienen propiedades similares, como en la de gases la difusividad y en la de líquidos la solvatación.

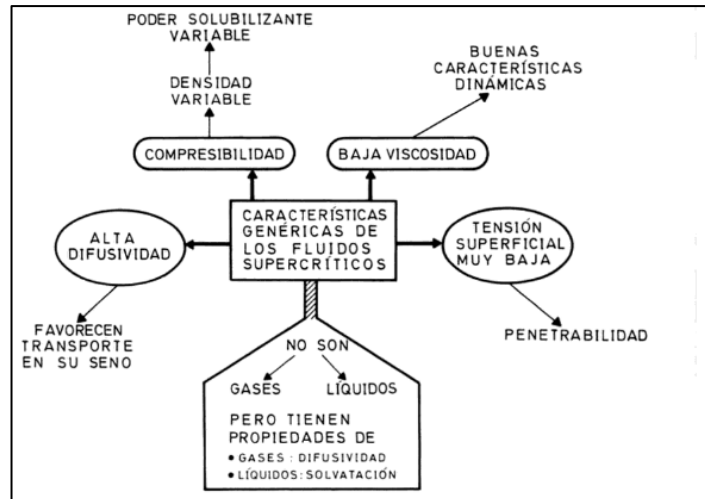


Figura 9. Características genéricas de los fluidos supercríticos [Luque de Castro *et al.*, 1993]

2.4.2. Diagrama de fases general para una sustancia pura

La figura 10 muestra el diagrama de fases de una sustancia pura, que es representada por Rojas (2012) en la cual se puede observar que están bien diferenciadas las regiones de temperatura y presión donde la sustancia existe como una fase única. Estas zonas están separadas por las curvas de coexistencia de dos fases (sólido-vapor, sólido-líquido y líquido-vapor), correspondientes a los equilibrios de sublimación, fusión y vaporización, respectivamente. Las curvas se cortan en un punto, punto triple (PT), en el cual coexisten las tres fases en equilibrio.

En el caso del equilibrio líquido - vapor, la curva de presión de vapor se interrumpe bruscamente en un punto, denominado punto crítico (P_c), este punto del diagrama de fases está definido por una temperatura crítica (T_c) y por una presión crítica (P_c), a partir del cual, al aumentar la presión no se origina la licuefacción y al aumentar la temperatura no se forma un gas. A lo largo de la curva correspondiente a la presión de vapor, se observa que al aumentar la temperatura lo hace la presión a la que hay coexistencia entre líquido y vapor (Rojas, 2012).

Al aumentar la presión de vapor de la sustancia, la diferencia entre las densidades de las fases gaseosa y líquida disminuye, llegándose a unas condiciones de presión y temperatura (P_c , T_c) en las que las densidades del líquido y del gas coinciden, constituyendo ambos una única fase. La zona de presiones y temperaturas por encima de T_c y P_c se conoce como región supercrítica (Rojas, 2012).

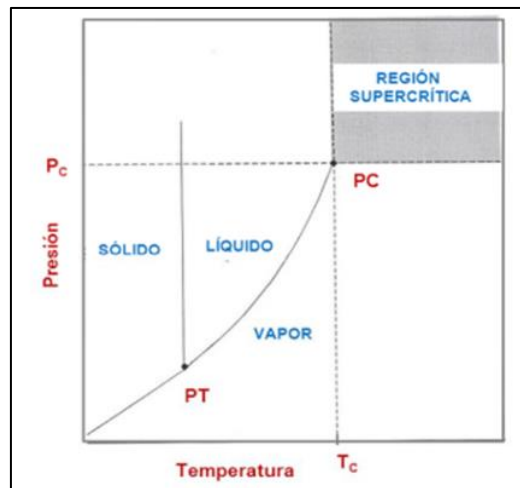


Figura 10. Diagrama de fases de una sustancia pura [Rojas, 2012].

2.4.3. Propiedades de los fluidos supercríticos

Según Rojas (2012) los fluidos supercríticos tienen propiedades básicas que son densidad, difusividad y viscosidad que varían de acuerdo a la presión y la temperatura.

- a) **Densidad:** Mantiene su valor siempre próximo a los típicos de los líquidos, de ahí su buena propiedad como disolvente. La densidad aumenta notablemente al hacerle la presión cuando se mantiene constante la temperatura y que disminuye al aumentar la temperatura a presión constante.
- b) **Difusividad:** Tiene difusividades semejantes a la de los gases, la difusividad de un fluido disminuye al hacerle la temperatura y al aumentar la presión.
- c) **Viscosidad:** Es similar a la de los gases, varía con la presión y con la temperatura, aumenta al hacerle la presión a temperatura constante.

Los fluidos supercríticos extraen compuestos químicos por la combinación de temperatura y presión (Brunner, 2005; Rozzi y Singh, 2002) citado en (Velasco, Villada y Carrera, 2007). La tabla 5 muestra las propiedades críticas de compuestos comúnmente usados como fluidos supercríticos, en lo cual se puede

destacar la temperatura crítica y presión crítica del dióxido de carbono que es de 31 °C y 73,86 bar respectivamente.

Tabla 5. Propiedades críticas de los fluidos supercríticos

Fluidos	T_c (°C)	P_c (bar)	Densidad (Kg/m³)
Acetileno	36	62.47	232.14
Acetona	235	47.00	278.00
Agua	374	220.90	322.60
Dióxido de carbono	31	73.86	467.66
Etano	32	48.71	135.75
Etanol	240.4	61.4	276.00
Etileno	9	50.40	195.80

Nota: Tomado de [Velasco, R., Villada, H., & Carrera, J. 2007, (p. 53 – 66)]

2.4.4. Dióxido de carbono supercrítico

Este fluido supercrítico permite llevar a cabo extracciones sin utilizar prácticamente disolventes orgánicos, obteniendo extractos finales listos para ser analizados (Herrera, 2004). Por sus propiedades el CO₂ es el disolvente ideal para aplicaciones en las industrias farmacéuticas, de cosméticos y alimentaria, en las que las extracciones y los fraccionamientos deben llevarse a cabo a temperaturas lo más próximas posible al ambiente, para evitar eventuales degradaciones térmicas, y que exigen la eliminación de cualquier traza de disolventes químicos, dada la siempre discutible inocuidad de los mismos (Martínez, Villaseñor y Lobato, 2004).

El CO₂ es el más usado por tener una presión crítica moderada y baja temperatura crítica, siendo el elegido para la extracción de compuestos termolábiles, teniendo limitaciones para la extracción de compuestos polares (Ruiz, 1996).

a) *Ventajas del uso del CO₂ supercrítico:*

Según Velasco *et al.* (2007) el dióxido de carbono supercrítico presenta importantes ventajas como:

- ✓ Es el más utilizado ya que no es tóxico, no es inflamable, no es corrosivo, y no es costoso.
- ✓ Es fácil de eliminar y no deja residuos.
- ✓ Se trabaja a baja temperatura y por tanto se separan compuestos termolábiles.
- ✓ Tiene alto coeficiente de difusión y viscosidad menor que los líquidos.
- ✓ No tiene tensión superficial, mejora la operación de extracción ya que es rápida la penetración de estos al interior de los poros de la matriz heterogénea.
- ✓ Es usado en diversas aplicaciones industriales resaltando la industria de alimentos y farmacéutica.

b) *Desventaja del uso del CO₂ supercrítico:*

- ✓ La desventaja que presenta frente a otros fluidos supercríticos, es su carácter apolar, que hace que pueda resultar no adecuado para el caso de analitos de alta polaridad (Herrera, 2004).
- ✓ El dióxido de carbono tiene baja polaridad que lo hace ideal para los lípidos, las grasas y las sustancias no polares (Azmir *et al.*, 2013).

2.4.5. Solubilidad de los fluidos supercríticos

Ruiz (1996) indica que el incremento de la presión a temperatura constante produce un incremento en la solubilidad disminuyendo la selectividad. La solubilidad puede aumentar, disminuir o permanecer invariable con el aumento de temperatura a presión constante, este puede variar por la presión de vapor del soluto o la densidad del solvente. Luque de Castro *et al.* (1993) afirma que a bajas presiones la solubilidad disminuye con el aumento de temperatura, ya que la densidad disminuye; y a altas presiones la solubilidad se incrementa ya que la presión de vapor del soluto aumenta frente a la variación de la densidad del solvente en la zona de altas presiones.

La tabla 6 muestra de modo esquemático los grupos funcionales de los solutos y su efecto beneficioso o adverso sobre su solubilidad en CO₂ supercrítico ya que la estructura química del soluto es un factor importante para mejorar la selectividad.

Tabla 6. Efecto beneficioso y adverso sobre la solubilidad del CO₂ supercrítico respecto a los grupos funcionales de los solutos:

Aumenta la solubilidad	Disminuyen la solubilidad
Saturaciones	Aumento del peso molecular
Ramificaciones	Aromaticidad
esterificaciones	Carboxilos
	Hidroxilos
	Halógenos
	Nitroderivados.
	Amínas

Nota: Tomado de [Luque de Castro *et al.*, (1993)].

2.4.6. Factores que afectan el rendimiento de extracción por CO₂ supercrítico

La optimización del rendimiento es una función de varios parámetros independientes tales como:

a) *Presión*

La presión influye significativamente en la velocidad de extracción, así como el tiempo de extracción, a medida que la presión aumenta más allá de un punto crítico, el rendimiento disminuye como resultado del aumento de la densidad. Una densidad más alta manifiesta un doble efecto, provocando un aumento en el poder de solvatación y una disminución en la interacción entre los fluidos y la matriz, reduciendo así la porosidad entre partículas y el transporte de masa a través de la muestra que eventualmente contribuye a disminuir el rendimiento (Shi, 2016). Al respecto Ahluwalia (2013) menciona que se obtiene una mayor

recuperación de las fracciones volátiles y una menor recuperación de las fracciones no volátiles con una presión creciente en el proceso. Por lo tanto, la composición del extracto se puede controlar mediante la regulación de la presión.

b) Temperatura

El efecto de la temperatura es el más confuso, ya que existe un efecto de solubilidad competitivo causado por el aumento de la presión de vapor y la disminución de la densidad al aumentar la temperatura. La densidad de CO₂ a presión constante disminuye con el aumento de la temperatura y conduce a la reducción de la potencia del disolvente del fluido; con el aumento de temperatura, hay mejoras en la transferencia de masa y en el rendimiento de extracción, ya que provoca el aumento de la presión de vapor de los compuestos extraíbles que es más significativo que la reducción en la densidad del disolvente, aumentando por consiguiente el rendimiento de extracción global; por lo tanto, la tendencia de los compuestos a extraer se incrementa ya que pueden pasar a la fase fluida supercrítica (Ahluwalia, 2013).

c) Contenido de humedad

La alta humedad inhibe el flujo del fluido supercrítico - CO₂ cambiando la tensión superficial y los ángulos de contacto como resultado de la interacción de fase entre los componentes (la muestra y el CO₂ supercrítico). Sin embargo, la eliminación del exceso de agua libera los poros de las interpartículas y, por lo tanto, aumenta la intensidad del transporte de masa durante la extracción; es decir cuanto mayor sea el contenido de humedad, mayor será la probabilidad de formación de una película delgada entre la matriz sólida y la fase fluida supercrítica. El agua tiene una solubilidad pequeña pero finita en el fluido CO₂ supercrítico, y como resultado también se puede extraer con los componentes objetivo y su separación puede hacerse al final del proceso (Shi, 2016).

d) Tiempo de extracción

El tiempo de extracción en fluidos supercríticos es una de las variables muy importantes, ya que la eficacia del rendimiento de recuperación puede aumentarse si se maximiza el contacto del disolvente supercrítico con el material de alimentación, también depende del tipo de material, las concentraciones de soluto en la matriz, el caudal de CO₂ y las condiciones de operación. El tiempo es

fundamental como parámetro de selectividad y de costo del proceso, ya que está asociado al periodo de extracción (solubilidad y difusión controlada), el tiempo puede estar relacionado con la termolabilidad de los compuestos de interés en términos de periodos de exposición y degradación (Ahluwalia, 2013).

e) *Tamaño de partícula*

El rendimiento de extracción aumenta cuando el tamaño de partícula disminuye, ya que la molienda antes de la extracción no sólo incrementa el área interfacial, sino que también libera solutos destruyendo las estructuras internas de las partículas, lo que resulta en una tasa de extracción más alta. La resistencia a la difusión entre partículas es menor para un tamaño de partícula más pequeño debido a la trayectoria de difusión más corta, es por ello que las partículas muy finas pueden generar sobrepresurización en el sistema, impidiendo el proceso extractivo. Se ha observado una cantidad creciente del extracto en comparación con el tamaño de partícula y en estudios concluyeron que las estructuras celulares deben ser rotas para obtener una extracción completa de sustancias (Ahluwalia, 2013).

f) *Efecto de los modificadores de disolventes.*

El CO₂ supercrítico tiene buenas propiedades disolventes y se utiliza a menudo para la extracción de compuestos no polares y algunos compuestos polares. El CO₂ puro no es ampliamente utilizado para la extracción de compuestos hidrófilos y una práctica común en extracción por fluidos supercríticos es cambiar la polaridad del fluido supercrítico con la adición de pocas cantidades de co-disolventes orgánicos y aumentar así el poder solvatante hacia los compuestos. Los co-solventes interactúan fuertemente con los analitos (enlace de hidrógeno, dipolo-dipolo y otras interacciones de polaridad) lo que resulta en una mejora significativa de los rendimientos de extracción, el etanol y el metanol son los co-disolventes más utilizados en la extracción por fluidos supercríticos. Existen dos procedimientos principales mediante los cuales se pueden incorporar co-disolventes o modificadores en el proceso que es la mezcla del modificador con el flujo de CO₂ y mezcla del modificador con materia prima en la celda de extracción (Ahluwalia, 2013).

La limitación de la baja polaridad del dióxido de carbono se ha superado con éxito mediante el uso de modificador químico (Lang y wai, 2001; Ghafoor *et al.*, 2010) mencionado en (Azmir *et al.*, 2013). Por lo general, una pequeña cantidad de

modificador se considera útil para mejorar significativamente la polaridad del dióxido de carbono (Hawthorne *et al.*, 1994) mencionado en (Azmir *et al.*, 2013).

g) *Efecto del pretratamiento*

Se han observado diferencias en la calidad entre los extractos obtenidos de muestras de diferentes orígenes y muestras almacenadas en condiciones secas y congeladas. Para la recuperación máxima de los productos de alto valor, los subproductos deben ser almacenados en estado congelado. La presencia de agua en el tejido vegetal interfiere con la eficacia de la extracción por el CO₂, ya que impide la difusión del CO₂ en la matriz sólida, por lo tanto, se han investigado diferentes técnicas tales como secado en horno, liofilización o utilización de adsorbentes para eliminar agua de la muestra; indicando que el rendimiento de extracción de las muestras liofilizadas es mayor que el de muestras secadas al horno. El efecto del pretratamiento en el triturado de la muestra produce un pequeño aumento en el componente extraído, por lo tanto, el aplastamiento se podría considerar como un parámetro para aumentar la eficiencia del proceso (Ahluwalia, 2013).

g.1. Liofilización

Es un proceso de secado mediante sublimación, que se desarrolló con el fin de evitar pérdidas de compuestos responsables del sabor y el aroma en los alimentos, ya que se pierden durante los procesos convencionales de secado; este proceso consta de dos pasos: el congelado del producto y secado por sublimación directa del hielo bajo presión reducida (Orrego, 2008).

Los glucosinolatos altamente volátiles y los isotiocianatos han mostrado un amplio rango de estabilidad al ser almacenados a bajas temperaturas según (Kyung *et al.*, 1997) después de su extracción con solventes como acetona, benceno, etanol o cualquier otro mencionado en Acosta (2006).

2.5. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

En el 2013, Hernández sostuvo que la cromatografía en capa fina (CCF) está basada en la elaboración de una delgada capa uniforme sobre una placa de vidrio u otro soporte con dos fases: la fase móvil que es líquida y será un componente polar; y la fase estacionaria que es un sólido, el eluyente será menos polar, de manera que

los componentes que se deslicen con mayor velocidad serán los menos polares. Citado en (Cabezas, 2014).

La cromatografía de capa fina comprende dos fases: la fase estacionaria (adsorbente) que se encuentra depositada sobre la placa de vidrio, formando una capa fina de espesor uniforme (0,1 – 0,2 mm); y la fase móvil (eluyente) que asciende a lo largo de la placa que contiene la sustancia a analizar, por medio de capilaridad, desplazando los componentes de la mezcla a diferentes velocidades estimulando su separación (Csáky y Martínez, 2012).

La mezcla a analizar es colocada sobre la placa a una pequeña distancia del borde inferior, y debe ser retirada de la cubeta cromatográfica cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo superior de la placa, se deja secar y se procede a visualizar las manchas. (Csáky y Martínez, 2012).

2.5.1. Determinación del factor R_f

Csáky y Martínez (2012) mencionan que el factor R_f es la relación entre las distancias recorridas por el compuesto a analizar y por el disolvente desde el origen del cromatograma, este tiene un valor constante para cada compuesto en diferentes condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc). Es recomendable elegir un disolvente en el que los componentes de la mezcla presenten un R_f medio en torno a 0,3 – 0,5. Si un componente eluye a un R_f inferior a 0,2 o superior a 0,7, puede ocurrir que lo que parece un compuesto único sea en realidad una mezcla de varios, en estos casos se debe cambiar otro disolvente más o menos polar, respectivamente. Para calcular el R_f , se aplica la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

La figura 11 muestra la manera correcta de como determinar el valor R_f en cromatografía de capa fina, en lo cual se puede observar que la distancia recorrida por el compuesto se mide desde el centro de la mancha. A mayor polaridad de un compuesto, mas retenido queda en el adsorbente y menor será su R_f . Por el contrario, los de baja polaridad se desplazan a mayor distancia del origen (Csáky y Martínez, 2012).

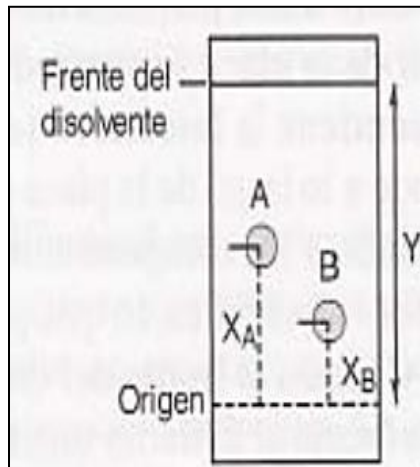


Figura 11. Determinación del valor R_f en cromatografía de capa fina [Csáky y Martínez, 2012]

A continuación se muestran las ecuaciones para calcular los valores de R_f y determinar que compuesto tiene mayor polaridad (Csáky y Martínez, 2012).

$$R_f = \frac{X}{Y}$$

$$R_f(A) = \frac{X_A}{Y}$$

$$R_f(B) = \frac{X_B}{Y}$$

$$R_f(A) > R_f(B)$$

B mas polar que A

2.5.2. Elección del eluyente para determinar el bencil isotiocianato

Rodríguez (2011) realizó la extracción del bencil isotiocianato a partir de semillas de papaya de monte (*Carica pubescens*) donde determinó como mejor eluyente una solución de hexano: diclorometano en relación 4:2.

2.5.3. Visualización del cromatograma

Las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos a la luz ultravioleta (254 nm), en caso que no absorban la luz ultravioleta, la visualización del cromatograma requiere utilizar un agente revelador, ya que este reacciona con los productos absorbidos proporcionando compuestos coloreados (Csáky y Martínez, 2012).

Según Rodríguez (2011) la visualización del bencil isotiocianato se puede realizar de dos maneras:

- a) En una cámara de luz UV a 254 nm observándose la mancha
- b) Esprayando con nitrato de plata amoniacal hasta la aparición de manchas marrón oscuro, para luego esprayar con ácido nítrico a 0,5 N.

2.6. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

Alfonso (2008) indica que la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es la técnica analítica de separación que debido a su sensibilidad es la más utilizada, ya que realiza determinaciones cuantitativas exactas y que es aplicable a diferentes tipos de sustancias. Al respecto Harris (2007) menciona que la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) utiliza una presión elevada para obligar al disolvente a que pase por una columna que contiene partículas muy finas, logrando así separaciones de gran resolución.

El equipo de HPLC consta de un sistema de abastecimiento de disolvente, una válvula de inyección de muestra, una columna de alta presión, un detector, un horno para controlar la temperatura de la columna y un ordenador para controlar el equipo y visualizar los resultados (Harris, 2007).

Csáky y Martínez (2002) indican que para realizar las corridas en HPLC se requiere de un cromatógrafo de líquidos en el que la columna es la fase estacionaria, y la fase móvil es el disolvente (líquido) que se bombea a velocidad de flujo constante a través de la columna a alta presión (1000 - 6000 psi). La muestra a analizar se inyecta disuelta en la columna y sus componentes se separan a medida que el disolvente eluye la muestra, en función de sus afinidades relativas por la fase estacionaria y la fase móvil. Finalizada la elución cada componente de la muestra pasa por un detector que convierte la información en una señal eléctrica y la envía a un registro gráfico, obteniéndose el correspondiente cromatograma.

2.6.1. Cuantificación por HPLC del isotiocianato de bencilo

Según Rodríguez (2011) para la cuantificación del bencil isotiocianato la muestra lo diluye con MeOH y procede a la lectura HPLC con las siguientes condiciones cromatográficas.

- Columna: Eclipse XDB C8 4.6 x 50mm
- Fase móvil : MeOH: Acetonitrilo (50:50)
- Diluyente: MeOH
- Longitud de onda: 246nm
- Flujo: 1mL/min
- Vol. De inyección: 20uL
- Tiempo de corrida: 3minutos
- Equipo: HPLC

Luego de obtener las áreas de los picos en las muestras por HPLC, se procede a determinar la concentración de bencil isotiocianato.

2.6.1.1. Espectro del bencil isotiocianato

Rodríguez (2011) realizó la cuantificación de bencil isotiocianato por HPLC obtenido a partir de semillas de *carica pubescens*, en lo cual determinó el espectro del bencil isotiocianato e identificando la longitud de onda a utilizar para la cuantificación, por lo tanto en la figura 12 se muestra el espectro de absorción del bencil isotiocianato que fue obtenido por espectrofotometría, donde se observa que las curvas de la muestra que trabajó son idénticos al del estándar, por lo que demuestra que corresponde al compuesto de interés que es el bencil isotiocianato, asimismo hay un rango en el que se evidencia el punto de absorbancia más alto, esto va de 200 a 300 nm de longitud de onda, siendo la óptima 246 nm.

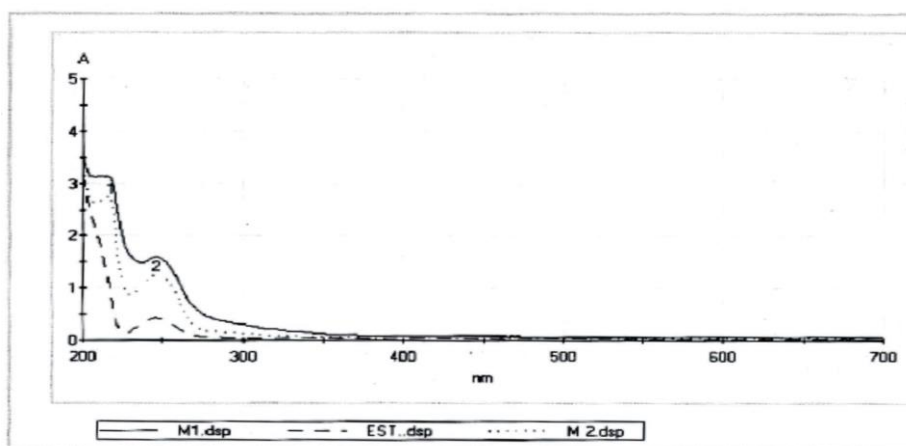


Figura 12. Espectrograma del bencil isotiocianato [Rodríguez, 2011]

USP (2007) indica que las pruebas de aptitud del sistema son pruebas que se usan para verificar que el sistema cromatográfico sea adecuado para el análisis que se pretende efectuar, estas pruebas se basan en que el equipo, los sistemas electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras analizadas constituyen un sistema integral que pueden ser evaluados como tal.

Los factores que afectan el comportamiento cromatográfico son: en la fase móvil (composición, fuerza iónica, temperatura y pH aparente); en la columna (velocidad de flujo, dimensiones, temperatura y presión); en la fase estacionaria (tipo de soporte cromatográfico, tamaño de partícula, tamaño de poro y área superficial específica). Para una fase móvil y una fase estacionaria determinadas, se puede especificar N (también referido como eficiencia), para asegurar que los compuestos que eluyen muy cerca entre si se disuelvan unos de otros, estableciendo el poder de resolución general del sistema y asegurar que el estándar interno se disuelva del fármaco. La eficiencia de la columna es, en parte, un reflejo de la agudeza del pico, que es también importante para la detección de trazas de componentes USP (2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

- Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias ubicado en La Estación Experimental el Mantaro de la Universidad Nacional del Centro del Perú.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Materia prima

- Se trabajó con hojas de mastuerzo (*Tropaeolum majus L.*), procedente del invernadero de la Estación Experimental El Mantaro de la Universidad Nacional del Centro del Perú.

3.2.2. Equipos e instrumentos para análisis

- Sistema de extracción por fluidos supercríticos Spe-ed SFE BASIC. Marca: Poly science
- Equipo de liofilizado Modelo: BK-FD10PT
- Equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) Marca: KNAUER, Modelo: SMARTLINE
- Balanza analítica Marca: Ohaus, Modelo: AR3130, Capacidad max:310.000g
- Cámara de UV Marca: CAMAG
- Agitador magnético Velp científica
- Licuadora Marca: Oster
- Potenciómetro: Marca Hanna, Modelo HI 2211

3.2.3. Materiales

- Tubos de ensayo con tapa
- Pipetas de 5, 10 mL
- Micro pipetas de 10 – 100 μ L y de 100 -1000 μ L
- Papel filtro Whatman # 40
- Probetas de 25, 50, 100 mL
- Pizeta
- Embudos de vidrio

- Vasos de precipitación 50, 100, 250, 1000 mL
- Viales para HPLC
- Jeringas de 5 mL
- Tips para micro pipetas 10 – 100 μ L y de 100 -1000 μ L
- Columnas Resprep C18
- Placas de silica gel para cromatografía de capa fina
- Cámara de vidrio para cromatografía
- Capilares de vidrio
- Fiolas de 10, 100, 1000 mL
- Gradillas de metal para tubos

3.2.4. Reactivos

- Hexano 98,5% de pureza
- Etanol 99,5% de pureza
- Patrón de bencil isotiocianato al 98% (adquiridos de sigma aldrich)
- Diclorometano grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Acetonitrilo grado HPLC
- Agua destilada
- Cloruro de sodio anhidro p.a
- Sulfato de sodio anhidro p.a
- Fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4
- Fosfato de potasio dibásico K_2HPO_4
- Nitrato de plata solido p.a
- Amoniacó concentrado
- Ácido nítrico 65% de pureza

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Acondicionamiento de la materia prima:

Las hojas de la planta de mastuerzo (*Tropaeolum majus L.*) procedentes del invernadero de la estación Experimental El Mantaro – UNCP, fueron recolectadas y acondicionadas de la siguiente manera: Se sacó el tallo restante de la hoja y se cortó en trozos pequeños.

Una vez acondicionado las hojas de mastuerzo se liofilizaron a las siguientes condiciones: Presión de 1 Pa, temperatura de congelación de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura final de $15\text{ }^{\circ}\text{C}$; hasta obtener una humedad final de 6 %, luego se realizó el triturado en una licuadora marca Oster obteniéndose un módulo de finura medio.

A continuación en la figura 13 se muestra el diagrama de flujo para el acondicionamiento de hojas de mastuerzo para la extracción de bencil isotiocianato por diclorometano y CO_2 supercrítico.

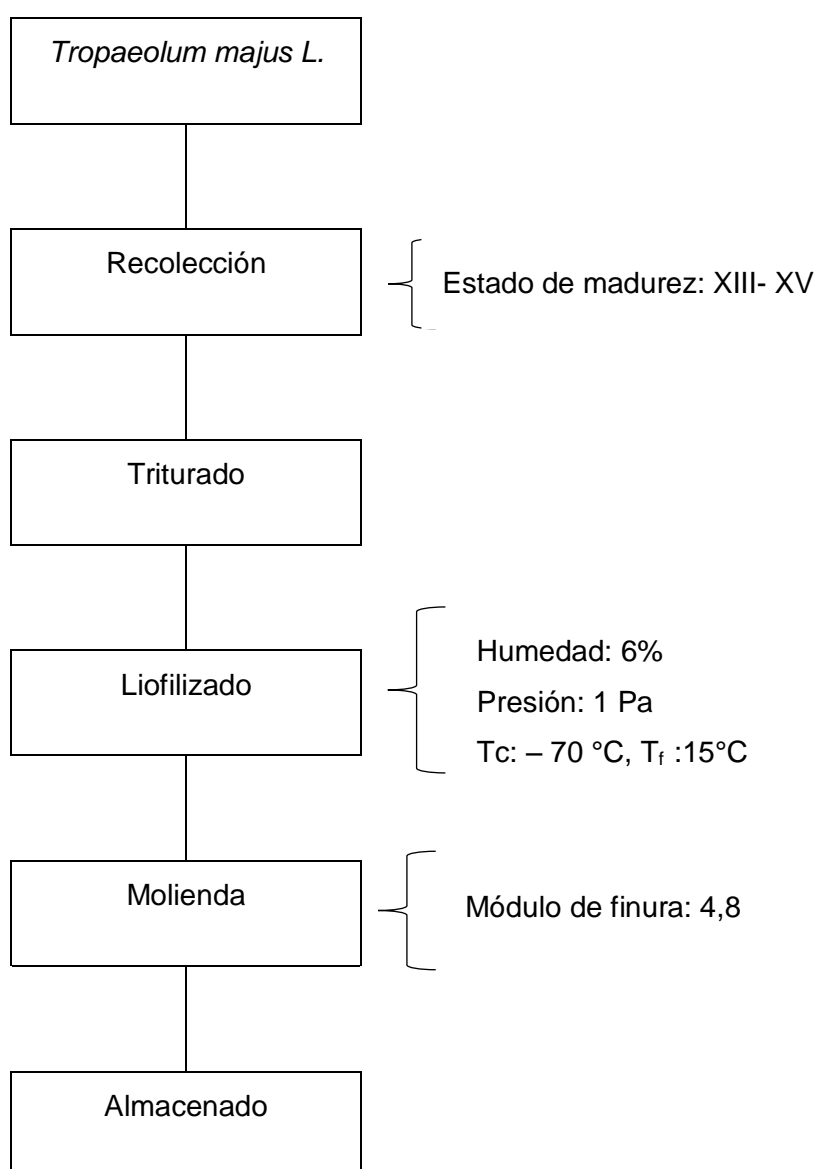


Figura 13. Diagrama de flujo del acondicionamiento de la materia prima para la extracción de bencil isotiocianato por diclorometano y dióxido de carbono supercrítico.

3.3.2. Extracción de bencil isotiocianato por diclorometano

Las hojas trituradas de mastuerzo se desengrasó por el método de maceración descrito por Campo *et al.* (2014) con algunas modificaciones: se usó 15 g de hojas triturada y se dejó en maceración con 100 mL de hexano por 3 días, transcurrido este tiempo se filtró el solvente y se dejó evaporar al aire libre el hexano restante de la muestra, y se obtuvo así una muestra desengrasada.

Se realizó la extracción de bencil isotiocianato por el método descrito por Rodríguez (2011) con algunas modificaciones: Se pesó 15 g de muestra desengrasada, se realizó una hidrólisis donde se utilizó 60 mL de buffer fosfato de potasio a pH 7 (0,4173 g de KH_2PO_4 y 0,3370 g de K_2HPO_4 en 100 mL de agua) hasta formar una pasta, se dejó en agitación a 200 RPM y a 30°C de temperatura por 24 horas, para luego extraer el componente deseado con diclorometano por un proceso de lixiviación utilizando 60 mL de diclorometano, dejando en agitación a 200 RPM y a 30°C de temperatura por dos días. Se realizó la saturación utilizando 10 g de cloruro de sodio y 10 g de sulfato de sodio, se filtró con papel Whatman Nro 40, y se obtuvo así el bencil isotiocianato disuelto en diclorometano, luego se dejó evaporar el solvente por 24 horas. Se realizó la purificación con columnas Resprep C 18, usando como activador etanol: agua (1:1) eliminando el color y quedando así un compuesto más clarificado y sin muchas impurezas, luego de obtener este extracto purificado se dejó evaporar el compuesto por 24 horas hasta obtener 5 mL aproximadamente de bencil isotiocianato diluido en diclorometano.

3.3.3. Extracción por dióxido de carbono supercríticos de bencil isotiocianato de hojas de mastuerzo

Se realizó la extracción de bencil isotiocianato de hojas de mastuerzo por dióxido de carbono por el método descrito por Barroso *et al.* (2016) con algunas modificaciones: Se utilizó de 15 g de hojas trituradas, se tomó en cuenta dos presiones de extracción por CO_2 supercrítico de 300 y 200 bar, y tres temperaturas de extracción por CO_2 supercrítico de 50, 60 y 70 °C por un tiempo de extracción de 30 minutos, y al finalizar la extracción la oleorresina se diluyó en 2 mL de metanol.

3.3.4. Identificación del bencil isotiocianato por cromatografía de capa fina

Para la identificación del bencil isotiocianato por diclorometano y por dióxido de carbono supercrítico se realizó la cromatografía de capa fina utilizando el método de Rodríguez (2011) con algunas modificaciones:

- Se usó el patrón de bencil isotiocianato al 98% y como fase móvil diclorometano: hexano en relación de 2 : 4.
- Para la identificación del bencil isotiocianato de la extracción por solvente se usó placas de 4 x 6 cm, cada placa fue dividida en dos puntos equidistantes, en un punto se sembró el estándar de bencil isotiocianato al 98% y el otro el bencil isotiocianato extraído.
- Para la identificación del bencil isotiocianato de la extracción por dióxido de carbono supercrítico se usó placas de 7 x 6 cm, siendo identificadas estas por la presión (200 y 300 bar) cada placa fue dividida en cuatro puntos equidistantes en un punto se sembró el BIT al 98% estándar y en los otros tres puntos el bencil isotiocianato extraído por las temperaturas de 50, 60 y 70 °C.
- Se dejó desarrollar la placa en la cámara de vidrio para cromatografía por 5 minutos aproximadamente, para la visualización del bencil isotiocianato se realizó en una cámara de luz UV a 254 nm observándose la mancha a la misma altura la del patrón y la del bencil isotiocianato extraído, para visualizar mejor se esprayó la placa con nitrato de plata amoniacal observándose así la aparición de manchas marrón oscuro, para luego esprayar con ácido nítrico al 0,5 N.

3.3.5. Cuantificación del bencil isotiocianato

Para la cuantificación de bencil isotiocianato se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); Marca: KNAUER, Modelo: SMARTLINE, compuesto por: Bomba analítica cuaternaria, Detector UV-VIS de onda variable, Automuestreador automatizado, Horno de columna. Se utilizó el Software ChromGATE.

Se usó el método establecido por Rodríguez (2011) con algunas modificaciones:

Fase móvil	:	Mezcla filtrada y desgasificada de Acetonitrilo: Metanol (50:50)
Detector	:	UV, 246 nm.
Columna	:	Knauer Eurospher II L7 (C8) 50 mm x 4,6 mm x 5 um
Velocidad de flujo	:	1 mL/minuto.
Volumen de inyección	:	20 µL.
Temperatura	:	30 °C
Tiempo de retención	:	1,36 min aproximadamente.
Tiempo de corrida	:	5,00 min aproximadamente.

Aptitud del Sistema

Eficiencia de columna	:	No menos de 500 platos teóricos
Factor de asimetría	:	No más de 2,0
Desviación estándar relativa	:	No más de 2,0% entre réplicas de inyección

Rodríguez (2011) realizó la detección UV por medio de un espectrofotómetro para la identificación de bencil isotiocianato a partir de semillas de papaya, determinando como óptimo 246 nm, por lo cual para la identificación de bencil isotiocianato a partir de hojas de mastuerzo se utilizó como detector UV a 246 nm, ya que el equipo de marca KNAUER, modelo SMARTLINE, solo presenta detector UV-VIS de onda variable, y para obtener el espectro se necesitaría un detector DAD. Se validó el método de cuantificación de bencil isotiocianato por HPLC determinado por Rodríguez (2011) con lo mencionado por la USP (2007) donde indica que para determinar si se cumplen los requisitos de precisión se calcula la desviación estándar relativa, %RSD con las inyecciones repetidas de una preparación estándar u otras soluciones estándar, si el requisito es 2,0% o menos se usan los datos de cinco inyecciones repetidas del analito y se usan los datos de seis inyecciones repetidas si el requisito de desviación estándar es más de 2,0%.

Se realizó la inyección de 6 veces el mismo estándar para poder determinar el %RSD lo cual resulto 1,18%, verificando así los requisitos de precisión del método de cuantificación de bencil isotiocianato por HPLC determinado Rodriguez (2011), lo cual se puede observar en la tabla 7.

Tabla 7. Áreas de la solución estándar de seis inyecciones repetidas para determinar el %RSD.

Nº	BITC	
	Lectura	T_R (min)
1	1.37	18994552.00
2	1.38	18872011.00
3	1.35	19378002.00
4	1.35	19395998.00
5	1.37	19376054.00
6	1.37	19343017.00
PROM	1.36	19212054.25
RSD %	1.02%	1.18%

Para las corridas de HPLC se utilizó el estándar a una concentración de 53,9 ug/mL, para la preparación del estándar se diluyó 1 mL de estándar de Bencil Isotiocianato al 98% y se enrasó a 200 mL de metanol grado HPLC, luego se diluyo 11 mL de esta solución y se enraso con metanol a 1000 mL. Las muestras previamente diluidas en 2 mL de metanol grado HPLC, se diluyo 1 mL de esta solución y se enrasó a 10mL de metanol, para poder realizar la cuantificación en el equipo HPLC.

A continuación en la figura 14 se muestra el diagrama de flujo para la extracción por diclorometano de bencil isotiocianato a partir de hojas de mastuerzo.

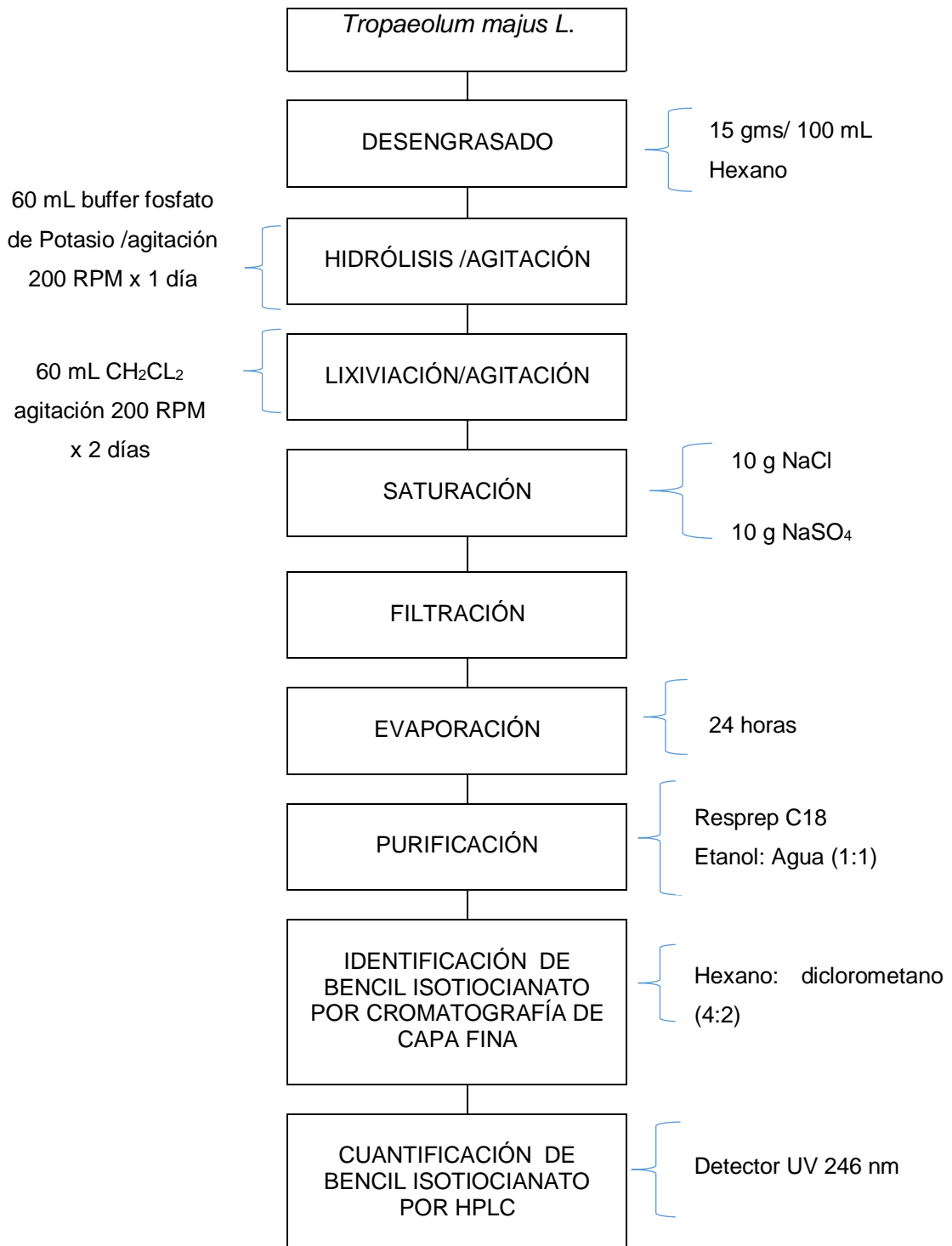


Figura 14. Diagrama de flujo para la extracción, identificación y cuantificación del bencil isotiocianato extraído a partir de hojas de mastuerzo por diclorometano.

A continuación en la figura 15 se muestra el diagrama de flujo para la extracción por CO₂ supercrítico de bencil isotiocianato a partir de hojas de mastuerzo.

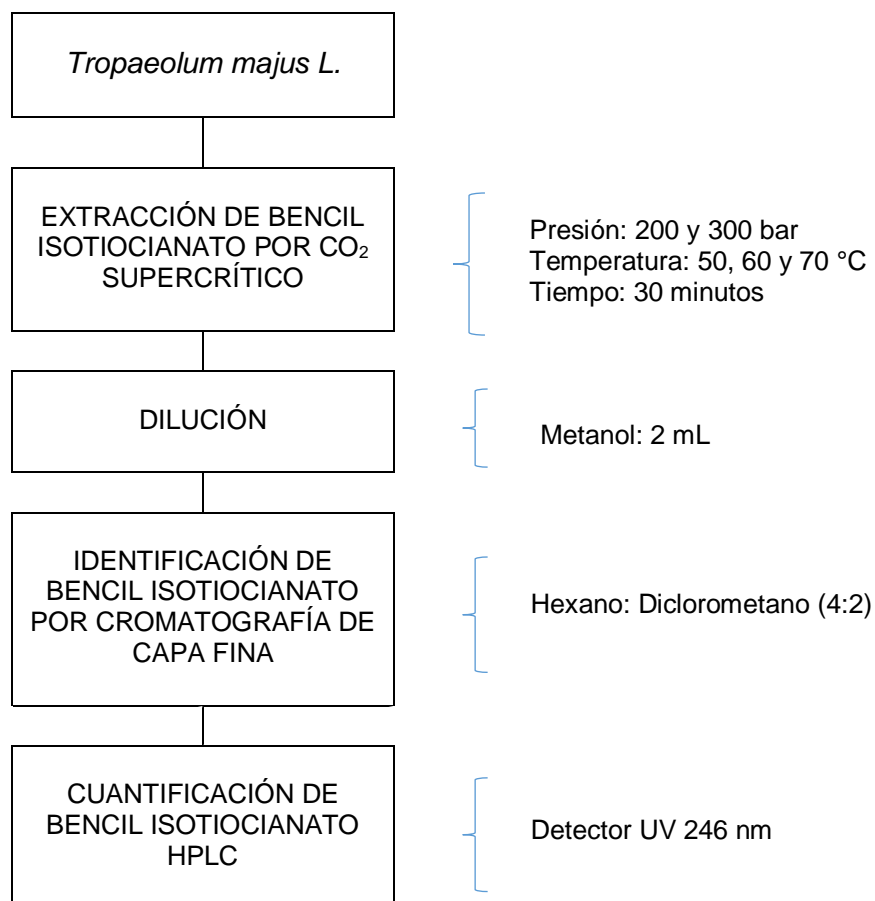


Figura 15. Diagrama de flujo para la extracción, identificación y cuantificación del bencil isotiocianato extraído a partir de hojas de mastuerzo por CO₂ supercrítico

3.3.6. Diseño experimental estadístico

Para la cuantificación del contenido del bencil isotiocianato extraído a partir del mastuerzo se probó dos variables operacionales como la presión en dos niveles (200 y 300 bar) y la temperatura a tres niveles (50, 60 y 70 °C) de extracción con CO₂ supercrítico, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2 x 3 y un análisis de varianza ANOVA con un $\alpha = 0,05$ (para examinar la variabilidad, y comprobar si las medias difieren significativamente) y prueba de comparación múltiple de TUKEY (si existiera diferencia significativa entre cada combinación), para determinar

cómo los seis tratamientos afectan a la cantidad de bencil isotiocianato extraído por CO₂ supercrítico; para el análisis estadístico se usó el programa estadístico SPSS statistics 21.

Variables independientes:

- Presión de extracción por CO₂ supercrítico: 200 y 300 bar
- Temperatura de extracción por CO₂ supercrítico: 50, 60 y 70°C

Variable dependiente:

- Contenido de bencil isotiocianato (mg/100g de muestra seca)

Variables intervinientes:

- Flujo de CO₂: 3 g/min
- Tiempo: 30 min
- Índice de finura: medio
- Humedad de la muestra: 6% ± 0,07
- Cantidad de metanol: 2mL

3.3.6.1. Diseño aditivo lineal

$$Y_{ij} = u + P_i + T_j + (PT)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ij} = Concentración de bencil isotiocianato

u = Efecto de la media general

P_i = Efecto de la presión de extracción por CO₂, $i=1,2$.

T_j = Efecto de la temperatura de extracción por CO₂, $j=1, 2, 3$

$(PT)_{ij}$ = Efecto de la interacción de P_i y T_j

ε_{ijk} = efecto de las repeticiones, $k= 1$ a 2

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Características de las hojas de *Tropaeolum majus L.* acondicionadas para la extracción de bencil isotiocianato

La tabla 8 muestra las características con la cual las hojas de mastuerzo fueron acondicionadas para la extracción de bencil isotiocianato

Tabla 8. Características de las hojas de mastuerzo

Características	Hojas
Humedad inicial (%)	98%
Humedad de trabajo (%)	6%
Índice de finura	4,8
Estado de madurez	XIII-XV

Para la extracción de bencil isotiocianato se utilizó las hojas de mastuerzo con humedad inicial de 98 % y estado de madurez de XIII - XV ya que Souto *et al.* (2012) menciona que las hojas en esta etapa de maduración tienen un buen tamaño y mantienen todos sus componentes con mayor potencial. Shi (2016) menciona que la eliminación del exceso de agua libera los poros de las interpartículas y, por lo tanto, aumenta la intensidad del transporte de masa durante la extracción. Al respecto Ahluwalia (2013) menciona que la presencia de agua en el tejido vegetal interfiere con la eficacia de la extracción por el CO₂, ya que impide la difusión del CO₂ en la matriz sólida, es por eso que existen diferentes técnicas tales como: secado en horno, liofilización o utilización de adsorbentes para eliminar agua de la muestra. Afirma también que el rendimiento de extracción de las muestras liofilizadas es mayor que el de las muestras secadas al horno y que el efecto del pretratamiento en el triturado de la muestra produce un pequeño aumento en el componente extraído. Esto se observó cuando se realizó las pruebas preliminares donde se extrajo el bencil isotiocianato por diclorometano y por CO₂ supercrítico utilizando hojas secadas al medio ambiente (17°C por 10 días) donde se identificó el compuesto por cromatografía de capa fina observándose una mancha tenue a la altura del patrón lo cual indicaba la presencia de bencil isotiocianato; y en un horno de secado (40°C por 24

horas) donde no se observó el bencil isotiocianato ya que no apreció la mancha en la cromatografía de capa fina, lo cual se determinó que la alta temperatura degradó el compuesto. Es por ello que para llegar a la humedad de trabajo se liofilizó las hojas llegando a una humedad de 6 %, previamente antes del liofilizado se trituró las hojas de mastuerzo. Ahluwalia (2013) menciona que el rendimiento de extracción aumenta cuando el tamaño de partícula disminuye, ya que la molienda antes de la extracción no sólo incrementa el área interfacial, sino que también libera solutos destruyendo las estructuras internas de las partículas, lo que resulta en una tasa de extracción más alta, las partículas muy finas pueden generar sobrepresurización en el sistema, impidiendo el proceso extractivo. Es por ello que se utilizó un índice de finura de 4,8. En consecuencia se utilizó un adecuado tratamiento ya sea el triturado, el liofilizado, el índice de finura, para ser utilizado en la extracción de bencil isotiocianato.

4.2. Rendimiento de oleorresina obtenida en la extracción por CO₂ supercrítico

En la tabla 9 se muestra el rendimiento de oleorresina expresada en porcentaje obtenida a diferentes condiciones de temperatura y presión de la extracción de bencil isotiocianato por CO₂ supercrítico a partir de hojas de mastuerzo, así mismo se observa que el rango del rendimiento va de 14,47 % hasta 35,67%.

Tabla 9. Rendimiento de oleorresina obtenida de la extracción de bencil isotiocianato por CO₂ supercrítico


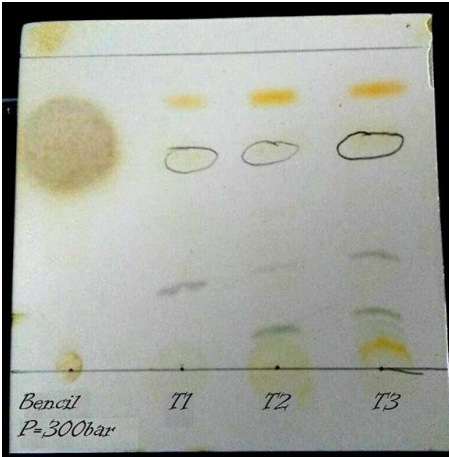
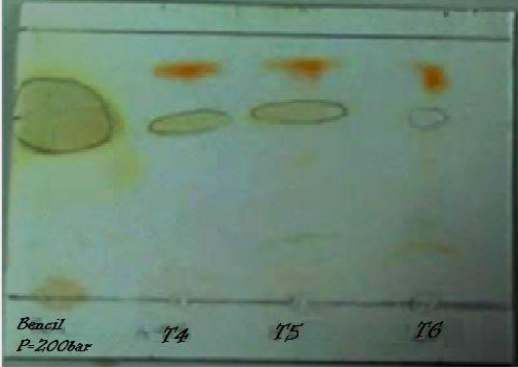
Tratamiento	Rendimiento %
T1 (P=300 ^ T=50)	21,67
T2 (P=300 ^ T=60)	35,67
T3 (P=300 ^ T=70)	31,20
T4 (P=200 ^ T=50)	14,47
T5 (P=200 ^ T=60)	23,00
T6 (P=200 ^ T=70)	20,20

Al comparar el rendimiento con solo las temperaturas y una misma presión se puede observar que en la presión de 300 bar el que tuvo mejor rendimiento fue de T₂ (300 bar y 60 °C) sin embargo una variación de temperatura de 10 °C de más hizo que el rendimiento sea menor, y si la variación es de 10°C menos hizo que el rendimiento sea mucho menor. Al comparar solo las temperaturas de la presión de 200 bar se puede observar que el mejor rendimiento se obtuvo en T₅ (200 bar y 60 °C) lo cual una variación de 10 °C de más hizo que se obtenga menos rendimiento pero una variación de 10°C menos hizo que el rendimiento bajara mucho más. Barroso *et al.* (2016) menciona que todos los extractos extraídos por CO₂ supercrítico fueron homogéneos en su composición, indicando también que la eficiencia aumentaba con el aumento de la presión a temperatura constante, y que el aumento de temperatura causa la disminución en la eficiencia del proceso. Esto se puede observar en los tratamientos ya que a una misma temperatura y el aumento de la presión se apreció que el rendimiento aumenta, y también si se eleva la temperatura a más de 60°C el rendimiento disminuye, al respecto Ahluwalia (2013) menciona que se obtiene una mayor recuperación de las fracciones volátiles y una menor recuperación de las fracciones no volátiles con una presión creciente en el proceso.

4.3. Identificación por cromatografía de capa fina del bencil isotiocianato obtenido a partir de hojas de *Tropaeolum majus L.*

En la tabla 10 se muestra las fotografías de las placas cromatográficas de capa fina del bencil isotiocianato obtenido a partir de hojas de *Tropaeolum majus L.* por diclorometano y CO₂ supercrítico, se observa también el factor R_f (relación de frentes) calculado.

Tabla 10. Cromatografía de capa fina del bencil isotiocianato obtenido a partir de hojas de mastuerzo por diclorometano y CO₂ supercrítico

Fase móvil: Hexano: Diclorometano (4:2)	Placa cromatográfica	Rf
Extracción de bencil isotiocianato por diclorometano		Rf=0,53
T1 (P=300 ^ T=50) T2 (P=300 ^ T=60) T3 (P=300 ^ T=70)		Rf _{T1} =0,59 Rf _{T2} =0,60 Rf _{T3} =0,62
T4 (P=200 ^ T=50) T5 (P=200 ^ T=60) T6 (P=200 ^ T=70)		Rf _{T4} =0,6 Rf _{T5} =0,6 Rf _{T6} =0,64

Como se observa en la placa cromatográfica de la extracción de bencil isotiocianato por diclorometano se puede identificar que el bencil isotiocianato extraído el mismo R_f que el patrón de bencil isotiocianato teniendo ambos como $R_f = 0,53$, en la extracción por CO_2 supercrítico a una presión de 300 bar y temperatura de 50, 60 y 70 °C se observa que tienen como R_f 0,59; 0,6 y 0,62 respectivamente y en la extracción a una presión de 200 bar y de temperatura de 50, 60 y 70 °C se observa que tienen como R_f 0,6; 0,6 y 0,64 respectivamente.

Csáky y Martínez (2012) menciona que la cromatografía de capa fina comprende dos fases: la fase estacionaria (adsorbente) que se encuentra depositada sobre la placa de vidrio, formando una capa fina de espesor uniforme (0,1 – 0,2 mm); y la fase móvil (eluyente) que asciende a lo largo de la placa que contiene la sustancia a analizar, por medio de capilaridad, desplazando los componentes de la mezcla a diferentes velocidades estimulando su separación. El R_f es la relación entre las distancias recorridas por el compuesto a analizar y por el disolvente desde el origen del cromatograma, este tiene un valor constante para cada compuesto en diferentes condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc). Es recomendable elegir un disolvente en el que los componentes de la mezcla presenten un R_f medio en torno a 0,3 – 0,5. Si un componente eluye a un R_f inferior a 0,2 o superior a 0,7, puede ocurrir que lo que parece un compuesto único sea en realidad una mezcla de varios, en estos casos se debe cambiar otro disolvente más o menos polar, respectivamente. Las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos a la luz ultravioleta (254 nm), en caso que no absorban la luz ultravioleta, la visualización del cromatograma requiere utilizar un agente revelador, ya que este reacciona con los productos absorbidos proporcionando compuestos coloreados.

Rodríguez (2011) realizó la extracción del bencil isotiocianato a partir de semillas de papaya de monte (*carica pubescens*) donde determinó como mejor eluyente la solución de hexano: diclorometano en relación 4:2, realizó la visualización del bencil isotiocianato en una cámara de luz UV a 254 nm observándose la mancha y también usó como revelador el nitrato de plata amoniacal hasta la aparición de manchas marrón oscuro, luego esprayó con ácido nítrico al 0,5 N.

En consecuencia los datos obtenidos del R_f están dentro de los estándares que menciona Csáky y Martínez (2012) ya que no se obtuvo un R_f superior a 0,7. Se tomó como referencia el método de Rodríguez (2011) donde se utilizó como eluyente el

hexano: diclorometano (4:2) y se reveló con nitrato de plata amoniacal, donde se apreció que la mancha de color pardo del estándar y del compuesto extraído estaban a la misma altura, entonces se puede afirmar que el compuesto extraído y visualizado en la placa cromatográfica fue el bencil isotiocianato (BIT) y que el eluyente utilizado fue el correcto.

4.4. Identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) del bencil isotiocianato obtenido a partir de hojas de *Tropaeolum majus L.* por CO₂ supercrítico y diclorometano.

En la figura 16 se muestra el perfil cromatográfico del estándar del bencil isotiocianato el cual nos muestra el pico cromatográfico bien definido y resuelto a un tiempo de retención de 1,367 min que corresponde al bencil isotiocianato.

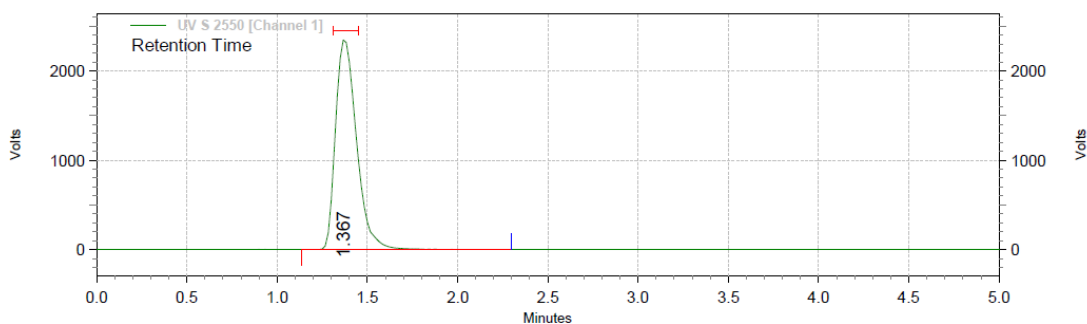


Figura 16. Cromatograma del estándar de bencil isotiocianato

En las figuras 17 y 18 se muestra el perfil cromatográfico de los seis tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5 y T6) aplicados para la extracción de bencil isotiocianato del *Tropaeolum majus L.* por CO₂ supercrítico donde los picos cromatográficos están bien definidos y resueltos en un tiempo de 1,367 min. Se puede observar que los picos cromatográficos al ser comparados con el estándar aparecen en un tiempo de retención aproximado que es de 1,367 minutos lo que indica la presencia del bencil isotiocianato en las oleorresinas obtenidas al extraer por diclorometano y CO₂ supercrítico.

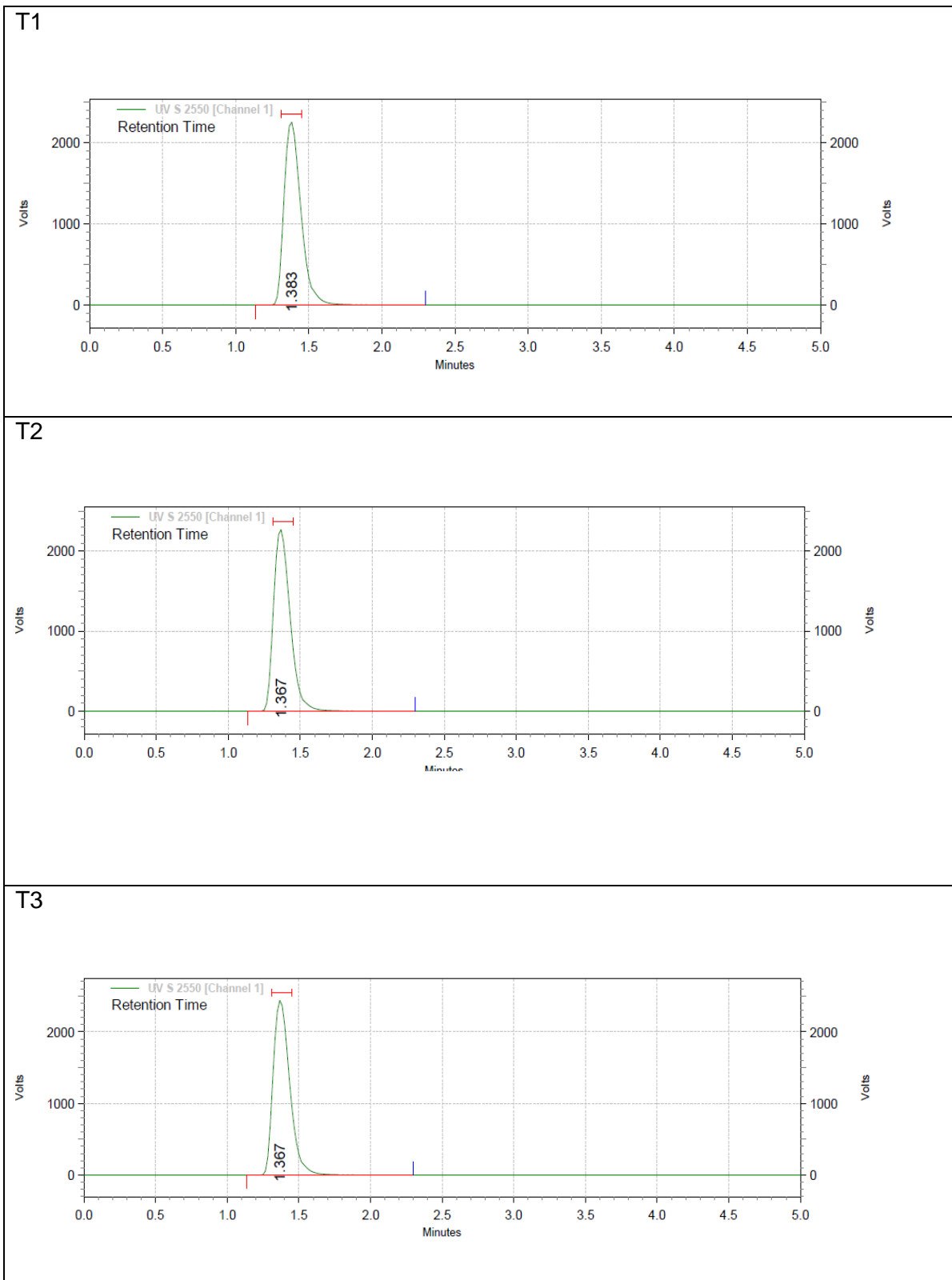
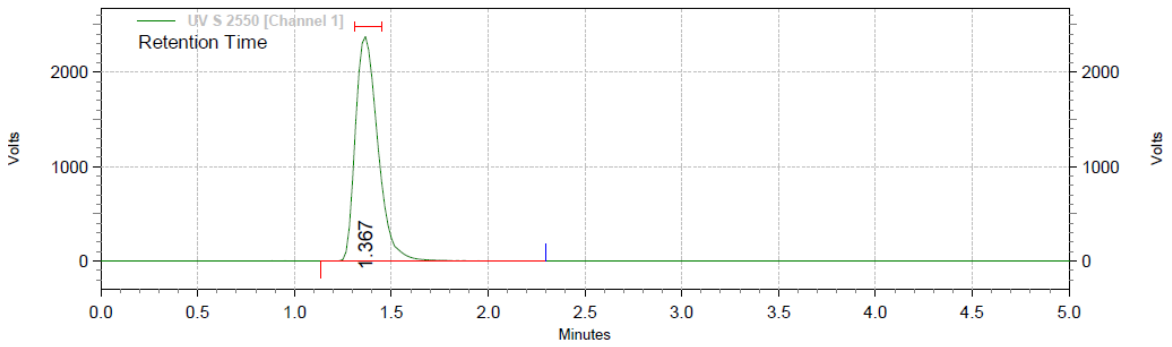
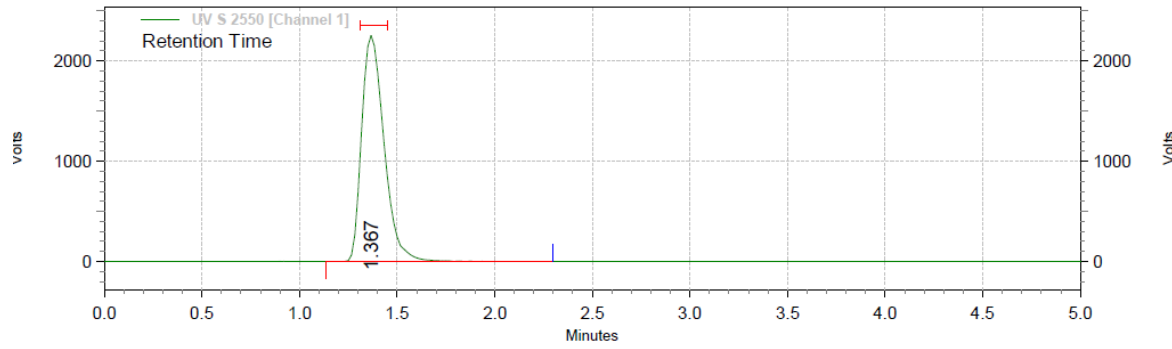


Figura 17. Cromatogramas de los tratamientos T1 ($P = 300 \text{ bar} \wedge T = 50^\circ\text{C}$), T2 ($P = 300 \text{ bar} \wedge T = 60^\circ\text{C}$) y T3 ($P = 300 \text{ bar} \wedge T = 70^\circ\text{C}$)

T4



T5



T6

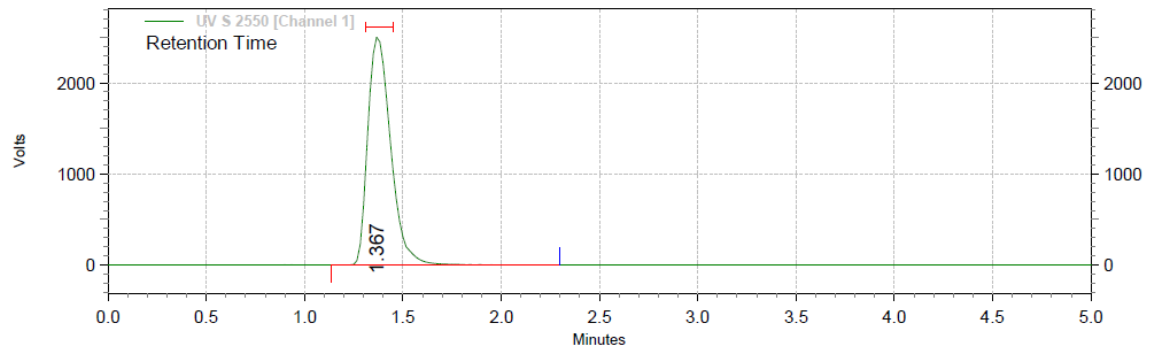


Figura 18. Cromatogramas de los tratamientos T4 (P = 200 bar ^ T=50 °C), T5 (P = 200 bar ^ T = 60 °C) y T6 (P = 200 bar ^ T = 70°C)

Los tiempos de retención son semejantes a los determinados por Rodriguez (2011) donde reporta la cuantificación de bencil isotiocianato por HPLC a partir de semillas de Papaya de Monte (*Carica pubescens*), reportando así el tiempo de retención entre 1,72 min y 1,75 min; se obtuvo un tiempo de retención de 1,367 aproximadamente en todos los tratamientos extraídos por CO₂ supercrítico coincidiendo así con el tiempo de retención del estándar de bencil isotiocianato (figura 15) lo cual confirma el compuesto deseado.

En la figura 19 se muestra los perfiles cromatográficos de la extracción de bencil isotiocianato por diclorometano

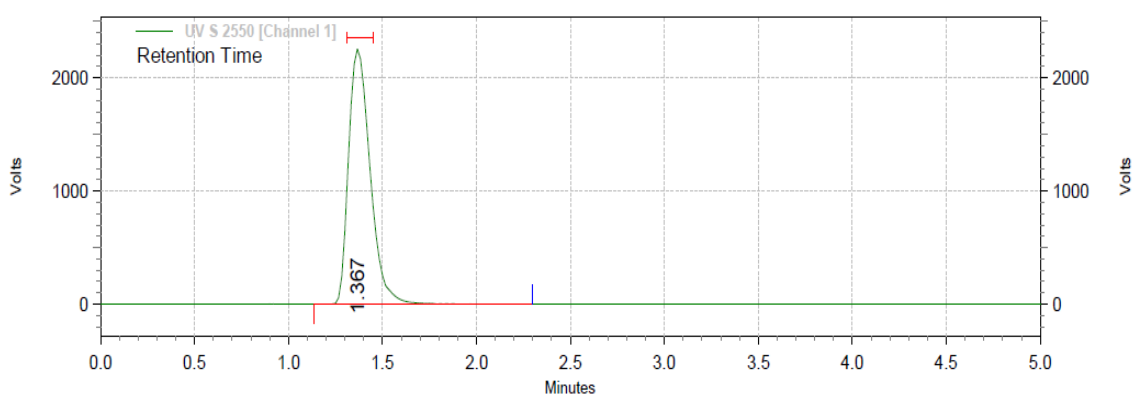


Figura 19. Cromatograma de la extracción de bencil isotiocianato por diclorometano

Los tiempos de retención obtenidos en la extracción de bencil isotiocianato por diclorometano son semejantes a los determinados por Rodriguez (2011) donde reporta el tiempo de retención entre 1,72 min y 1,75 min; se obtuvo un tiempo de retención de 1,367 min aproximadamente en la extracción de bencil isotiocianato por diclorometano coincidiendo así con el tiempo de retención del estándar de bencil isotiocianato (figura 15) lo cual confirma el compuesto deseado.

La tabla 11 muestra los seis tratamientos que se realizó para la extracción de bencil isotiocianato a partir de hojas de mastuerzo por CO₂ supercrítico, se observa las medias de los seis tratamientos realizado al conjugar dos presiones (200 y 300 bar) y tres temperaturas (50, 60 y 70 °C), se realizó cada tratamiento con dos repeticiones, en lo cual se puede observar la desviación estándar. También se puede apreciar que el rango de la cantidad de bencil isotiocianato extraído por CO₂ supercrítico va desde 100,963 ± 0,02 mg de BIT/100 g de muestra seca hasta 113,615 ± 0,03 mg de BIT/100 g de muestra seca.

Tabla 11. Cantidad de bencil isotiocianato extraído con CO₂ supercrítico a partir de hojas de mastuerzo

Tratamiento	BIT (mg/ 100 gms)	σ
T1 (P=300 ^ T=50)	101,684	$\pm 0,11$
T2 (P=300 ^ T=60)	103,644	$\pm 2,51$
T3 (P=300 ^ T=70)	109,904	$\pm 0,71$
T4 (P=200 ^ T=50)	107,748	$\pm 0,54$
T5 (P=200 ^ T=60)	100,963	$\pm 0,02$
T6 (P=200 ^ T=70)	113,615	$\pm 0,03$

Al comparar solo la presión de 300 bar se puede observar que la cantidad de bencil isotiocianato aumenta conforme aumenta la temperatura que va desde 101,684 a 109,905 mg de BIT por 100g de muestra seca, esto no sucede con la presión de 200 bar ya que a temperatura de 70°C presenta una mayor cantidad de bencil isotiocianato, con respecto a las temperaturas de 50 y 60°C, al bajar la temperatura en 10 °C el BIT disminuye notablemente y al disminuir en 20°C el bencil isotiocianato disminuye también pero presenta mayor cantidad que el de 60°C. La mayor cantidad de bencil isotiocianato se obtuvo en el tratamiento T₆ (P = 200 bar ^ T = 70 °C) con 113,615 mg de BIT por 100g de muestra seca, seguido del T₃ (P = 300 bar ^ T = 70 °C) con 109,904 mg de BIT por 100g de muestra seca, ambos presentan la misma temperatura con la diferencia que al disminuir la presión se obtiene mayor cantidad de bencil isotiocianato.

Barroso *et al.* (2016) realizó la evaluación de la eficiencia y composición del aceite extraído de semillas de *Carica papaya L* con dióxido de carbono supercrítico, llegando a la conclusión que el mejor tratamiento con respecto a la cantidad de bencil isotiocianato se encontró a 80 °C y 200 bar.

Ahluwalia (2013) menciona que la composición del extracto se puede controlar mediante la regulación de la presión; con el aumento de temperatura hay mejoras en la transferencia de masa, ya que provoca el aumento de la presión de vapor de los compuestos extraíbles que es más significativo que la reducción en la densidad del disolvente, aumentando por consiguiente el rendimiento de extracción global. Al respecto Ruiz (1996) menciona que el incremento de la presión a temperatura constante produce un incremento en la solubilidad pero disminuye la selectividad del compuesto de interés, lo cual se evidencia en los tratamientos.

En la tabla 12 se muestra el análisis estadístico que se realizó para poder determinar si existe diferencia significativa o no en los seis tratamientos realizados para la extracción de bencil isotiocianato a partir de las hojas de mastuerzo, extraídos por CO₂ supercrítico. Para el análisis estadístico se usó el programa estadístico SPSS statistic 21.

Tabla 12. Análisis de varianza ANOVA de la cantidad de bencil isotiocianato obtenido en los seis tratamientos realizados con CO₂ supercrítico en hojas de mastuerzo

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	250,876	5	50,175	42,056	,000
Intra-grupos	7,158	6	1,193		
Total	258,035	11			

En la tabla 12 se observa que en el análisis de varianza la significancia es menor a 0,05 indicando que existe diferencia significativa en las variables dependientes (cantidad de bencil isotiocianato) con los tratamientos realizados a diferentes temperaturas y presiones, los cuales influyen cuando interactúan entre sí.

En la figura 20 se muestra la prueba de comparaciones múltiples de TUKEY, ya que al confirmar que si existe diferencia significativa entre cada tratamiento se realizó esta prueba estadística para comparar las medias de los tratamientos, formándose así cuatro subgrupos.

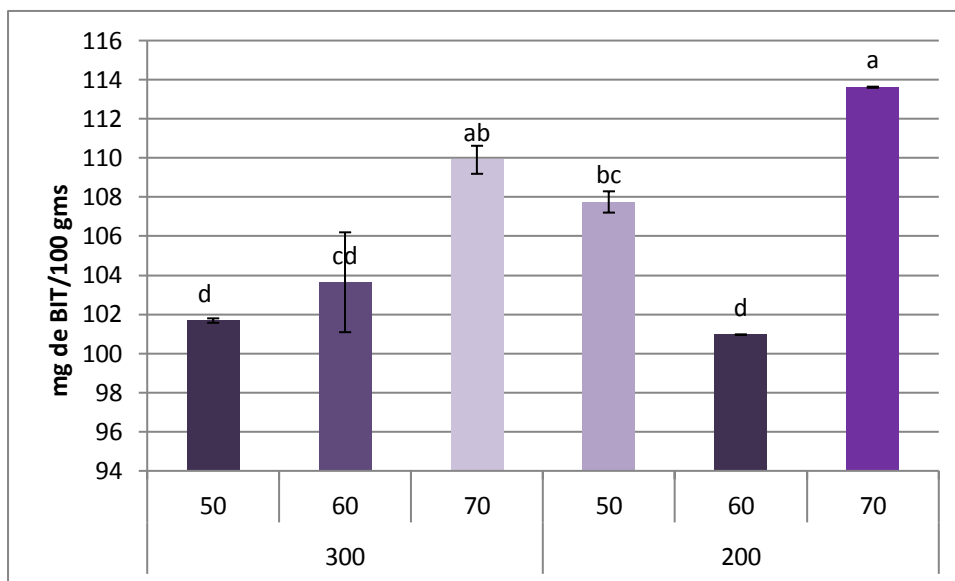


Figura 20. Prueba de comparación de medias por TUKEY

En la figura 20 se puede observar que los tratamientos T1 ($P = 300 \text{ bar} \wedge T = 50^\circ\text{C}$) y T5 ($P = 200 \text{ bar} \wedge T = 60^\circ\text{C}$) no presentan diferencia estadísticamente significativa para el rendimiento del bencil isotiocianato presente en las hojas de *Tropaeolum majus L.* indicándonos también que tienen el más bajo rendimiento de los tratamientos realizados por ello se le asignó el subgrupo d, también se observa que los tratamientos T1 y T5 presentan diferencia significativa frente a los tratamientos T3, T4 y T6. Los tratamientos T2 ($P = 300 \text{ bar} \wedge T = 60^\circ\text{C}$) y T4 ($P = 200 \text{ bar} \wedge T = 60^\circ\text{C}$) no presentan diferencia significativa con respecto al rendimiento de bencil isotiocianato; se le asignó el grupo c ; se observa también que el tratamiento T2 no presenta diferencia significativa con los tratamiento T1 y T5, pero si es estadísticamente significativo con los tratamientos T3 y T6. Los tratamientos T4 ($P = 200 \text{ bar} \wedge T = 60^\circ\text{C}$) y T3 ($P = 300 \text{ bar} \wedge T = 70^\circ\text{C}$) no presentan diferencia estadísticamente significativa para el rendimiento del bencil isotiocianato presente en las hojas de *Tropaeolum majus L.* se le asignó la letra b, ya que presenta un rendimiento intermedio entre los demás tratamientos, se observa también

que el T4 no presenta diferencia significativa con el tratamiento T2, pero si es estadísticamente significativo con los tratamientos T1, T5 y T6.

Por ultimo en el subgrupo de los tratamientos T3 (P = 300 bar ^ T=70°C) y T6 (P = 200 bar ^ T=70°C) son los tratamientos que presentan mayor cantidad de bencil isotiocianato que son de 109,904 mg de BIT/100gms y 113,615 mg de BIT/100gms respectivamente, estos tratamientos no presentan diferencia estadísticamente significativa con respecto al rendimiento del bencil isotiocianato, se observa también que el T3 presenta diferencia significativa con los tratamientos T1, T2 y T5; también se observa que el T6 presenta diferencia estadísticamente significativa con los tratamientos T1, T2, T4 y T5. Entonces podemos afirmar que estadísticamente el mejor tratamiento aplicado para la extracción de bencil isotiocianato por CO₂ supercrítico es el T6 que se realizó a las condiciones de: presión (200 bar) y temperatura (70°C); seguido por el T3 que se realizó con las siguientes condiciones: presión (300 bar) y temperatura (70°C).

En la tabla 13 se muestra la cantidad de bencil isotiocianato extraído por los diferentes métodos de extracción como con diclorometano y CO₂ supercrítico a partir de hojas de mastuerzo, expresadas en mg/100 g de muestra seca.

Tabla 13. Cantidad de bencil isotiocianato obtenidas por extracción con diclorometano y con CO₂ supercrítico

Tipo de extracción	N	mg de BIT /100g ms	σ	Error típico. de la media
diclorometano	2	252,530	$\pm 0,11$,08000
CO ₂ supercrítico	2	113,615	$\pm 0,02$,01500

Se realizó la prueba estadística de t para muestras independientes para la comparación de medias de las cantidades de bencil isotiocianato extraído por los solvente y CO₂ supercrítico. En vista de ello, se evalúa el estadístico t de 1706,696 que con gl = 1,070, ofrece un p-valor menor al 5% de significancia con lo que se rechazó la hipótesis nula, aceptando que existe diferencias significativas entre las medias del tipo de extracción de

bencil isotiocianato por diclorometano y CO₂ supercrítico. Así mismo se observa que del total de BIT extraído por diclorometano es de 252,53 ± 0,11 mg de BIT/100 gms siendo mayor frente al total de BIT extraído por CO₂ 113,615 ± 0,21 mg BIT/100 gms, notamos además que existe una diferencia de 138,915 mg BIT/100 gms a favor de la extracción por diclorometano.

Barroso *et al.* (2016) realizó la extracción de bencil isotiocianato por CO₂ supercrítico y también por solvente donde menciona que las concentraciones de bencil isotiocianato de los extractos fueron similares. Sin embargo los extractos extraídos por CO₂ supercrítico presentan una baja cantidad del componente bioactivo. En consecuencia los resultados obtenidos concuerdan con los resultados de Barroso *et al.* (2016).

Azmir *et al.* (2013) señala que la selectividad y la toxicidad son aspectos fundamentales a considerar al elegir un disolvente, particularmente en el contexto de las tendencias en procesos innovadores de extracción de productos naturales. Los mayores desafíos de la extracción convencional son el tiempo de extracción más largo, el requerimiento de disolvente costoso y de alta pureza, la evaporación de la enorme cantidad de disolvente, la baja selectividad de extracción y la descomposición térmica de compuestos termolábiles (Luque de Castro *et al.*, 1998). Las técnicas no convencionales en algunos casos denominadas como innovadoras o emergentes, corresponden a las tecnologías extractivas sustentables, desarrolladas y promovidas en el marco de la química verde como es el caso de fluidos supercríticos. Los métodos no convencionales, son más respetuosos con el medio ambiente debido a la disminución en el uso de productos químicos sintéticos y orgánicos, redujeron el tiempo de operación y mejoraron el rendimiento y la calidad del extracto. Tornero (2012) hace una comparación entre las dos técnicas de extracción donde resalta que la extracción tradicional se usa disolventes dañinos para el medio ambiente presentando también dificultad en purificar y recuperar el disolvente, caso contrario pasa por la extracción con CO₂ supercrítico ya que el CO₂ es amigables con el medio ambiente y también es fácil de purificar, produciendo así extractos puros de alto valor comercial. Si bien es cierto en la extracción por solvente se obtiene mayor cantidad de bencil isotiocianato en comparación a la extracción por CO₂ supercrítico, con lo mencionado anteriormente si el objetivo es obtener mayor rendimiento en la extracción de bencil isotiocianato entonces se usaría el método de extracción por diclorometano, pero si se quiere enfocar a una extracción de compuestos bioactivos que sean purificados y libres de contaminantes sería el método de extracción por CO₂ - supercrítico, ya que se obtiene un producto purificado, no tóxico, libre de solventes

orgánicos que puedan ser contaminantes, en este caso podría contener rastros de hexano y diclorometano, así también se evitaría el requerimiento de disolventes costosos y la evaporación de la enorme cantidad de disolvente. Azmir *et al.* (2013) señala que la extracción por CO₂ supercrítico es una tecnología no convencional que está siendo muy usada para la extracción de compuestos bioactivos a partir de plantas ya que el CO₂ es respetuoso con el medio ambiente debido a la disminución en el uso de productos químicos sintéticos y orgánicos, reducción de tiempo de operación y mejoramiento en la calidad del extracto.

Azmir *et al.* (2013) menciona que es necesario construir un enfoque estándar e integrado para obtener compuestos que lleven beneficios para la salud humana. La técnica del fluido supercrítico ha atraído un amplio interés científico y se ha utilizado con éxito en aplicaciones ambientales, farmacéuticas y análisis de alimentos.

V. CONCLUSIONES

- El mayor rendimiento de oleorresina de hojas de mastuerzo extraído con CO₂ supercrítico fue de 35,67 % del tratamiento T₂ el cual se trabajó a las condiciones de Presión = 300 bar y Temperatura = 60 °C.
- La mayor cantidad de bencil isotiocianato extraído con CO₂ supercrítico a partir de hojas de mastuerzo fue de 113,615 ± 0,03 mg de BIT/100 gms del tratamiento T₆ el cual se trabajó a las condiciones de: Presión = 200 bar y Temperatura = 70 °C.
- La cantidad de bencil isotiocianato extraído por diclorometano a partir de hojas de mastuerzo fue de 252.53 ± 0.11 mg de bencil isotiocianato por cada 100 gms.
- La cantidad bencil isotiocianato extraído por diclorometano es mayor a la cantidad extraída por CO₂ supercrítico.

VI. RECOMENDACIONES

- Continuar con las investigaciones, en la extracción con CO₂ supercrítico, empleando nuevos parámetros de presión y temperatura, haciendo uso de modificadores químicos.
- Para trabajos posteriores se recomienda tomar esta investigación como referencia para la realización de nuevas propuestas de trabajo de investigación, en la extracción por CO₂ supercrítico de bencil isotiocianato a partir de otras muestras que contenga este compuesto.
- En la extracción por diclorometano evaluar el método de cromatografía por columna y determinar la gradiente de solvente, para lograr una mejor separación del compuesto.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, A. L. (2006). *Exploración de las propiedades antimicrobianas de extractos vegetales a partir de Caléndula officinalis y Tropaeolum majus L., y su uso potencial en la industria de alimentos y cosmética.* (Tesis de Ingeniería en Producción Agroindustrial). Universidad de la Sabana. Colombia – Bogotá.
- Ahluwalia, S., Shivhare, U.; Basu, S. (2013). Supercritical CO₂ Extraction of Compounds with Antioxidant Activity from Fruits and Vegetables Waste -A Review. *Focusing on Modern Food Industry (FMFI) Volume 2 Issue 1, February, 47 - 49*
- Alonso, M. (2008). *Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura.* Santiago de Compostela. ISBN 978-84-9887-207-1
- Ayambo, L. (2006). *Optimización del proceso de extracción etanólica de Lepidium Peruvianum Chacón (maca).* (Tesis de título profesional). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Azmir, J.; Zaidul, I.; Rahman, M.; Sharif, K.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M.; Ghafoor, K.; Norulaini, N.; Omar, K. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A Review. *Journal of Food Engineering Volume 117, Issue 4, August 2013, 426 – 436*
- Barroso, P.; de Carvalho, P.; Rochab, T.; Pessoa, F.; Azevedo, D.; Mendes, M. (2016). *Evaluation of the composition of Carica papaya L. seed oil extracted with supercritical CO₂.* *Biotechnology Reports Volume 11, September 2016, 110 – 116*
- Bazytkoa, A.; Granica, S.; Filipeka, A.; Piwowarskia J.; Stefanskab J.; Osinskac E. (2013). *Comparison of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activity and chemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of the herb of Tropaeolum majus L.* *Industrial Crops and Products Volume 50, October 2013, 88-94*
- Benedí G.; Simón, J. (2013). *Plantas ornamentales tóxicas.* Barcelona

- Cabezas, G. (2014). *Evaluación del Efecto Cicatrizante de Extractos a base de Mastuerzo (Tropaeolum majus L.) en ratones (Mus Musculus)*. (Tesis pre grado químico farmacéutico). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador – Rio Bamba.
- Campo, M.; Adames, Y.; Bello, A.; Scull, R.; Bracho, G.; Baeza, A. (2014). *Análisis farmacognóstico preliminar de las semillas de Moringa Oleifera Lam cosechadas en Cuba*. Universidad Técnica de Machala. (Ecuador – Machala) e Instituto Finlay (Cuba - La Habana).
- Colbert (2010). *La nueva cura bíblica para el cáncer: verdades antiguas y remedios naturales y los últimos hallazgos para la salud*. Florida: Casa Creación.
- Csaky, A.; Martinez, G. (2012). *Técnicas experimentales en síntesis orgánica*. Madrid: Síntesis, S.A.
- Espinoza, C.; Quispe, M.; Cairampoma, J. (2016). *Mastuerzo (Tropaeolum majus L.) Estudio agronómico, fisicoquímico y aplicaciones*. (1ra ed.). Perú–Huancayo.
- Garzón, G.; Wrolstad, R. (2008). Major anthocyanins and antioxidant activity of Nasturtium flowers (*Tropaeolum majus L.*). *Food Chemistry 2009 Vol.114 No.1 pp.44-49 ref.32*
- Gonzales, J. (2007). *Plantas exóticas invasoras en las Asturias*. Consejería del Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructura y Obra Social “La Caixa”. Disponible en:
www.asturias.es/medioambiente/publicaciones/ficheros/plantas-aloc-t-inv.pdf
- Guillot, D. (2009). *Flora Ornamental Española: Aspectos Históricos y Principales Especies*. Monografías de la revista bouteloua N°8.
- Harris, D. (2006). *Análisis químico cuantitativo*. España: Reverté,S.A.
- Herrera, J. (2004). *Aplicación de las técnicas de extracción con fluidos supercríticos (SFE) y cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MSD) al análisis de residuos de buprofezin en frutas y hortalizas*. 36 - 38
- Liangcheng, D.; Halkier, B. (1996). Isolation of a Microsomal Enzyme System Involved in Glucosinolate Biosynthesis from Seedlings of *Tropaeolum majus L.* *Plant Physiol.* (1996) 11 1: 831-837

- Lizhong, M., Zheng, W.; Zhang, Z. (2015). Preparation method of glucosinolate and benzyl isothiocyanate as metabolite of glucosinolate. *Espacenet CN104356178 (A) - 2015-02-18*
- Loja, B. (2002). *Contribución al Estudio Florístico de la Provincia de Concepción*, Perú – Junín: Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Lykkesfeld, J.; Lindberg, M.(1993). Synthesis of Benzylglucosinolate in *Tropaeolum Majus L.* *Plant Physiol.* (1993) 102: 609-613
- Luque de Castro, M.; Valcárcel, M.; Tena, M. (1993). *Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico*. España: Reverte S.A.
- Martinez, A.; Villaseñor, J.; Lobato, J. (2004). *Termotecnia básica para ingenieros químicos: bases de termodinámica aplicada*. Cuenca: Universidad de Castilla-La Mancha.
- Nanzi, A. (1999). *Monografía CAPUCHINA*. Disponible en: www.youblisher.com/p/61602-Capuchina-Tropaeolum-majus-L/
- Orrego, A. (2008). *Congelación y liofilización de Alimentos*. Universidad de Colombia: 57-60. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/108651405/Libro-de-Liofilizacion-Del-Profe-Orrego>
- Ortega, J. (2014). *Estudio comparativo de métodos de extracción, en la obtención de extractos promisorios con actividad larvicida contra el mosquito Culex quinquefasciatus, a partir de residuos frutícolas*. (Tesis). Universidad Nacional de Colombia
- Palencia, Y. (1999) *Sustancias bioactivas en los alimentos*. Disponible en: http://www.unizar.es/med_naturista/bioactivos%20en%20alimentos.pdf
- Raventós, M. (2005). *Industria Aliemntaria Tecnologías Emergentes*, Universidad Politecnica De Catalunya: 131-132.
- Rincón, A. (2014). *Biosíntesis de los Glucosinolatos e Importancia Nutricional Humana y Funciones de Protección a las Plantas*. Facultad de Estudios a Distancia, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Disponible en: www.alimentoshoy.acta.org.co
- Rojas, M. (2012). *Diseño y síntesis de materiales "a medida" mediante el método sol-gel*. Editorial UNED.

- Rodriguez, L. (2011). Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del bencil isotiocianato de *Carica pubescens* (papaya del monte) frente a *Helicobacter pylori*. *Revista Médica Basadrina*: 4-9
- Ruiz, P. (1996). *Aplicación del dióxido de carbono supercrítico al procesado de alimentos: nata, subproductos del refinado de aceites vegetales y zumo de naranja*. (Tesis de doctor en farmacia). Universidad Complutense de Madrid.
- Shi, J. (2016). *Functional Food ingredients and nutraceuticals. Processing technologies*. Taylor & Francis Group L.L.C.
- Souto; Alves; Cavalcante (2012). *Capuchinha (Tropaeolum majus L.)*. Universidad Federal Da Paraíba Centro De Ciências Agrarias. Laboratorio de química y bioquímica. Areia (PB) – Janeiro. Editora KIRON: 13-15
- Spiridon, E.; Barberaki, M. (2003). *Plants That Fight Cancer*. Editorial Taylor Francis Group. LONDON AND NEW YORK. 187-188
- Taiz, I.; Zeiger, E. (2006). *Energy and Enzymes. Plant physiology*. 4ta ed. Sunderland: Sinauer Associates, (cap. 2): 1-22.
- Tornero, A. (2012). Aplicaciones de la tecnología de Fluidos Supercríticos (FSC) a la industria de productos naturales. AINIA.
- Troncoso, R.; Sanchez, A.; Ruelas, C.; Garcia, H.; Hernandez, T. (2005). Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by *Alternaria alternata*. *J Sci Food Agric* 85:1427–1434
- Turgut, N.; Temelli, F. (1996). Effect of Supercritical CO₂ on Myrosinase Activity and Glucosinolate Degradation in Canola. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44 (8): 2372–2376.
- Ugas, R. (2014). 40 viejas y nuevas verduras para diversificar tu alimentación y nutrirte mejor. Perú: Universidad Nacional Agraria la Molina.
- USP. The United States Pharmacopeia Convention (2007). Usp 39. Estados Unidos de America: 499-500.
- Velasco, R.; Villada, H.; Carrera, J. (2007). Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Revista Información Tecnológica*: 53 – 66.
- Wallsgrave, R. (1995). Amino Acids and Their Derivatives in Higher Plants. *Cambridge [England] ; New York : Cambridge University Press*.

Wen-Zhao, L.; Yi-Deng, D.; Yan, Z.; Ying-Zhou, C.; Zong-Yi, S.; Wen, C.; Mei-Juan, R.; Hua-Ping, Z. (2014). Optimized Formation of Benzyl Isothiocyanate by Endogenous Enzyme and its Extraction from *Carica*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research August; 13 (8): 1303-1311*

ANEXOS

ANEXO 1. Cuantificación del bencil isotiocianato por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

1.1. Fórmula para calcular BIT en muestras de hojas tratadas por CO₂-supercríticos

$$\% \text{ BITC} = \frac{\text{Área Prom MP} \times V_{St} \times 11\text{mL} \times \text{Pot Stg} \times 10\text{mL} \times 2\text{mL} \times 15\text{g} \times 100}{\text{Área Prom ST} \times 200\text{mL} \times 1000\text{mL} \times 1\text{mL} \times \text{PMg}}$$

Donde:

Área Prom MP : Promedio de áreas de las 2 inyecciones por solución muestra

Área Prom ST : Promedio de áreas de las 6 inyecciones por solución estándar

VSt : Volumen en mL tomado del estándar de bencil isotiocianato

200 mL : Primera dilución del estándar

11 mL : Alicuota tomada de la primera dilución del estándar

1000 mL : Segunda dilución del estándar

1 mL : Volumen en mL tomado de las muestras tratadas

10 mL : Dilución de la solución muestra

PMg : Peso de la oleorresina obtenida en g

2mL : Dilución de la oleorresina

15g : Cantidad de muestra tomada para tratamiento

100 : Unidad para expresar en %

1.2. Áreas de las muestras tratadas por CO₂ supercrítico de hojas de mastuerzo obtenidas en la cuantificación por HPLC

Los cromatogramas (figura 17 y figura 18) muestran la altura en unidades volt, sin embargo para realizar los cálculos se tomó en cuenta la conversión de volt a mAU, lo cual corresponde a: 1volt = 1000 mAU.

Tabla 15. Áreas obtenidas en la cuantificación por HPLC de hojas de mastuerzo

Muestras	Areas (mAU*s)	Altura (mAU)
T1	18136077.00	2248161
	18108024.00	2255870
T2	18153725.00	2267815
	18788830.00	2316549
T3	19677375.00	2437865
	19496752.00	2418312
T4	19135154.00	2376244
	19270383.00	2389528
T5	17995769.00	2255380
	17991320.00	2230045
T6	20244925.00	2500993
	20251646.00	2484789

Tabla 16. Áreas de las muestras tratadas por diclorometano de hojas liofilizadas

Muestras	Áreas (mAU*s)	Altura (mAU)
HLSC-T8	17996253,00	2255364
	18007674,00	2247840

1.3. Fórmula para calcular cantidad bencil isotiocianato en hojas tratadas por diclorometano

$$\% \text{ BITC} = \frac{\text{Area Prom MP} \times V_{\text{St}} \times 11\text{mL} \times \text{Pot St} \times 10\text{mL} \times 5\text{mL} \times 15\text{g} \times 100}{\text{Area Prom ST} \times 200\text{mL} \times 1000\text{mL} \times 1\text{mL} \times \text{PMg}}$$

Dónde:

Área Prom MP:	Promedio de áreas de las 2 inyecciones por solución muestra
Área Prom ST:	Promedio de áreas de las 6 inyecciones por solución estándar
VSt	: Volumen en mL tomado del estándar
200mL	: Primera dilución del estándar
11mL	: Alicuota tomada de la primera dilución del estándar
1000mL	: Segunda dilución del estándar
1mL	: Volumen en mL tomado de las muestras tratadas
10mL	: Dilución de la solución muestra
PMg	: Peso de la oleorresina obtenida en g
15g	: Cantidad de muestra tomada para tratamiento de HLSC
5mL	: Dilución de la oleorresina
100	: Unidad para expresar en %

ANEXO 2:

2.1. Prueba t para muestras independientes para el análisis estadístico en relación al rendimiento obtenido de bencil isotiocianato por los dos tipos de extracción.

Tabla 17: Prueba t para muestras independientes

Prueba de Levene para la igualdad de varianzas				Prueba t para la igualdad de medias					
F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típico de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia		
							Inferior	Superior	
1,002E+16	0,000		1706,69	2	0,000	138,9150	,08139	138,5648	139,2652
			1706,69	1,07	0,000	138,9150	,08139	138,0282	139,8019

2.2. Sub conjuntos obtenidos a partir del análisis de medias por TUKEY en relación al rendimiento obtenido de bencil isotiocianato por CO₂ supercrítico aplicado a seis tratamientos.

Tabla 18: Análisis de medias por TUKEY

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
P=200 ^ T=60	2	100,9625			
P=300 ^ T=50	2	101,6840			
P=300 ^ T=60	2	103,6435	103,6435		
P=200 ^ T=50	2		107,7480	107,7480	
P=300 ^ T=70	2			109,6490	109,6490
P=200 ^ T=70	2				113,6145
Sig.		,256	,059	,539	,068

ANEXO 3: Análisis realizados a la materia prima

3.1. Análisis de humedad de hojas frescas y liofilizadas de mastuerzo

Tabla 19. Humedad de hojas de mastuerzo frescas y liofilizadas

	Muestra (g)	peso placa	peso 1	peso 2	% Humedad
hojas liofilizadas	3,003	43,9403	46,9433	46,761	6,07
Hojas frescas	3,051	44,0701	47,1211	44,131	98,00

3.2. Índice de finura de la harina de hojas de mastuerzo

Tabla 20. Determinación del índice de finura de hojas trituradas de mastuerzo

Tamiz n°	Abertura de malla (mm)	Material retenido %	Factor	Sub total
U.S.B.S. (1)			(M.F.) (2)	
30	0,541	5,3	7	37,1
40	0,425	12,2	6	73,2
60	0,25	43,8	5	219
70	0,212	34,6	4	138,4
80	0,18	4,1	3	12,3
100	0,15	0	2	0
170		0	1	0
Plato	-----		0	0
				480
módulo de finura		4,8		

ANEXO 4: Preparación de las soluciones

4.1. Preparación del Buffer Fosfato de Potasio al 0,05 M a pH 7.

Reactivos:

- Monofosfato KH_2PO_4 PM= 136,09 g/mol
- Difosfato K_2HPO_2 , PM= 174,18 g/mol

Para preparar una solución de Buffer con una molaridad de 0,05 M a pH 7 se usó las siguientes formulas:

$$pH = pKa + \log \frac{[B]}{[A]}$$

Sabemos que el pKa es 7,2

$$[A] + [B] = 0,05$$

Entonces:

$$7 = 7,2 + \log \frac{[B]}{[A]}$$

$$[A] = 0,0167 \dots (1)$$

$$[B] = 0,0333 \dots (2)$$

Reemplazando (1) en la siguiente formula:

$$g\text{-KH}_2\text{PO}_4 = \text{molaridad} \times \text{volumen} \times \text{peso molecular}$$

Reemplazando (2) en la siguiente formula:

$$g\text{-K}_2\text{HPO}_2 = \text{molaridad} \times \text{volumen} \times \text{peso molecular}$$

4.2. Preparación de nitrato de plata amoniacal

Se preparó de la siguiente manera:

- En una fiola de 100 mL de diluyó 0,28 g de nitrato de plata con 5 mL de amoniacó, y se enrasó con metanol.

4.3. Preparación de Ácido Nítrico (HNO₃) al 0,5 N (100mL)

Datos del reactivo: Pureza de 65%, Densidad de 1.39 g/mL

Se calcula la masa de un equivalente de HNO₃

$$1 \text{ equivalente de HNO}_3 = \frac{63 \text{ gramos}}{1} = 63 \text{ gramos}$$

Se calcula la cantidad necesaria para preparar:

$$\frac{100 \text{ mL} \times 1 \text{ L} \times 0,5 \text{ equivalente} \times 63 \text{ g (puros)} \times 100 \text{ g (impuros)} \times 1 \text{ mL (impuros)}}{1000 \text{ mL} \times 1 \text{ L} \times 1 \text{ equivalente} \times 65 \text{ g (puros)} \times 1,39 \text{ g (impuros)}}$$

Resultado: La cantidad necesaria de Ácido nítrico que se necesita para preparar la disolución es 3,49 mL

ANEXO 5: Acondicionamiento de la hojas de mastuerzo



Figura 21. Acondicionamiento de las hojas de mastuerzo

ANEXO 6: Extracción por diclorometano del isotiocianato de bencilo a partir de hojas de mastuerzo



Figura 22. Proceso de extracción por diclorometano de bencil isotiocianato a partir de hojas de mastuerzo

ANEXO 7: Extracción de bencil isotiocianato por CO₂ supercrítico a partir de hojas de mastuerzo

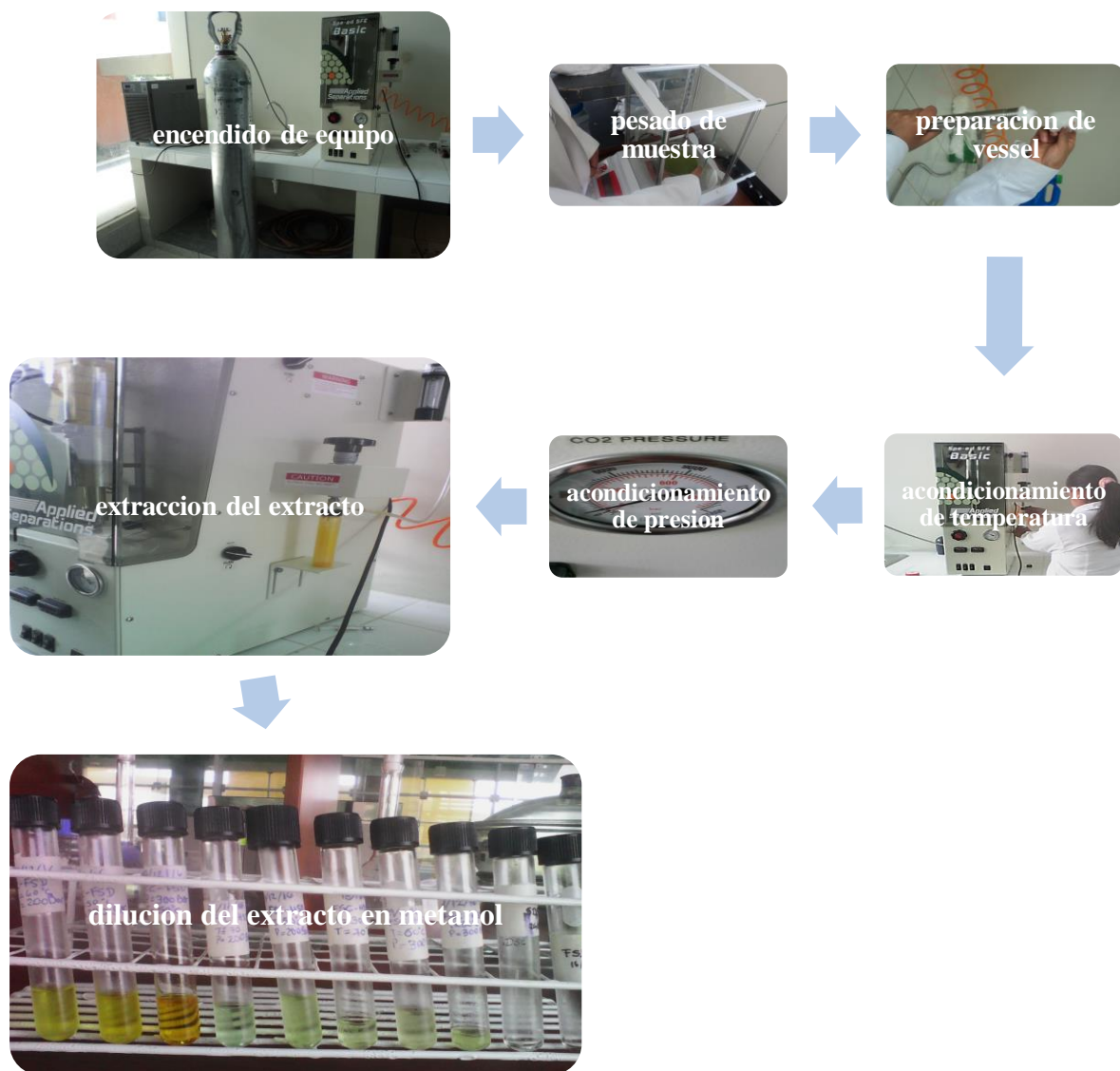


Figura 23. Extracción de bencil isotiocianato por CO₂ supercrítico a partir de hojas de mastuerzo

ANEXO 8. Identificación del BIT por cromatografía de capa fina y cuantificación por HPLC

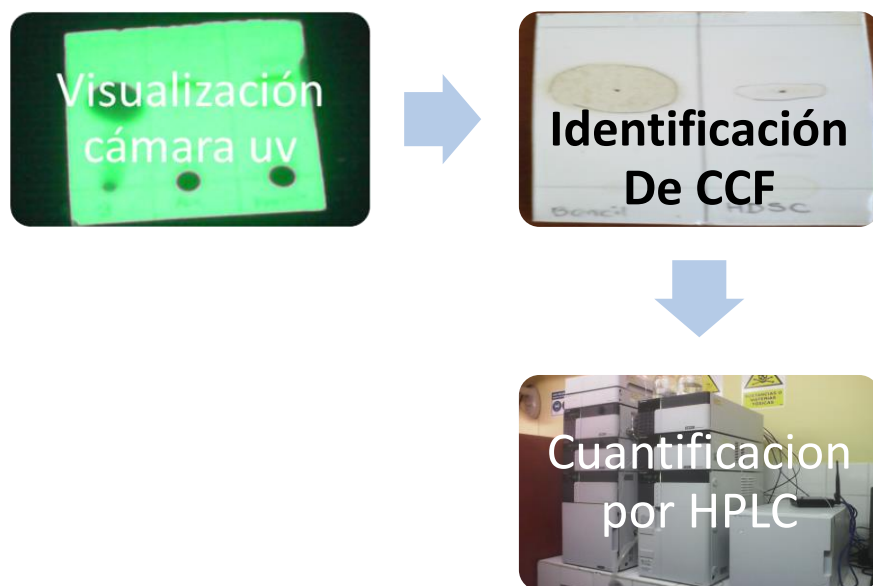


Figura 24. Cromatografía de capa fina y cuantificación del BIT por HPLC