

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA



Extracción de compuestos bioactivos a partir de cascalote (*Caesalpinia coriaria*) mediante tecnologías verdes.

Por:

MARIJOSE COVARRUBIAS CÁRDENAS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Agosto, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Extracción de compuestos bioactivos a partir de cascalote (*Caesalpinia coriaria*) mediante tecnologías verdes

Por:

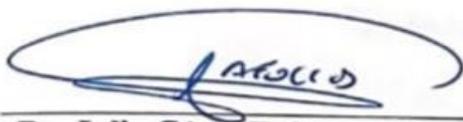
MARIJOSE COVARRUBIAS CÁRDENAS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

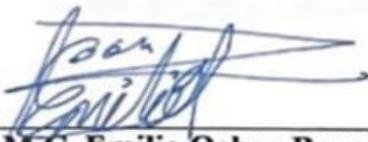
Aprobada por el Comité de Asesoría



Dr. Julio César Tafolla Arellano
Asesor principal UAAAN



Dr. José Juan Buenrostro Figueroa
Asesor principal externo



M.C. Emilio Ochoa Reyes
Coasesor



Dr. Jesús Omar Díaz Rivas
Coasesor

Saltillo, Coahuila, México

Agosto, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Extracción de compuestos bioactivos a partir de cascote (*Caesalpinia coriaria*) mediante tecnologías verdes.

Por:

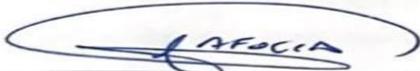
MARIJOSE COVARRUBIAS CÁRDENAS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Jurado Examinador



Dr. Julio César Tafolla Arellano
Asesor principal UAAAN



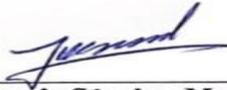
Dr. José Juan Buenrostro Figueroa
Asesor principal externo



M.C. Emilio Ochoa Reyes
Coasesor



Dr. Jesús Omar Díaz Rivas
Coasesor



M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de División de Ingeniería

Saltillo, Coahuila, México

III

DERECHO DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

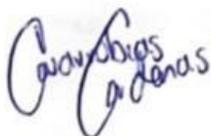
Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.

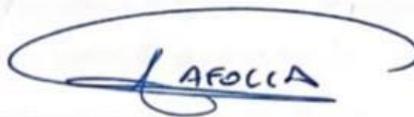
A t e n t a m e n t e

Alma Terra Mater



Marijose Covarrubias Cárdenas

Autor principal



Dr. Julio César Tafolla Arellano

Asesor principal UAAAN

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **Dios** y a mi **Padre celestial** que me dieron la vida, salud y fortaleza para poder continuar con mis estudios y metas en cada etapa de mi vida.

A mi **Alma Terra Mater** la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por creer en mí, por brindarme las herramientas necesarias para alcanzar mis metas y por convertirse en mi segundo hogar durante estos años. Es un privilegio haber sido parte de esta institución y llevar con orgullo su nombre a cualquier lugar a donde quiera que vaya.

Al **Dr. Julio César Tafolla Arellano** por ser mi director de tesis y darme la oportunidad de ser parte de este equipo de trabajo, por su confianza y apoyo para que esto se llevará a cabo. También por ser mi maestro dentro de algunas materias de la carrera y compartirme sus conocimientos.

Al **Dr. Juan José Buenrostro Figueroa** por ser mi codirector de tesis, por apoyarme en este proyecto, confiar, cuidarme y tenerme paciencia. Por compartir sus conocimientos y darme las herramientas necesarias, además de darme las facilidades en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.

Al **M.C. Emilio Ochoa Reyes** por haberme aceptado como practicante y sobre todo por haber aceptado ser parte de mi comité de asesores. Por todo su apoyo técnico y conocimientos dentro del laboratorio, por tenerme tanta paciencia y confianza. Gracias nuevamente por hacerme sentir que podría lograr todo lo que yo me propusiera, por ser más que un mentor ser mi amigo, darme grandes consejos y cuidarme durante mi estancia en el Centro de Investigación.

Al **Dr. Jesús Omar Díaz Rivas** por ser parte de este comité y apoyar este proyecto, por siempre estar a disposición de compartirme sus conocimientos de una gran manera.

Agradezco **Ximena Arely Cordero Nieto** por ser una pieza importante de todo esto y darme ese apoyo siempre al escribir esta tesis y las ganas de seguir adelante. Gracias por tener más que una amistad y estar en los momentos felices y tristes. Por todas las experiencias vividas

juntas y las que nos faltaran en un futuro, también agradezco a tu familia por hacerme parte de ella, a tus hermanos y en especial a tus padres **Alejandro Ortiz Zamarripa** y **Estrella Nieto Escobedo** por estar pendiente de mí, darme consejos y brindarme su apoyo en todo momento.

Agradezco **Ernesto Juárez León** por su amistad durante todo el transcurso de la carrera por todos los llantos, risas, materias y exámenes que exentamos o reprobábamos juntos. Por apoyarme y estar siempre en las buenas y malas experiencias, gracias por nunca dejarme sola.

A **Marianela Echeveste Hernández** por ser una gran amiga, por apoyarme y aconsejarme en todo momento, por las etapas buenas o malas que vivimos juntas en el transcurso de la universidad.

A mis demás compañeros y amigos de la universidad en especial agradecimiento a **Andrea Aquetzaly Ruiz Ruiz, Pablo Vázquez, Luis Eduardo Villegas, José De la Peña, Luis Bonfil** por ofrecerme su amistad, su apoyo en este camino académico y por las experiencias vividas dentro y fuera de la universidad.

A **Carlos Olivares y Mayte De La Torre** quienes ofrecieron su ayuda al elaborar mi tesis por sus ánimos siempre y su gran amistad que formamos en mi tiempo de prácticas en el Ciad de Delicias, Chihuahua. Espero que siempre permanezca.

DEDICATORIA

Este proyecto va dedicado especialmente a mis papás **Yolanda Cárdenas García** y **Carlos Covarrubias Galván** quiero expresar mi gran profunda gratitud por darme la oportunidad de una educación y el sacrificio que han hecho. Fueron un pilar importante para mi crecimiento y desarrollo durante todos estos años en mi vida. Gracias por siempre motivarme y confiar en mí, por enseñarme a que nada es fácil y que siempre hay que esforzarse más para obtener lo que queremos, a ser independiente en todas las cosas y que los sueños se pueden lograr con el apoyo de las personas correctas.

A mis sobrinos **Robinho Covarrubias, José Manuel Covarrubias, Diego Covarrubias, Axel Covarrubias, Miranda Covarrubias, Ronaldo Picasso, Lucca Picasso, Dorlan Covarrubias, Leah Picasso** por ser una motivación para mí y querer ser un gran ejemplo para ustedes, para que algún día tengan el deseo de esforzarse y obtener mejores conocimientos para sus vidas.

A mis hermanos **Ricky Covarrubias, Sofía Covarrubias, Carlos Covarrubias** por darme consejos, escucharme y apoyarme en algunos momentos durante mi etapa universitaria.

A **Rosario Cárdenas García** mi tía por darme ese ejemplo y motivación para culminar una carrera de la mejor manera, también por apoyarme y quererme. Enseñarme que nada es fácil, que se tiene que trabajar por todo aquello que queremos. Y que todo esfuerzo y sacrificio al final tendrán su recompensa y valdrá la pena.

A mi familia por sus buenos deseos hacia mi futuro y por su gran apoyo siempre, gracias.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

DERECHO DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
DEDICATORIA.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE CUADROS.....	XI
RESUMEN.....	XII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación.....	1
1.2 Hipótesis.....	3
1.3 Objetivo General.....	3
1.3.1 Objetivos Específicos.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Generalidades del cascalote.....	4
2.2 Composición química.....	4
2.3 Taninos.....	5
2.3.1 Clasificación.....	5
2.3.2 Aplicaciones.....	6
2.4 Métodos de Extracción.....	7
2.4.1 Convencionales.....	7
2.4.2 Asistida por procesos biotecnológicos.....	7
2.4.3 Tecnologías verdes.....	8
2.5 Métodos para determinar la capacidad antioxidante.....	9

2.5.1 DPPH	9
2.5.2 ABTS	10
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1 Material vegetal.....	11
3.2 Reactivos químicos	11
3.3. Obtención de los extractos mediante EAU, EAM y EA-U/M	11
3.4 Separación y purificación mediante cromatografía en columna	12
3.5. Análisis químico	13
3.5.1 Fenoles Hidrolizables.....	13
3.5.2. Fenoles Condensados.....	14
3.5.3. Fenoles Totales	14
3.5.4. Determinación de la capacidad antioxidante.....	14
3.5.4.1 Determinación por DPPH	14
3.5.4.2 Determinación por ABTS ^{•+}	14
3.5.4.3 Expresión de resultados	15
3.5.5 Determinación del perfil de compuestos presentes mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-MS)	15
3.5.6. Análisis por espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR).....	16
3.6. Análisis estadístico.....	16
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
4.1. Obtención de extractos mediante EAU, EAM y EA-U/M.....	17
4.2 Fenoles hidrolizables.....	17
4.3 Fenoles condensados	18
4.4 Análisis de fenoles totales.....	19
4.5 Capacidad antioxidante del extracto de cascalote obtenido mediante EA-U/M	20

4.6 Perfil de compuestos fenólicos por GC-MS.....	22
4.7 Análisis por espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR).....	24
V. CONCLUSIONES.....	26
VI. LITERATURA CITADA.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vainas de cascalote secas.	2
Figura 2. Árbol del cascalote.....	4
Figura 3. Clasificación de los taninos.	6
Figura 4. Obtención de los extractos a partir de la vaina de cascalote	12
Figura 5. Separación y purificación de la fracción rica en compuestos fenólicos empleando amberlita xad-16.....	13
Figura 6. Contenido de fh en extracto de cascalote obtenido mediante ea-u/m, eam y eau. Las barras representan el promedio (n=4) de los valores evaluados \pm la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre sistema de extracción (tukey, $p < 0.05$).	18
Figura 7. Contenido de fc en extracto de cascalote obtenido mediante ea-u/m, eam y eau. Las barras representan el promedio (n=4) de los valores evaluados \pm la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre sistema de extracción (tukey, $p < 0.05$).	19
Figura 8. Contenido de ft en extracto de cascalote obtenido mediante ea-u/m, eam y eau. Las barras representan el promedio (n=4) de los valores evaluados \pm la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre sistema de extracción (tukey, $p < 0.05$).	20
Figura 9. Efecto de la concentración de extracto de cascalote sobre la inhibición del radical dpph (n=4).....	21

figura 10. Efecto de la concentración de extracto de cascalote sobre la inhibición del radical abts (n=4).	22
Figura 11. Espectro gc/ms del extracto de cascalote obtenido por ea-u/m	23
figura 12. Espectro ftir del extracto de cascalote	25

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Rendimiento de fracción de polifenoles obtenidos a partir de cascalote mediante EAU, EAM y EA-U/M.....	17
Cuadro 2. Perfil de compuestos fenólicos encontrados en el cascalote	24

RESUMEN

El cascalote (*Caelsalpinia coriria*) es un árbol originario del sur de México, Centroamérica, Sudamérica y Antillas. Su fruto es una vaina rica en compuestos fenólicos. Sin embargo, este fruto es considerado un residuo por la mayor parte de la población, y su uso se ve limitado al curtido de pieles, en la medicina tradicional, y forraje. El objetivo de esta investigación fue evaluar el proceso de extracción y potencial antioxidante de compuestos fenólicos obtenidos a partir de vainas de cascalote empleando tecnologías verdes. Para ello, se utilizaron tres diferentes métodos de extracción: ultrasonido (EAU), microondas (EAM) e híbrido (Ultrasonido-Microondas, EA-U/M). Los extractos obtenidos fueron sometidos a una separación y purificación mediante cromatografía en columna para obtener la fracción rica en compuestos fenólicos, y se determinó el contenido de fenoles hidrolizables (FH), condensados (FC) y totales (Hidrolizables + condensados, FT). Una vez seleccionado el mejor sistema extracción, se determinó la capacidad antioxidante frente a los radicales ABTS y DPPH, así como el perfil de compuestos fenólicos y grupos funcionales mediante cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS) y FTIR, respectivamente. El mayor rendimiento de compuestos purificados se obtuvo en la EA-U/M, con un valor de 0.26 mgPT/gms. En este mismo sistema de extracción se observó el contenido de FH, FC y FT, con valores de 45.34 mgEAG/gms, 169.21 mgEC/gms y 214.55 g/gms, respectivamente. El extracto de cascalote obtenido mediante EA-U/M mostró una capacidad antioxidante de 601.63 ± 7.49 mgET/gms (DPPH) y 534.77 ± 12.55 mgET/gms (ABTS) con valores de IC_{50} de 242.81 y 186.6 mg/L para DPPH y ABTS, respectivamente. Se identificaron tres compuestos, tales como 1-Eicosanol, éster de 3-metilfenilo del ácido butánico, 2-etil 1-dodecanol, siendo este último el compuesto con mayor presencia. Dentro de los análisis obtenidos por FTIR se detectó la presencia de grupos funcionales pertenecientes al hidroxilo y carbonilo, los cuales forman parte fundamental en la estructura de compuestos bencénicos pertenecientes a compuestos fenólicos y alifáticos. Los resultados obtenidos demuestran el potencial que representan las vainas de cascalote para obtener compuestos fenólicos con gran capacidad antioxidante, empleando tecnologías verdes.

Palabras clave: Cascalote, actividad antioxidante, GC-MS, ultrasonido, microondas.

I. INTRODUCCIÓN

Caesalpinia coriaria, conocida en algunas regiones de México con el nombre “Cascalote” es originario del sur de México, Centro y Sudamérica. Produce un fruto en forma de vaina, rica en compuestos fenólicos que se emplea en el curtido de pieles, forraje y elaboración de tintes (Veloz-García *et al.*, 2010; Palasap *et al.*, 2014). No obstante, gran cantidad de la vaina no se aprovecha y queda en campo. Se ha reportado un alto contenido de compuestos fenólicos presentes en la vaina con diversas propiedades biológicas, por lo cual se considera fuente de compuestos de alto valor agregado (Anandhi *et al.*, 2014; Sánchez-Carranza *et al.*, 2017; López-Cárdenas *et al.*, 2023). Estos compuestos se han obtenido a través de diversos sistemas de extracción, empleando solventes orgánicos. No obstante, es importante explorar otros sistemas de extracción que representen una opción amigable con el medio ambiente y permitan recuperar la mayor cantidad de compuestos fenólicos. El uso de extracción asistida por ultrasonido, microondas y la combinación ultrasonido-microondas ha sido reportada como un sistema adecuado para la recuperación de compuestos fenólicos a partir de diversas especies vegetales, logrando reducir y hasta eliminar el uso de solventes, así como favorecer una mejor extracción de los compuestos (Hernández-Hernández *et al.*, 2020; Valero-Mendoza *et al.*, 2023). En el presente trabajo se describe el proceso de extracción asistida por ultrasonido (EAU), microondas (EAM) e híbrida ultrasonido-microondas (EA-U/M) de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante a partir de las vainas de cascalote, determinando el perfil de compuestos fenólicos presentes en el extracto. De esta manera, se propone una alternativa para la obtención de compuestos de interés industrial empleando tecnologías ecoamigables.

1.1 Justificación

Los árboles de cascalote presentan una gran producción de vainas, alcanzando niveles que van desde los 30 hasta los 150 kg de vainas por árbol (Rodríguez-Ruiz & Palma-García, 2018). Las vainas de cascalote (Figura 1) contienen compuestos fenólicos, los cuales presentan capacidad antioxidante y otras bioactividades. Dados los inconvenientes que

presentan los métodos de extracción convencionales, tales como alto consumo de reactivos y bajo rendimiento, las tecnologías verdes de extracción como ultrasonido y microondas, se han perfilado como alternativas que permiten obtener mejores resultados, empleando una menor cantidad de materiales. La información acerca de la aplicación de tecnologías verdes en la extracción de compuestos fenólicos presentes en las vainas de cascalote es escasa. Debido a lo anterior, es importante analizar las ventajas de la aplicación de estas tecnologías, a la vez que se brinda una comparación entre las mismas para determinar el método más adecuado.



Figura 1. Vainas de cascalote secas (Fuente: Nambo García, 2022).

1.2 Hipótesis

El sistema de extracción EA-U/M tendrá mayor rendimiento de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante a partir del cascalote.

1.3 Objetivo General

Evaluar el proceso de extracción y potencial antioxidante de compuestos fenólicos obtenidos a partir de vainas de cascalote empleando tecnologías verdes

1.3.1 Objetivos Específicos

1.3.1.1 Obtener extractos de cascalote (*Caesalpinia coriaria*) mediante ultrasonido, microondas y combinación ultrasonido/microondas.

1.3.1.2 Seleccionar el mejor sistema de extracción de acuerdo con el rendimiento de compuestos fenólicos obtenidos.

1.3.1.3 Determinar el perfil de compuestos fenólicos presentes en el mejor sistema de extracción mediante GC-MS y FTIR, así como su capacidad antioxidante total.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del cascalote

El cascalote (*Caesalpinia coriaria*) también conocido comúnmente como divi-divi, es un árbol de forma vegetativa con corteza escamosa y madera rugosa de color gris, tiene una altura de 11 m, su tronco de 45 cm de diámetro (Figura 2). Sus flores son pequeñas en branquias axilares racimos, de 1 a 2 cm de longitud. Produce vainas de 3 a 7 cm longitud con un color café oscuro lustroso la forma de estas es curvada o enroscada.

El cascalote se localiza en algunos estados costeros de México como Sinaloa, Nayarit, Jalisco, México, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas. Además de Centroamérica, Oeste de India, las Antillas y Sudamérica en otras partes del mundo. Actualmente este se distribuye en los trópicos del mundo (Quiroz-Alcívar, 2022).

Una de las características muy importantes de esta planta es que sus frutos tienen un alto contenido en taninos del 40 al 45%, con propiedades medicinales antisépticas y antiinflamatorias (Palma *et al.*, 2018). Recientemente, se ha propuesto que sus compuestos fenólicos tienen actividad antineoplásica y antiproliferativa (Sánchez-Carranza *et al.*, 2017).

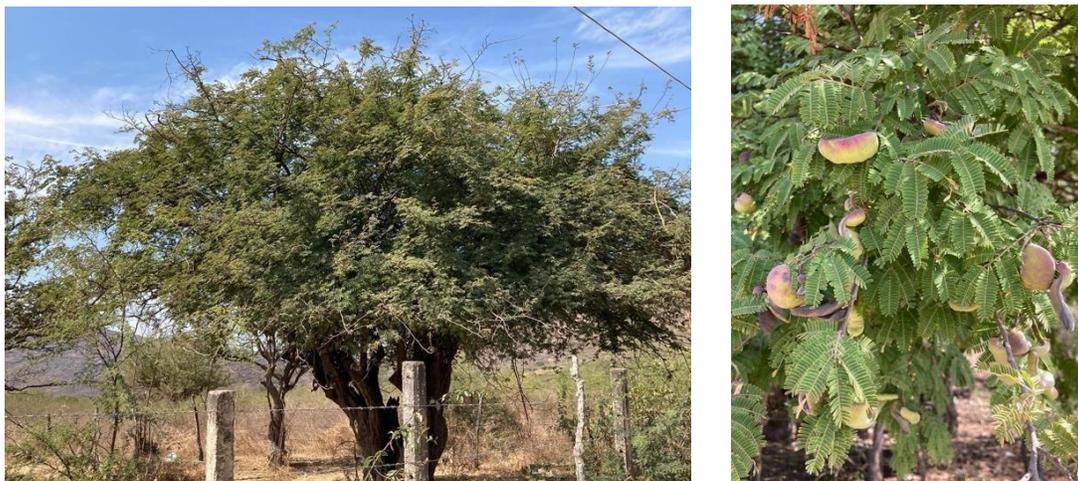


Figura 2. Árbol del cascalote (Fuente: fotografías proporcionadas por Ricardo Huerta).

2.2 Composición química

Se ha reportado que las vainas de cascalote presentan la siguiente composición fisicoquímica

(g/100 gms): Grasa 0.65, Fibra 6.54, Proteína 3.44, Humedad 3.36 (%), Cenizas 2.13, y carbohidratos 87.24. Adicionalmente, destaca en su composición la presencia de compuestos fenólicos, con valores de 45.76 mgGAE/GMS de taninos hidrolizables, 10.97 mgCE/GMS de taninos condensados, y un contenido fenólico total de 56.73 (mg/GMS) (Lopez-Cardenas *et al.*, 2023).

2.3 Taninos

Los taninos son considerados metabolitos secundarios de peso molecular entre 500 a 3000 Da, presentes en todas las plantas, formados por grupos fenólicos (alrededor de 12 a 16), capaces de interactuar con diversas moléculas de interés biológico, así como precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas (Hassanpour *et al.*, 2019).

Los taninos son parte del sistema de defensa de las plantas ante herbívoros e insectos. Además de ser astringentes, los taninos interfieren en la absorción de nutrientes y se consideran compuestos antinutricionales, ya que al unirse a proteínas impiden la correcta absorción de las mismas. Sin embargo, se ha reportado que en dosis de 1.5-2.5 g/día, los taninos presentan propiedades benéficas como su capacidad antioxidante, reducción del estrés oxidativo, prevención del envejecimiento celular entre otras más, sin llegar a ser antinutricionales (Sharma *et al.*, 2021).

2.3.1 Clasificación

De acuerdo a Khanbabaee & van Ree (2001), los taninos se clasifican de acuerdo a su estructura en cuatro grupos: galotaninos, elagitaninos, taninos complejos y taninos condensados (Figura 3).

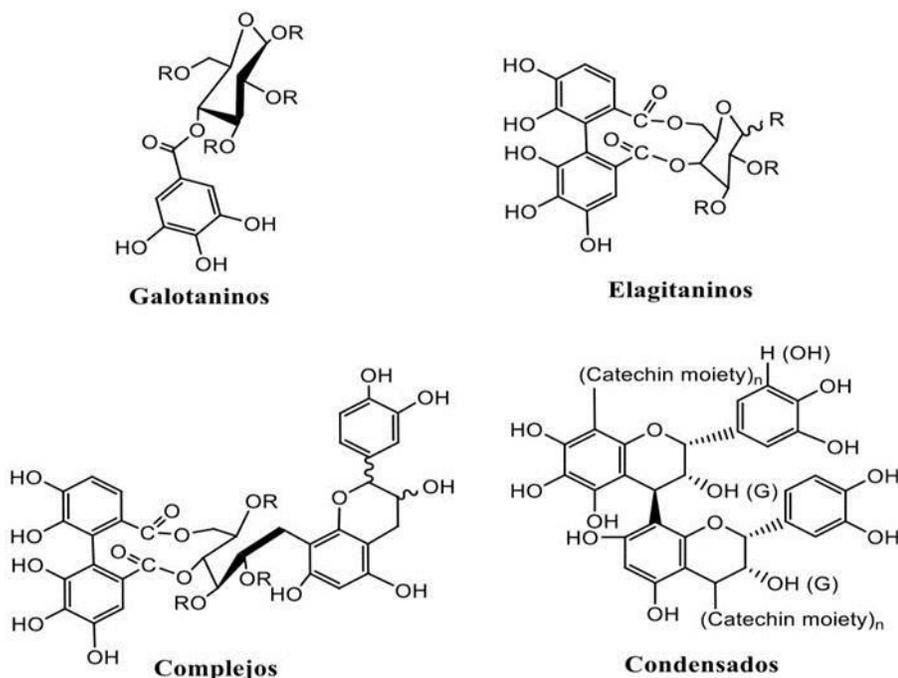


Figura 3. Clasificación de los taninos.

Los galotaninos son ésteres del ácido gálico y del ácido digálico, unidos mediante una funcionalidad éster entre el $-\text{COOH}$ de uno y el $-\text{OH}$ del otro. A su vez, se asocian con diversas unidades de polioles, catequinas o triterpenoides. El principal galotaninos es el ácido gálico. Los elagitaninos se forman a partir de los galotaninos, mediante el acoplamiento C-C de dos unidades galoilo, y no contienen una unidad de catequina unida glicosídicamente (Ascacio-Valdés *et al.*, 2011). El principal elagitanino es el ácido elágico. Por otra parte, los taninos complejos son aquellos en que una unidad de catequina se une glicosídicamente a un galotanino o una unidad de elagitanino. En cuanto a los taninos condensados, son proantocianidinas oligoméricas y poliméricas formadas por la unión de C-4 de uno catequina con C-8 o C-6 de la siguiente catequina monomérica (Olivas-Aguirre *et al.*, 2015).

2.3.2 Aplicaciones

El principal uso de la vaina de cascalote es para la curtiduría de cueros de animales, debido a su alto contenido de taninos (Mora-Santacruz *et al.*, 2018). Los taninos son moléculas de interés industrial, debido a las propiedades biológicas atribuidas que los convierte en compuestos de alto valor agregado, por su aplicación en la industria alimentaria, cosmética y

farmacéutica. Su importancia radica en la capacidad para eliminar o reducir enfermedades crónico-degenerativas, y mejorar la salud del consumidor. Dentro de las actividades biológicas atribuidas al cascalote, destaca la antimicrobiana, antiparasitaria, antioxidante, antidiarreica, analgésica y antiinflamatoria (Jeeva *et al.*, 2014; Vélez-Terranova *et al.*, 2014; Olmedo-Juárez *et al.*, 2019).

2.4 Métodos de Extracción

2.4.1 Convencionales

Dentro de las técnicas convencionales más utilizadas para extraer compuestos fenólicos a partir de matrices vegetales se encuentran aquellas que emplean solventes combinados con calor y agitación, como el Soxhlet, calentamiento-reflujo, maceración e hidrodestilación. En estas técnicas se mezclan diferentes disolventes (agua, alcohol, metanol, diclorometano, éter dietílico, acetato de etilo o tolueno) con la materia prima, la cual contiene compuestos que son solubles en el solvente de extracción. Si bien son técnicas eficientes, el uso combinado de altas temperaturas y tiempos de extracción favorecen la degradación de los compuestos de interés (Wong-Paz *et al.*, 2020). Estas desventajas permiten el surgimiento de alternativas de extracción, como son aquellas que involucran procesos biotecnológicos (extracción asistida por enzimas y/o extracción asistida por fermentación); así como las denominadas “tecnologías verdes”, cuya aplicación reduce el impacto negativo al ambiente, al reducir o eliminar el uso de disolventes, mientras que mejoran el rendimiento y la calidad de los compuestos obtenidos.

2.4.2 Asistida por procesos biotecnológicos

El uso de procesos biotecnológicos permite la liberación y, en consecuencia, una mejor extracción de compuestos fenólicos (Cano & Postigo *et al.*, 2021). Se realiza al someter la matriz vegetal a un tratamiento enzimático previo a la extracción para degradar la pared celular de la célula vegetal, o a través de un proceso de fermentación, donde se hace crecer a un microorganismo en contacto con la matriz vegetal, de tal forma que el microorganismo sea capaz de producir las enzimas requeridas para romper la pared celular y biotransformar compuestos de alto peso molecular a otros de menor peso molecular, y facilitar la liberación y posterior recuperación de compuestos los compuestos fenólicos (Wang *et al.*, 2006; Azmir

et al., 2013). Estos métodos son respetuosos con el medio ambiente, ya que no utilizan solventes orgánicos ni otros productos químicos tóxicos, lo que hace que los extractos sean seguros para el consumo humano (Torres-León *et al.*, 2021; Yepes-Betancur *et al.*, 2021).

2.4.3 Tecnologías verdes

Las tecnologías verdes incluyen la extracción asistida por ultrasonido (EAU), microondas (EAM), líquidos presurizados (ELP), fluidos supercríticos, líquidos expandidos con gas y mediante campos de pulsos eléctricos; siendo la EAU y EAM las más reportadas, al reducir los tiempos de extracción y la cantidad de disolvente empleado (Azmir *et al.*, 2013). La extracción asistida por ultrasonidos (EAU) utiliza sonido de alta frecuencia para liberar los compuestos deseados del material vegetal, las partículas sólidas vibran y se aceleran bajo la influencia de ondas de ultrasonido, y los solutos pasan rápidamente de la fase sólida al disolvente (Rostagno *et al.*, 2003). Los ultrasonidos de baja frecuencia (20-200 kHz) son ondas sonoras más altas que las del oído humano, pero más bajas que las microondas. Cuando estas ondas atraviesan el medio se produce la cavitación, fenómeno que crea burbujas en las células que explotan liberando grandes cantidades de energía que debilitan la membrana celular (Cravotto *et al.*, 2018; Sirohi *et al.*, 2020).

La extracción por microondas combina las microondas con la extracción con disolventes tradicionales, cuando es necesario. EAM es una técnica tradicional para extraer ingredientes activos de plantas medicinales que utiliza energía de microondas para calentar el solvente en la muestra, separando así el analito de la matriz de la muestra en el solvente. Una ventaja importante del EAM es su capacidad para calentar rápidamente la mezcla de disolventes de la muestra, lo que lo hace adecuado para la extracción rápida de analitos, incluidas sustancias térmicamente lábiles (Kataoka, 2003). Siendo esta una técnica de las más utilizadas, ya que tiene alto rendimiento a la hora de obtener compuestos bioactivos con una menor cantidad de disolvente y tiempo de extracción. (Bandar *et al.*, 2013).

Las microondas se pueden combinar con ultrasonido, y esta combinación está disponible como una nueva tecnología híbrida llamada extracción asistida por ultrasonido/microondas (EA-U/M). Es una tecnología complementaria, cuyo uso se ha extendido en los últimos años, permite realizar una extracción rápida, uniforme y a baja temperatura, superando las

deficiencias de la EAU y la EAM (Zhang *et al.*, 2023). La EA-U/M ofrece ventajas adicionales sobre los métodos convencionales en términos de menor tiempo de extracción, mayor rendimiento y menor uso de solventes. Lo anterior permite acelerar el proceso para recuperar moléculas con alta actividad biológica. Asimismo, permite trabajar con solventes nobles como el agua, evitando el uso de solventes que si son contaminantes (HernándezHernández *et al.*, 2020).

2.5 Métodos para determinar la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante total (CAT) se define como la capacidad de una sustancia o compuesto para inhibir o prevenir la oxidación de un sustrato incluso en cantidades muy pequeñas (<1%, típicamente 1-1000 mg/L). Su medición se puede utilizar para evaluar la calidad de los alimentos, la cantidad de antioxidantes en el sistema o la biodisponibilidad de compuestos antioxidantes en el cuerpo humano (López-Alarcón & Denicola, 2013). Las técnicas para determinar la capacidad antioxidante determinan el grado de inhibición o reducción del daño que ocasiona un agente oxidante a un sustrato oxidable. La inhibición es proporcional a la capacidad antioxidante del compuesto o muestra evaluada. Otros ensayos cuantifican los productos formados tras la reacción oxidativa. Las técnicas más reportadas son aquellas basadas en la captación de radicales libres, como el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y el 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Munteanu & Apetrei, 2021).

2.5.1 DPPH

Es el ensayo más simple empleado para determinar la capacidad antioxidante de alimentos y sistemas biológicos complejos. El DPPH es un radical libre capaz de reaccionar con compuestos antioxidantes mediante la donación de electrones por parte del compuesto antioxidante, para neutralizar el radical DPPH. Esta reacción se acompaña de una decoloración del DPPH, que se registra a 517 nm, la cual es proporcional a la capacidad antioxidante de la muestra (Guija-Poma *et al.*, 2015). El DPPH no está presente *in vivo* y es muy estable, a diferencia de radicales presentes en organismos vivos. Sin embargo, es importante considerar que otros compuestos pueden absorber a la misma longitud de onda, causando interferencia o mala interpretación del resultado (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008).

2.5.2 ABTS

El ensayo ABTS es un método simple y conveniente para determinar la capacidad antioxidante. Se basa en la capacidad del antioxidante para neutralizar el catión radical estable 2,2'-azinobis (ácido 3- etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS^{•+}). El catión ABTS es un cromóforo azul verdoso cuya máxima absorción se observa a 734 nm, y en presencia de un antioxidante pierde su color. El grado de decoloración depende del tiempo de la reacción, la actividad antioxidante intrínseca y de la concentración de la muestra (Munteanu & Apetrei, 2021).

El radical catión ABTS es soluble tanto en medios orgánicos como acuosos, y se puede utilizar para determinar la capacidad antioxidante de muchos compuestos, como carotenoides y muestras hidrofílicas. No obstante, el ensayo a menudo es criticado debido a que el radical ABTS no existe de manera natural, y su formación involucra una reacción lenta que consume entre 12 y 16 horas (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). A menudo, la capacidad antioxidante de una muestra basada en el ensayo DPPH y ABTS se reporta como IC₅₀, que se define como la concentración eficiente del antioxidante necesaria para reducir o inhibir al 50% el radical (Munteanu & Apetrei, 2021).

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para el desarrollo del presente estudio se emplearon vainas de Cascalote procedentes de San Miguel Totolapan, Guerrero, México (18°09'07.5"N 100°21'57.8"W), se transportaron al laboratorio de biotecnología y bioingeniería en CIAD Delicias, Chihuahua, México. El material fue secado a 50 °C durante 24 h (Shel-Lab 1380FX Forced-Air Oven, Cornelius, OR, EE. UU.), posteriormente fue molido (PULVEX Mini 100, Ciudad de México, México) a un tamaño de partícula de 1 mm, y se almacenaron en una botella hermética de polietileno negro a temperatura ambiente (30 °C) hasta su uso.

3.2 Reactivos químicos

Etanol y metanol (JT Baker™), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ácido 2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS•+), Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio, HClButanol (10%), TROLOX, ácido gálico, sulfato de hierro heptahidratado (FeSO₄·7H₂O), buffer de acetato 0.3 M, TPTZ (Reactivo en polvo para determinar niveles de hierro). Cloruro férrico hexahidratado (FeCl₃·6H₂O), amberlita XAD-16, H₂O destilada.

3.3. Obtención de los extractos mediante EAU, EAM y EA-U/M

La obtención de los extractos a partir de las vainas de cascalote se llevó a cabo en el Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas, en la Universidad Autónoma de Coahuila (Fig. 4). Para ello, se pesaron 62.50 g de muestra, y se mezclaron con 1000 mL de agua destilada en un reactor de vidrio. Posteriormente, el reactor se introdujo al equipo de extracción ATPIO-SM300 (Nanjing ATPIO Instruments Manufacture Co., Ltd. Company, Nanjing, China). La EAU se realizó durante 20 min a una frecuencia de 25 KHz a temperatura ambiente. En el caso de la EAM, se realizó a 70 °C durante 5 min con 25 KHz de frecuencia. La extracción híbrida (EA-U/M) se llevó a cabo por 25 min con una frecuencia de microondas de 2450 MHz y ultrasonido de 25 KHz. Los extractos obtenidos se filtraron con algodón y papel filtro para eliminar partículas sólidas, y el filtrado se almacenó en botellas de plástico protegidas de la luz, y se almacenaron a -18 °C hasta su uso (Hernández-Hernández *et al.*, 2020).

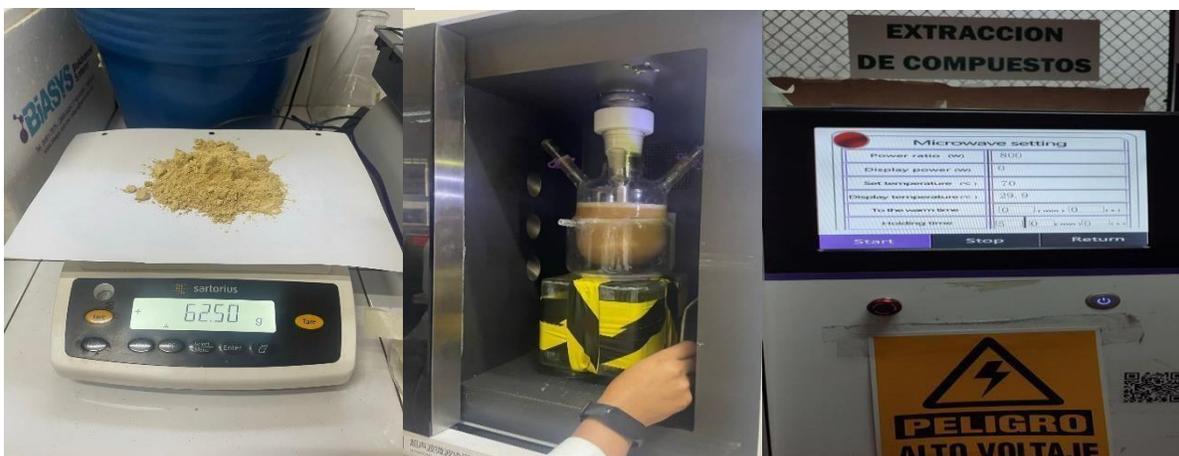


Figura 4. Obtención de los extractos a partir de la vaina de cascalote.

3.4 Separación y purificación mediante cromatografía en columna.

La separación y purificación parcial de la fracción rica en compuestos fenólicos de la vaina de cascalote se realizó empleando Amberlita XAD-16 (Fig. 5), tal como lo reportó AscacioValdés *et al.*, (2016). El extracto obtenido mediante EAU, EAM y EA-U/M se cargó en una columna de vidrio (3.7 x 50 cm) empacada previamente con la resina Amberlita XAD-16. Se usó agua destilada para eluir y descartar compuestos indeseables, tales como carbohidratos, lípidos y otras impurezas, posteriormente se empleó etanol para eluir y recuperar las moléculas retenidas en la resina, para de esta forma obtener la fracción de interés. La fracción fenólica se colocó en un rotavapor a 40 °C (Rotavapor® R-100) para eliminar el etanol y recuperar la muestra en forma de polvo fino, el cual se pesó y se almacenó en viales de 1.5 mL protegidos de la luz, en refrigeración. El peso registrado permitió determinar el rendimiento de cada sistema de extracción, y se reportó como mg de polifenoles totales/g de materia seca (mgPT/gms).



Figura 5. Separación y purificación de la fracción rica en compuestos fenólicos empleando Amberlita XAD-16.

3.5. Análisis químico

3.5.1 Fenoles Hidrolizables

La determinación del contenido de fenoles hidrolizables (FH) en los extractos de cascalote se realizó acorde a López-Cárdenas *et al.* (2023). Para ello, se resuspendió una cantidad conocida de extracto polifenólico en etanol absoluto, se tomaron 20 μL de dicho extracto y fueron mezclados con 20 μL de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich®, México) en una microplaca, después de 5 min. Se añadieron 20 μL de carbonato de sodio (0.01 Mol) y se dejó reposar por 5 min más. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 125 μL de agua destilada, y la absorbancia fue a 790 nm usando un espectrofotómetro de microplacas MULTISKAN GO (Thermo Scientific, Vantaa, Finlandia). Las muestras se analizaron por cuadruplicado y los resultados se expresaron como miligramos de equivalente de ácido gálico por gramo de materia seca (mg EAG gms^{-1}), a partir de una curva de calibración de ácido gálico ($0\text{-}200 \text{ mg L}^{-1}$) realizada por triplicado de forma independiente.

3.5.2. Fenoles Condensados

El contenido de fenoles condensados fue determinado de acuerdo con lo reportado por LópezCárdenas *et al.* (2023). En tubos de tapa roscada, se mezclaron 250 μL de muestra con 1500 μL de reactivo HCl-n-Butanol (10%), se agregaron 50 μL de reactivo férrico (FeCl_3). Los tubos se taparon y se colocaron en baño maría en ebullición durante 40 min. Pasado el tiempo, se colocaron los tubos a temperatura ambiente y se esperó el tiempo necesario para que la reacción bajara la temperatura. Finalmente, para la lectura, se colocaron 200 μL de cada tubo y se registró la absorbancia a 460 nm, usando un espectrofotómetro de microplacas MULTISKAN GO (Thermo Scientific, Vantaa, Finlandia). Las muestras se analizaron por cuadruplicado y los resultados se expresaron como miligramos de equivalente de catequina por gramo de materia seca (mg EC gms^{-1}), usando una curva de calibración de catequina (01000 mg L^{-1}) realizada por cuadruplicar de forma independiente.

3.5.3. Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales (FT) se obtuvo a partir de la suma del contenido de fenoles hidrolizables y el contenido de fenoles condensados y se expresó como miligramo por gramo de masa seca (mg gms^{-1}) (López-Cárdenas *et al.*, 2023).

3.5.4. Determinación de la capacidad antioxidante

Para determinación de capacidad antioxidante se prepararon soluciones de 50, 100, 150, 200,250, 300 y 350 mg L^{-1} , para dichas soluciones el extracto en polvo fue diluido en etanol absoluto.

3.5.4.1 Determinación por DPPH

Se utilizó el ensayo reportado por López-Cárdenas *et al.* (2023), se mezclaron 7 μL del extracto con 193 μL de DPPH (60 μM), se dejó reposar 30 min, a oscuridad, y se registró la absorbancia a 517 nm en un lector de microplacas MULTISKAN GO (Thermo Scientific, Vantaa, Finlandia).

3.5.4.2 Determinación por ABTS \bullet^+

Se utilizó el ensayo reportado por López-Cárdenas *et al.* (2023), se preparó el reactivo ABTS \bullet^+ (2.45 mL de ABTS 7 mM y 12.5 mL de persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 2.45 mM) y se incubó en oscuridad por 16 h. Posteriormente, se ajustó la absorbancia a 0.4 ± 2 a una

longitud de onda de 734 nm. Para el ensayo, se mezclaron 10 μL del extracto y 190 μL del reactivo ABTS \bullet^+ . Pasado un min de reacción, se registró la absorbancia en un lector de microplacas MULTISKAN GO (Thermo Scientific, Vantaa, Finlandia).

3.5.4.3 Expresión de resultados

Con los datos obtenidos para el ensayo DPPH y ABTS \bullet^+ , Los resultados fueron expresados de dos formas una de ellas fue como mg de equivalentes Trolox por gramos de materia seca (mgET mgs^{-1}), usando una curva de calibración de Trolox (0-2000 mg L^{-1}) realizada por triplicado de forma independiente.

La otra forma empleada para la expresión de resultados fue determinando el porcentaje de inhibición de ambos radicales, de acuerdo con la ecuación: % *Inhibición* = $100 - ((A_b - A_m) / A_b) \times 100$, donde A_b representa la absorbancia del control y A_m representa la absorbancia de cada muestra. Con los datos obtenidos se graficó la concentración del extracto vs % de inhibición, y se ajustaron a un modelo de regresión lineal, en el cual se despejó para determinar la concentración de extracto requerida para inhibir el 50% los radicales DPPH y ABTS \bullet^+ , conocida como IC_{50} (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008), realizada por cuadruplicado.

3.5.5 Determinación del perfil de compuestos presentes mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-MS)

El análisis para identificar los compuestos presentes en los extractos de vainas de cascalote se realizó mediante CG-MS, acorde a lo reportado por Proestos *et al.*, (2006). Para ello, 5 mg de muestra se disolvieron en 1 mL de agua desionizada. La muestra (2 μL) se inyectó en un equipo de cromatografía de gases (Varian Serie 01049) acoplado a un espectrómetro de masas (VARIAN/TEKMAR (450-GC) con detector FID y acoplado a espectrómetros de masas(220-Ms). En modo EI (impacto electrónico) con una energía de electrón fijada en 70 eV un rango de masas a m/z 25-700, con una columna capilar Factor Four VF-1ms (60 m 0.25 mm, 0.25 μm .). El inyector se fijó en 280 $^{\circ}\text{C}$ y el detector a 290 $^{\circ}\text{C}$. Se realizó GC con 1 min de tiempo splitless. El programa de temperatura fue el siguiente: de 70 a 135 $^{\circ}\text{C}$ con un aumento de 2 $^{\circ}\text{C}$ cada 1min, mantener durante 10 min, de 135 $^{\circ}$ a 220 $^{\circ}\text{C}$ con un aumento 4 $^{\circ}\text{C}$ cada min 1, mantener durante 10 min, desde 220 $^{\circ}$ a 270 $^{\circ}\text{C}$ con un aumento 3.5 $^{\circ}\text{C}$ cada 1 min y luego mantener durante 20 min. Se mantuvo el caudal de gas portador (helio) a 0.9

mL/min. La identificación de compuestos se realizó comparando los tiempos de retención con los de compuestos auténticos y los datos espectrales obtenidos de las bibliotecas del Software del equipo. Cada determinación se realizó por duplicado.

3.5.6. Análisis por espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR)

El extracto de polifenoles purificado se analizó mediante el equipo Agilent Cary 630 FTIR acoplado a un cristal de seleniuro de zinc (ZnSe) ATR siguiendo el protocolo de (BautistaHernández *et al.*, 2021). Las muestras se analizaron mediante el programa MicroLab PC en el rango de espectro entre 4000 a 650 cm^{-1} con un ciclo de 32 escaneos con una resolución de 2 cm. El análisis del espectro y los grupos funcionales detectados se llevó a cabo con el MicroLab Expert. Programa, y los gráficos se construyeron utilizando el programa OriginPro 8.

3.6. Análisis estadístico

Se planteó un Diseño Completamente al Azar para evaluar el sistema de extracción (EAM, EAU, EA-U/M) sobre el contenido de fenoles (hidrolizables, condensados y totales) y la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS^{•+}). Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) con el paquete estadístico SAS 9.0. Cuando fue necesario, se realizó la comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$). Todos los análisis se realizaron por cuadruplicado y se expresan como la media \pm su desviación estándar.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó el efecto del sistema de extracción (EAU, EAU y EA-U/M) sobre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante de extractos obtenidos a partir de vainas de cascalote. Adicionalmente, se determinó el perfil de compuestos mediante CGMS e IR. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

4.1. Obtención de extractos mediante EAU, EAM y EA-U/M

El rendimiento de la fracción rica en polifenoles obtenida por cada sistema de extracción se presenta en el cuadro 1.

Cuadro 1. Rendimiento de fracción rica en polifenoles obtenidos a partir de cascalote mediante EAU, EAM y EA-U/M.

Extractos	mgPT/gms
EA-U/M	0.26002 ± 0.001 ^a
EAU	0.24359 ± 0.002 ^c
EAM	0.25620 ± 0.001 ^b

Los valores son medias (n=3), Letras diferentes indican diferencia significativa entre sistema de extracción (Tukey, p<0.05). mgPT/gms: miligramos de peso total sobre gramos de muestra seca.

Como se puede observar, se obtuvieron rendimientos que van del 24 al 26 % de extracción. Sin embargo, la mayor recuperación de polifenoles a partir de la vaina de cascalote se obtiene al emplear el sistema de extracción híbrida (EA-U/M), con un valor de 260 mgPT/gms. Este valor es significativamente mayor al obtenido mediante EAM y EAU. Los resultados coinciden con lo descrito por Hernández-Hernández *et al.* (2020), quienes reportan que la extracción híbrida ofrece mayores rendimientos en extractos fenólicos usando cáscara de rambután, un comportamiento similar reportaron Garcia-Vaquero *et al.* (2020), quienes trabajaron extracciones con estas tecnologías en macroalgas.

4.2 Fenoles hidrolizables

El contenido de FH presentes en los extractos de vainas de cascalote obtenidos mediante los tres sistemas de extracción se presenta en la Fig. 6. Se presentaron diferencias significativas entre el sistema de extracción (p≤0.05). El valor más alto de FH se observó en EA-U/M

(176.07 mgEAG/gms), seguido de EAM y EAU, con valores de 161.43 y 131.87 mgEAG/gms).

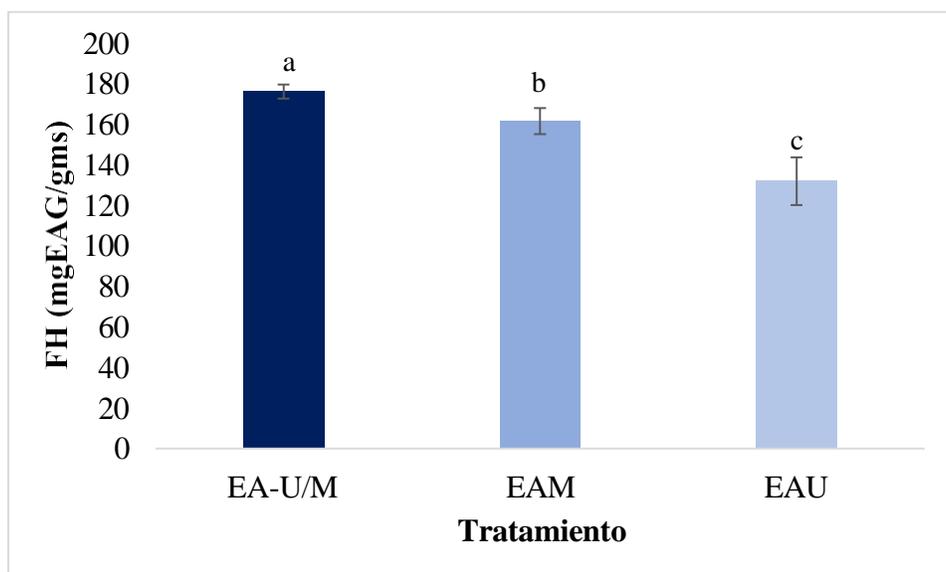


Figura 6. Contenido de FH en extracto de cascalote obtenido mediante EA-U/M, EAM y EAU. Las barras representan el promedio (n=4) de los valores evaluados \pm la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre sistema de extracción (Tukey, $P < 0.05$).

Este resultado se debe a que por el método híbrido se crea una mejor interacción entre las burbujas de cavitación y temperatura (Agudelo-Valencia *et al.*, 2022). Así se lleva un mejor incremento de compuestos fenólicos por el método híbrido en FH. En otro estudio ValeroMendoza *et al.* (2023) también reportaron un contenido de FH de 345.33 ± 72.03 mgEAG/g en un extracto de granada confirmando que en este extracto el mejor método de extracción fue el híbrido (Microondas y Ultrasonido). Como se mencionó anteriormente, el sistema EAU/M fue el mejor método de extracción en FH esto se debe a que este método presenta ventajas por la reducción en el tiempo de extracción, menor consumo de solventes y un mayor rendimiento, comparado con EAU y EAM por separado (Hernández-Hernández *et al.*, 2020).

4.3 Fenoles condensados

El contenido de FC presentes en los extractos de vainas de cascalote obtenidos mediante los tres sistemas de extracción se presenta en la Fig. 7. Se observó un efecto significativo debido al sistema de extracción ($p \leq 0.05$). Al igual que en FH, el valor más alto de FC se observó en

EA-U/M (45.34 mgEC/gms), siendo 1.73 y 3.76 veces superior al obtenido para los extractos de EAM y EAU, respectivamente.

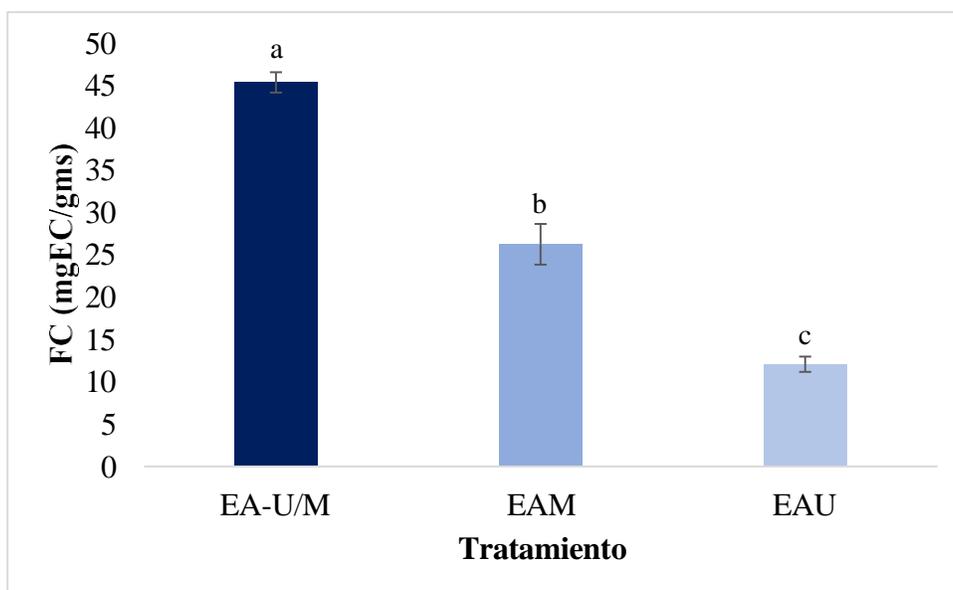


Figura 7. Contenido de FC en extracto de cascalote obtenido mediante EA-U/M, EAM y EAU. Las barras representan el promedio (n=4) de los valores evaluados \pm la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre sistema de extracción (Tukey, $p < 0.05$).

Se puede atribuir a que el método de extracción híbrido tiene más ventajas de reducir el tiempo de extracción y da mayor rendimiento comparado a los métodos convencionales (Hernández-Hernández *et al.*, 2020).

4.4 Análisis de fenoles totales

El contenido de FT presentes en los extractos de vainas de cascalote obtenidos mediante los tres sistemas de extracción se presenta en la Fig. 8. Se observó un efecto significativo debido al sistema de extracción ($p \leq 0.05$), idéntico al obtenido en FH y FC, con el mayor contenido de FT en el sistema EA-U/M (221.41 mg/gms), seguido de EAM y EAU (190.75 y 143.93 mg/gms, respectivamente). López-Cárdenas *et al.* (2023), Reportan FT (FH+FC) con un valor 58 mg gm^{-1} usando únicamente etanol al 50% como agente de extracción, en vainas de cascalote, tomando como referencia lo reportado por López-Cárdenas, el uso de EA-U/M, EAM y EAU representan un incremento significativo en FT.

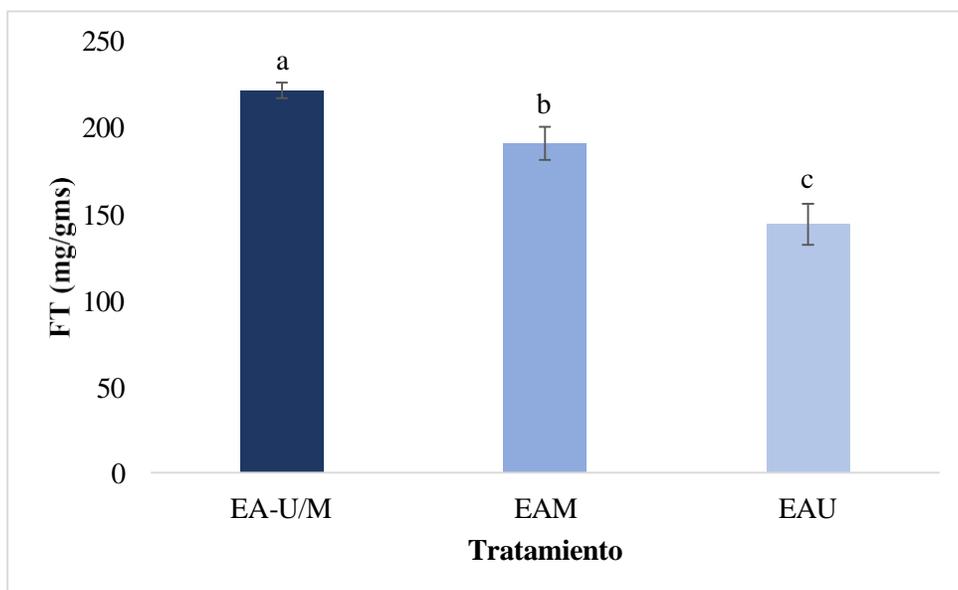


Figura 8. Contenido de FT en extracto de cascalote obtenido mediante EA-U/M, EAM y EAU. Las barras representan el promedio (n=4) de los valores evaluados \pm la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre sistema de extracción (Tukey, $P < 0.05$)

Con base en los resultados obtenidos se seleccionó el sistema híbrido de EA-U/M, ya que permite recuperar una mayor cantidad de FT a partir de las vainas de cascalote. Los extractos obtenidos a partir este sistema fueron empleados para determinar la capacidad antioxidante y el perfil de compuestos fenólicos.

4.5 Capacidad antioxidante del extracto de cascalote obtenido mediante EA-U/M

El extracto de cascalote obtenido mediante EA-U/M mostró capacidad antioxidante, con valores de 601.63 ± 7.49 y 534.77 ± 12.25 mgET/gms frente a los ensayos de DPPH y ABTS, respectivamente. En un proceso de extracción directa con etanol al 50% en vainas de cascalote, López-Cárdenas *et al.* (2023) reportaron valores de hasta 260 y 180 mgET/gms para DPPH y ABTS, respectivamente, Los valores obtenidos en el presente trabajo son 2.3 y 3.5 veces superiores, respectivamente, a los obtenidos por López-Cárdenas *et al.* (2023). Sin embargo, es importante considerar que en el presente estudio se trabajó con extractos parcialmente purificados mediante cromatografía en columna, mientras que López-Cárdenas *et al.*, (2023) emplearon los extractos crudos, sin purificación.

A menudo, el poder antioxidante de una muestra se determina con base en el IC_{50} , es decir, la concentración mínima requerida de la muestra para que esta reduzca la concentración inicial del radical en un 50 % (Munteanu & Apetrei, 2021). Se elaboró un gráfico a partir de la

determinación de la inhibición del radical DPPH y ABTS a diferentes concentraciones del extracto de cascalote, y los resultados se muestran en la figura 9 y 10.

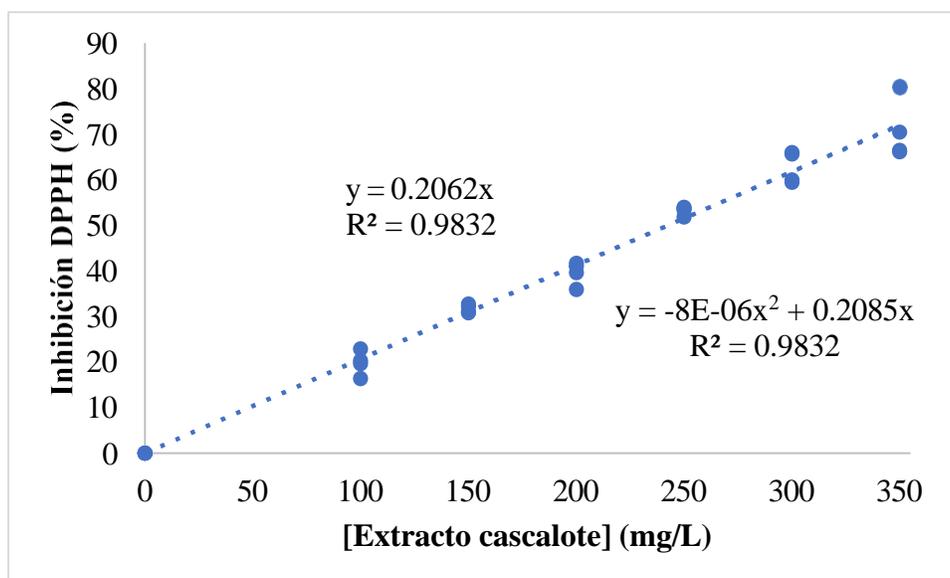


Figura 9. Efecto de la concentración de extracto de cascalote sobre la inhibición del radical DPPH (n=4). A partir de los datos mostrados en Fig. 9 y 10, se obtuvo el modelo de regresión lineal y polinomial, para revisar a cuál de ellos se ajusta mejor el comportamiento de los datos. Como se observa en las figuras, los datos presentaron un buen ajuste a ambos modelos, sin embargo, de acuerdo al coeficiente de determinación (R^2), el modelo lineal explica mejor la inhibición de ambos radicales por efecto de la concentración de extracto de cascalote (0.99 y 0.989 para DPPH y ABTS, respectivamente).

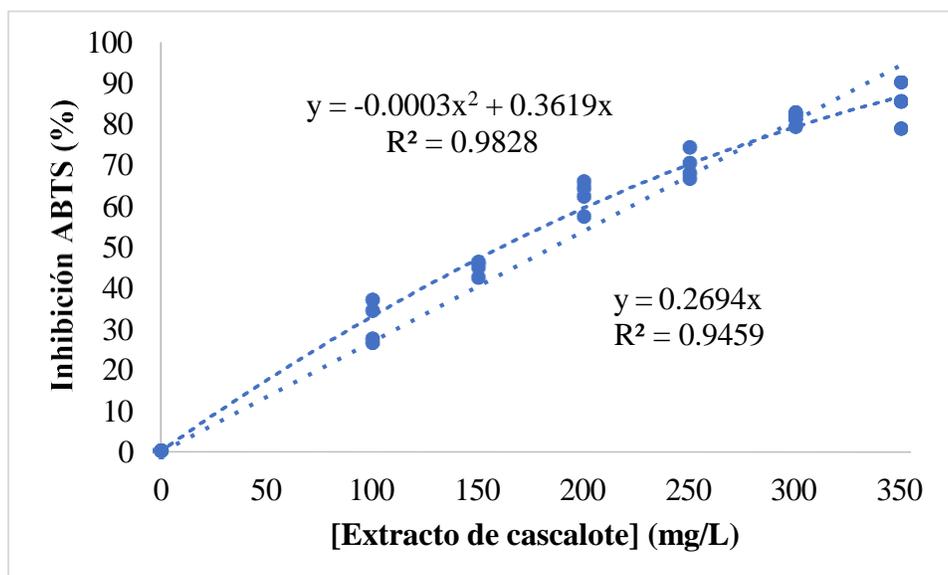


Figura 10. Efecto de la concentración de extracto de cascalote sobre la inhibición del radical ABTS (n=4).

Para obtener el IC_{50} , se resolvió el modelo para X (Concentración de extracto), dándole a Y (Inhibición del radical) el valor de 50. Los extractos de cascalote obtenidos mediante EAU/M presentaron valores de IC_{50} de 242.81 ± 10.74 mg/L en DPPH y de 186.6 ± 2.61 mg/L para el ensayo de ABTS. Janbandhu & Khan, (2022) reportaron valores de IC_{50} de 9.29 mg/L, frente al radical DPPH, con extractos etanólicos de *Caesalpinia coriaria*. La diferencia significativa del potencial antioxidante entre lo reportado por Janbandhu & Khan y el presente trabajo se puede atribuir a que ellos usaron extractos de la planta y en el presente trabajo del fruto. Estos extractos presentan un potencial antioxidante elevado derivado de que los extractos son ricos en Corilagin, que es un galotanino, que fue aislado de *Caesalpinia coriaria*, se encuentra de manera abundante en la planta entera, cuenta con la cualidad de reducir los radicales DPPH (Tabata *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2018).

4.6 Perfil de compuestos fenólicos por GC-MS

En la Figura 11 se muestra el espectro obtenido mediante la GC/MS, donde se detectaron tres compuestos presentes en el extracto de cascalote obtenido por EA-U/M (Cuadro 2).

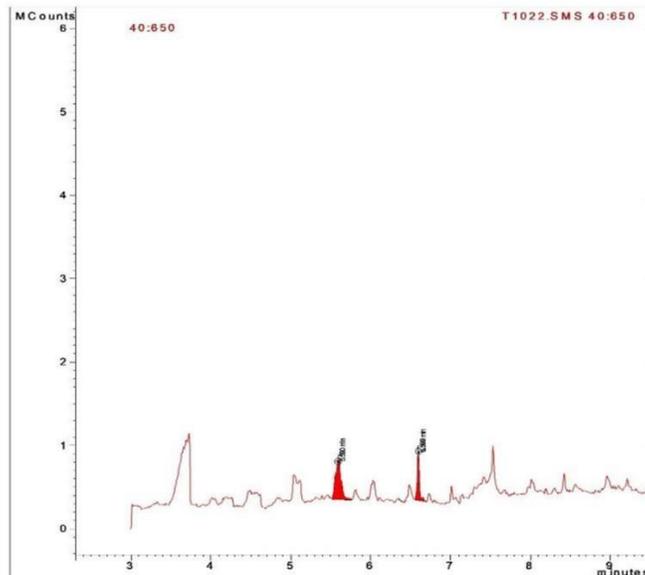


Figura 11. Espectro GC/MS del extracto de cascalote obtenido por EA-U/M.

Se observó un importante cambio entre el minuto 5.59; la información de la base de datos de software sugiere que el pico observado en este tiempo de retención corresponde 2-etil 1dodecanol. Este compuesto representa el 53% de los compuestos identificados, siendo así el compuesto mayoritario identificado durante el análisis. También se identificaron otros dos compuestos en un 32% 1-Eicosanol y en un 15% el Éster 3-metilfenólico del ácido butanoico. Rivera-Badal *et al.* (2021) realizaron un estudio de caracterización mediante GC/MS empleando polifenoles obtenidos a partir de cascalote mediante maceración con etanol-agua. Los autores reportaron que el pirogalol se encuentra en mayor proporción en el cascalote (más del 50%). No se encontraron coincidencias entre los compuestos identificados en el presente estudio y los reportados por Rivera-Badal, esto puede deberse al empleo de diferentes métodos de extracción, a las condiciones empleadas para el análisis cromatográfico o a las diferencias propias de la muestra dado el lugar de obtención de la misma. De igual forma, estas diferencias pueden deberse a los cambios propiciados por el fenómeno de la cavitación acústica y las altas temperaturas generadas por el método de extracción híbrido. Existe al menos una identificación con LC/MS, reportado por LópezCárdenas *et al.* (2023), quienes reportaron varios elagitaninos como el galagil-hexósido, lagerstannin B, geraniin y el corilagin que se encuentra en mayor abundancia, así como también ácidos hidroxibenzoicos (ácido elágico, ácido 5-O-galoilquínico y un derivado del ácido elágico).

Cuadro 2. Perfil de compuestos fenólicos encontrados en el cascalote.

#	TR	(M-H)	Compuesto	Formula	AR	%M
1	5.608	214	2-etil-1-dodecanol	C ₁₄ H ₃₀ O	1929000	53%
2	6.603	298	1-Eicosanol	C ₂₀ H ₄₂ O	1160000	32%
3	7.924	178	Éster 3-metilfenólico del ácido butanoico	C ₁₁ H ₁₄ O	531000	15%

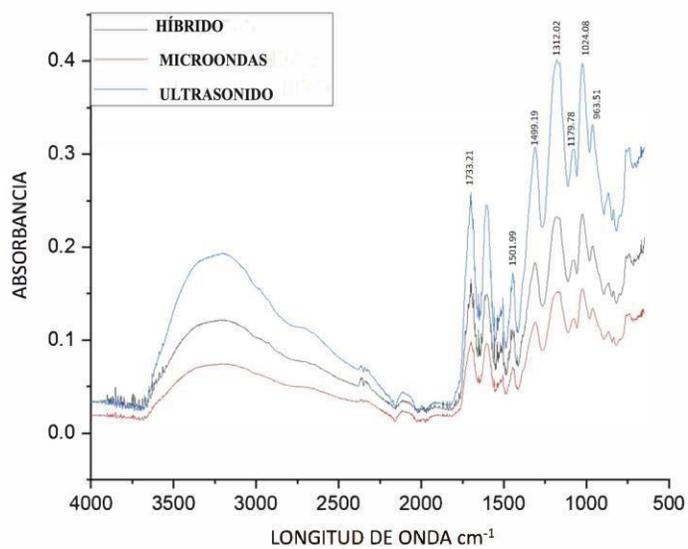
El compuesto 2-etil-1-dodecanol es el que se encuentra en mayor porcentaje con 53%, es un alcohol de cadena larga, y puede tener efecto antimicrobiano, lo cual ya ha sido atribuido al cascalote previamente. Por otra parte, el 1-Eicosanol se ha reportado como un compuesto antimicrobiano (Rodríguez-Magaña, 2011).

4.7 Análisis por espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR).

En la figura 12 podemos ver el análisis de espectroscopia infrarroja por transformadas por Fourier (FTIR) de los extractos, donde gráficamente observamos que el uso de EA-U/M, EAM y EAU no afecta la formación de picos representativos de distintos grupos funcionales, es decir no se aprecia alguna deformación de grupos ni generación de nuevos. Sin embargo, podemos observar una mayor concentración de moléculas dentro de los mismos grupos funcionales en el tratamiento EAU, seguida de EAM y con mejor cantidad EA-U/M. En los extractos podemos observar picos de absorción anchos en 3400.10, 2853.27 cm^{-1} y se encontraron picos intensos en 1733.21, 1501.99, 1499.19, 1312.02, 1179.78, 1024.08, 963.51 cm^{-1} , longitudes de vibración mayormente de los alquenos estos son de bajo peso molecular con los polifenoles tienen capacidad antioxidante. Las bandas por encima de 3000 cm^{-1} sugieren la presencia de insaturados =CH (alquenos, aromáticos), tenemos presencia de una banda a 3400.10 cm^{-1} es la característica de tensión O-H en los grupos fenólicos unidos al H. En la región de 800 a 1800 cm^{-1} quedan evidentes y marcados los picos que son típicos de las vibraciones por estiramientos C=O, aromáticos y C-O, se encuentran aproximadamente en 1612, 1509 y 1030 cm^{-1} . Los grupos fenólicos se pueden encontrar en la región aproximada entre 1315-1037 cm^{-1} , La denominada región de huella digital que abarca de 1400 a 600 cm^{-1} , en esta región encontraremos uniones simples C-C, C-N, C-O. Los datos actuales indicaron firmemente la participación de, polifenoles, carboxilo, grupos amino, los

cuales presentan similitud a lo reportado por Jeeva *et al.* (2014), quienes caracterizaron mediante FTIR extractos de plata de *Caesalpinia coriaria*.

Figura 12. Espectro FTIR del extracto de cascalote.



V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio evidenciaron que se pueden extraer fracciones de polifenoles a partir de *Caesalpinia coriaria*, empleando tecnologías verdes, EA-U/M, EAM y EAU. Se logró un mayor rendimiento empleando EA-U/M, el mismo sistema nos arrojó que el extracto presentó valores significativamente mayores para FH, FC y FT, en comparación con EAM y EAU. El extracto de cascalote obtenido mediante EA-U/M mostró una capacidad antioxidante de 601.63 ± 7.49 mgET/gms (DPPH) y 534.77 ± 12.55 mgET/gms (ABTS) con valores de IC_{50} de 242.81 y 186.6 mg/L para DPPH y ABTS, respectivamente. El análisis mediante GC/MS permitió la identificación de tres compuestos: 1-Eicosanol, éster de 3-metilfenilo del ácido butánico y 2-etil 1-dodecanol. Finalmente, la determinación de FTIR nos arrojó que el uso de los métodos de extracción (EA-U/M, EAM y EAU), no generó modificación ni generación de grupos funcionales, dado que los tres extractos presentaron las mismas señales en los grupos funcionales pertenecientes al hidroxilo y carbonilo, los cuales forman parte fundamental en la estructura de compuestos bencénicos pertenecientes a compuestos fenólicos y alifáticos.

VI. LITERATURA CITADA

Anandhi, D., Srinivasan, P., Praveen G. & Jagatheesh. S. (2014). Influence of flavonoids and glycosides from *Caesalpinia coriaria* (Jacq) Wild as bactericidal compound. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. ISSN: 2319-7706 Volume 3 Number 4 (2014) pp. 1043-1051. <https://www.ijcmas.com/vol-3-4/D.Anandhi,%20et%20al.pdf>

Ascacio-Valdés, J. A., Buenrostro-Figueroa, J. J., Aguilera-Carbo, A., PradoBarragán, A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2011). Ellagitannins: biosynthesis, biodegradation and biological properties. *J. Med. Plants Res*, 5(19), 4696-4703.

Ascacio-Valdés, J. A., Aguilera-Carbó, A. F., Buenrostro, J. J., Prado-Barragán, A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2016). The complete biodegradation pathway of ellagitannins by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *Journal of basic microbiology*, 56(4), 329-336.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., et al., (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>

Bandar, H., Hijazi, A., Rammal, H., Hachem, A., Saad, Z., & Badran, B. (2013). Techniques for the extraction of bioactive compounds from Lebanese *Urtica Dioica*. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 1(6), 507-513.

Bautista-Hernández, I., Aranda-Ledesma, N. E., Rojas, R., Tafolla-Arellano, J. C., & Martínez-Ávila, G. C. (2021). Antioxidant activity of polyphenolic compounds obtained from *Euphorbia antisiphilitica* by-products. *Heliyon*, 7(4).

Cano y Postigo, L. O., Jacobo-Velázquez, D. A., Guajardo-Flores, D., Garcia Amezcuita, L. E., & García-Cayuela, T. (2021). Solid-state fermentation for enhancing the nutraceutical content of agrifood by-products: Recent advances and its industrial feasibility. *Food Bioscience*, 41, 100926. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100926>

Cravotto, G., Mariatti, F., Gunjevic, V., Secondo, M., Villa, M., Parolin, J., & Cavaglia, G. (2018). Pilot scale cavitation reactors and other enabling technologies to design the industrial recovery of polyphenols from Agro-food by-products, a technical and economical overview. *Foods* (Basel, Switzerland), 7(9), 130. <https://doi.org/10.3390/foods7090130>

Garcia-Vaquero, M., Ummat, V., Tiwari, B., & Rajauria, G. (2020). Exploring ultrasound, microwave and ultrasound–microwave assisted extraction technologies to increase the extraction of bioactive compounds and antioxidants from brown macroalgae. *Marine drugs*, 18(3), 172.

Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M. Á., Ponce-Pardo, J., & Zarzosa-Norabuena, E. (2015). Evaluación de la técnica 2, 2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte medico (lima)*, 15(1), 57-60.

Hernández-Hernández, C., Aguilar, C. N., Flores-Gallegos, A. C., Sepúlveda, L., Rodríguez-Herrera, R., Morlett-Chávez, J., ... & Ascacio-Valdés, J. (2020). Preliminary testing of ultrasound/microwave-assisted extraction (U/M-AE) for the isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* L. (Mexican variety) peel. *Processes*, 8(5), 572.

Janbandhu, S. J., & Khan, Z. S. (2022). Antioxidant And Antibacterial Activities Of Important Medicinal Plants Of Family Caesalpiniaceae. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 516-521.

Jeeva, K., Thiyagarajan, M., Elangovan, V., Geetha, N., & Venkatachalam, P. (2014). *Caesalpinia coriaria* leaf extracts mediated biosynthesis of metallic silver nanoparticles and their antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Industrial Crops and Products*, 52, 714-720

Kataoka, H. (2003). New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(4), 232-244.

Khanbabaee, K.; van Ree, T. (2001). Tannins: Classification and Definition. *Natural Product Reports* 18 (6), 641-649.

Li, X., Deng, Y., Zheng, Z., Huang, W., Chen, L., Tong, Q., & Ming, Y. (2018). Corilagin, a promising medicinal herbal agent. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 99, 43-50.

López-Alarcón, C. & Denicolab, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta.*, 763, 1-10.

López-Cárdenas, F., Ochoa-Reyes, E., Baeza-Jiménez, R., Tafolla-Arellano, J. C., Ascacio-Valdés, J. A., & Buenrostro-Figueroa, J. J. (2023). Solid-State Fermentation as a Sustainable Tool for Extracting Phenolic Compounds from Cascalote Pods. *Fermentation*, 9(9), 823.

Mora-Santacruz, A., Roman-Mirando, M., González-Cuevas, G., & BarrientosRamirez, L. (2018). Chemical composition of cascalote *Caesalpinia coriaria* (Jacq.) Willd. and diversity of uses in the rural areas of dry tropics. *Revista de Investigación y Desarrollo*, 4(12), 24-28.

Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3380.

Olivas-Aguirre, F. J., Wall-Medrano, A., González-Aguilar, G. A., López-Díaz, J. A., Álvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L. A., & Ramos-Jimenez, y. A. (s/f). Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutricion hospitalaria: organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral*. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.7699>

Olmedo-Juárez, A., Briones-Robles, T. I., Zaragoza-Bastida, A., Zamilpa, A., OjedaRamírez, D., de Gives, P. M., ... & Rivero-Perez, N. (2019). Antibacterial activity of compounds isolated from *Caesalpinia coriaria* (Jacq) Willd against important bacteria in public health. *Microbial pathogenesis*, 136, 103660.

Palasap, A., Limpai boon, T., Boonsiri, P., Thapphasaraphong, S., Daduang, S., Suwannalert, P., & Daduang, J. (2014). Cytotoxic effects of Phytophenolics from *Caesalpinia mimosoides* Lamk on cervical carcinoma cell lines through an apoptotic pathway. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(1), 449-454.

Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food research international*, 41(3), 274-285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.004>.

Proestos, C., Boziaris, I. S., Nychas, G. J., & Komaitis, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food chemistry*, 95(4), 664-671.

Quiroz-Alcívar, K. M. (2022). Efectos de cuatro sustratos en el crecimiento de *Caesalpinia coriaria* (Jacq.) Willd. y *Albizia saman* (Jacq.) Merr., en condiciones de vivero [Tesis de Licenciatura no publicada] Universidad Estatal del sur Manabí.

Rivera-Badal, M. E., Pantoja-Castro, M. A., López-Lázaro, J. S., del Ángel-Meraz, E., & López-Villarreal, F. (2021). Análisis del efecto del solvente en la extracción de compuestos polifenólicos del fruto del cascalote. *RINDERESU*, 5(2).

Rodríguez Magaña, M. P. (2011). Aislamiento y caracterización de compuestos derivados de plantas de la familia juglandaceae con efecto antimicrobiano sobre *Mycobacterium tuberculosis* [Tesis de Doctorado no publicada]. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Rodríguez-Ruiz, M. de L. & Palma-García, J. M. (2018). Selección y consumo de harinas de frutos de árboles nativos tropicales por ovinos. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 22(1), 59-60.

Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012(2), 119-128.

Sánchez-Carranza, J. N., Alvarez, L., Marquina-Bahena, S., Salas-Vidal, E., Cuevas, V., Jiménez, E. W., ... & González-Maya, L. (2017). Phenolic compounds isolated from *Caesalpinia coriaria* induce S and G2/M phase cell cycle arrest differentially and trigger cell death by interfering with microtubule dynamics in cancer cell lines. *Molecules*, 22(4), 666.

Sharma, K., Kumar, V., Kaur, J., Tanwar, B., Goyal, A., Sharma, R., ... & Kumar, A. (2021). Health effects, sources, utilization and safety of tannins: A critical review. *Toxin Reviews*, 40(4), 432-444.

Sirohi, R., Tarafdar, A., Singh, S., Negi, T., Gaur, V. K., Gnansounou, E., & Bharathiraja, B. (2020). Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery. *Bioresource Technology*, 314(123771), 123771. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123771>

Tabata, H., Katsube, T., Tsuma, T., Ohta, Y., Imawaka, N., & Utsumi, T. (2008). Isolation and evaluation of the radical-scavenging activity of the antioxidants in the leaves of an edible plant, *Mallotus japonicus*. *Food chemistry*, 109(1), 64-71.

Torres-León, C., Chávez-González, M. L., Hernández-Almanza, A., MartínezMedina, G. A., Ramírez-Guzmán, N., Londoño-Hernández, L., & Aguilar, C. N. (2021). Recent advances on the microbiological and enzymatic processing for conversion of food wastes to valuable bioproducts. *Current Opinion in Food Science*, 38, 40-45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.11.002>

Valero-Mendoza, A. G., Meléndez-Rentería, N. P., Chávez-González, M. L., Flores-Gallegos, A. C., Wong-Paz, J. E., Govea-Salas, M., ... & Ascacio-Valdés, J. A. (2023). The whole pomegranate (*Punica granatum*. L), biological properties and important findings: A review. *Food Chemistry Advances*, 2, 100153.

Vélez-Terranova, M., Gaona, R. C., & Sánchez-Guerrero, H. (2014). Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17(3), 489-499.

Veloz-García, R., Marín-Martínez, R., Veloz-Rodríguez, R., Rodríguez-Guerra, R., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M. M., ... & Guevara-González, R. G. (2010). Antimicrobial activities of cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) phenolics-containing extract against fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Industrial crops and products*, 31(1), 134138.

Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.

Wong-Paz, J. E., Aguilar-Zárate, P., Veana, F., & Muñiz-Márquez, D. B. (2020). Impacto de las tecnologías de extracción verdes para la obtención de compuestos bioactivos de los residuos de frutos cítricos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 23(1), 1-11.

Yepes-Betancur, D. P., Márquez-Cardozo, C. J., Cadena-Chamorro, E. M., MartínezSaldarriaga, J., Torres-León, C., Ascacio-Valdes, A., & Aguilar, C. N. (2021). Solid-state fermentation – assisted extraction of bioactive compounds from hass avocado seeds. *Food and Bioproducts Processing*, 126, 155-163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.10.012>

Zhang, Y., Lei, Y., Qi, S., Fan, M., Zheng, S., Huang, Q., & Lu, X. (2023). Ultrasonicmicrowave-assisted extraction for enhancing antioxidant activity of *Dictyophora indusiata* polysaccharides: The difference mechanisms between single and combined assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 95, 106356. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106356>