

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y
ARTES DE CHIAPAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN Y
ALIMENTOS**

**ELABORACIÓN DE
TEXTO**

**MANUAL METODOLÓGICO PARA
LA EXTRACCIÓN DE
METABOLITOS SECUNDARIOS EN
CEREALES**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADA EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

MARIANA GABRIELA CHAPA BARRIOS

DIRECTOR DE TESIS

DR. GILBER VELA GUTIÉRREZ





UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
DIRECCION DE SERVICIOS ESCOLARES
DEPARTAMENTO DE CERTIFICACION ESCOLAR



Autorización de Impresión

Lugar y Fecha: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, 19 de junio de 2023

C. Mariana Gabriela Chapa Barrios

Pasante del Programa Educativo de: Ciencia y Tecnología de Alimentos

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:
Manual metodológico para la extracción de metabolitos secundarios en cereales

En la modalidad de: Elaboración de Texto

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

Revisores

Mtra. Erika Judith López Zúñiga

Dra. Veymar Guadalupe Tacias Pascacio

Dr. Gilber Vela Gutiérrez

Firmas



COORDINACIÓN
DE TITULACIÓN

CONTENIDO

Introducción	1
Justificación.....	2
Objetivos	3
Marco Teórico	4
Los Cereales	4
Metabolitos Secundarios (MS).....	14
Métodos de extracción.....	19
Metodología	26
Resultados	28
Conclusiones.....	29
Glosario	30
Referencias Documentales	33
Anexos.....	38
Métodos de extracción de metabolitos secundarios.....	48
Determinación cuantitativa de metabolitos secundarios específicos	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la morfología de las semillas (Latham, 2002).....	5
Figura 2. Mapa de las principales zonas agrícolas a nivel mundial, prehispanicas y actuales (Díaz Guillén, 2010).	10
Figura 3. Representación de la evolución morfológica del maíz (<i>Zea mays</i>) (Latham, 2002).	11
Figura 4. Producción mundial de cereales en la campaña 2022/23 (FAO 2023).....	12
Figura 5. Principales productores de cereales	12
Figura 6. Principales consumidores de trigo y maíz.....	13
Figura 7. Principales consumidores de arroz.	13
Figura 8. Estructura básica del grupo de los flavonoides (Sotero, 2011).....	16
Figura 9. Estructura de algunos monoterpenos (Sotero, 2011).	18
Figura 10. Estructura química de algunos alcaloides (Gatto, 2018).	19
Figura 11. Esquema del equipo Soxhlet (Reyes-Vargas, 2018).	20
Figura 12. Esquema de un sistema de destilación por arrastre de vapor (Domínguez, 1990).	21
Figura 13. Longitud de distintas ondas electromagnéticas (Collins, 2008).....	23
Figura 14. Energía necesaria para romper distintos tipos de enlace (eV) (Collins, 2008). ...	24
Figura 15. Diagrama de obtención de un fluido supercrítico (Reyes-Vargas, 2018).....	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aporte nutricional de diversos productos a base de cereal.	6
Tabla 2. Energía cuántica de distintas ondas electromagnéticas	23
Tabla 3. Temperatura y presión críticas de distintos compuestos.	25

INTRODUCCIÓN

Los cereales han sido un alimento básico desde la implementación de la agricultura. Los principales cereales utilizados en la alimentación humana son el trigo (*Triticum vulgare*), la cebada (*Hordeum vulgare*), el arroz (*Oryza sativa*), el maíz (*Zea mays*), el centeno (*Secale cereale*) y la avena (*Avena sativa*), que pertenecen a la familia de las gramíneas. Su cultivo marcó una nueva etapa en la historia, donde los hombres pasaron de ser nómadas, recolectar frutos y cazar animales salvajes a ser sedentarios y aplicar prácticas de agricultura y ganadería (Serra *et al.*, 2010).

Todas las plantas, como los cereales, realizan funciones fisiológicas que implican rutas metabólicas para la síntesis de sustancias y procesos vitales, como la respiración o fotosíntesis. Además las plantas son capaces de producir compuestos derivados de un metabolismo secundario. Se conocen como metabolitos secundarios a los alcaloides, taninos y aceites esenciales que son producidos por una planta pero no participan de manera directa en los procesos de crecimiento, desarrollo o reproducción (Almaraz *et al.*, 2008).

Los compuestos secundarios son de gran importancia, tanto para la planta misma, como para otros organismos, como los humanos. Dichos compuestos son conocidos por sus propiedades antiinflamatorias, cicatrizantes, coagulantes y son útiles para la prevención de enfermedades como el cáncer de mama, endometrio, próstata. Además tienen propiedades antioxidantes. Asimismo, pueden ayudar a disminuir el colesterol y con ello reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Aponte *et al.*, 2008).

Por lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo recopilar datos de diversas fuentes donde se describa el procedimiento necesario para realizar la extracción de metabolitos secundarios (fenoles, flavonoides, saponinas, alcaloides y taninos), que se encuentran en material vegetal estudiado, compilando la información recolectada en un manual metodológico que describa los materiales y equipo necesarios para realizar las extracciones en granos de cereales utilizando diversos métodos para proporcionar un antecedente al desarrollo de productos a base de cereales. Disponible para cualquier estudiante de la licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos o cualquier persona interesada en obtener metabolitos secundarios de cereales para su aprovechamiento.

JUSTIFICACIÓN

Los cereales han sido la base de la alimentación humana desde que se tiene conocimiento de la agricultura. Como parte de su fisiología, los cereales, como muchas otras plantas, generan compuestos que pueden ser utilizadas por el ser humano para la prevención de ciertas enfermedades. Algunos tienen propiedades antiinflamatorias, antiulcerosas, previenen la degeneración de las células, pueden ser empleados como antidiarreicos e incluso pueden prevenir ciertos tipos de cáncer como el de mama, endometrio y próstata (Jiménez, 2018).

Los compuestos fitoquímicos que destacan en los granos son los terpenos (carotenoides, fitoesteroles, capsiacina, etc.), fenoles (isoflavonas, flavonoides, entre otros) y tioles (compuestos organosulfurados) (Aponte et al., 2008).

Este trabajo tiene la finalidad de presentar la metodología necesaria para realizar la extracción de metabolitos secundarios de cereales (maíz, cebada, trigo, centeno, etc.) describiendo diferentes técnicas de extracción convencionales (destilación por arrastre de vapor, con equipo Soxhlet, por maceración) y no convencionales (extracción asistida por microondas, asistida por ultrasonido y por fluidos supercríticos), con el objetivo de conocer qué tipo de metodologías existen para poder elegir la que mejor se acomode a las necesidades y recursos de la investigación de metabolitos secundarios presentes en los granos estudiados, para así aprovechar los extractos obtenidos de manera eficiente, para poder diversificar productos que utilicen como materia prima los cereales y brindar innovación al mercado con un producto funcional.

OBJETIVOS

General

Elaborar un manual que recopile la metodología necesaria para la extracción de metabolitos secundarios (fenoles, flavonoides, saponinas, alcaloides y taninos) de cereales, con técnicas convencionales (destilación por arrastre de vapor, con equipo Soxhlet, por maceración) y no convencionales (extracción asistida por microondas, asistida por ultrasonido y por fluidos supercríticos).

Específicos

Recopilar información sobre el aprovechamiento de metabolitos secundarios de cereales.

Organizar información relevante sobre metodologías de extracción, aplicadas a cereales.

Describir los pasos necesarios para conseguir extractos de tipo acuosos, etanólicos y metanólicos para la obtención de mayor concentración de metabolitos secundarios.

MARCO TEÓRICO

LOS CEREALES

Antecedentes

Los cereales hoy en día son cultivados en todos los continentes del planeta. Su producción depende de la demanda y las facilidades agrícolas de cada país, pero la presencia de los cereales inició aproximadamente desde el año 5000 a.C con la cosecha de granos de maíz (en Mesoamérica antes de la llegada de los europeos), de arroz (en Asia) y de cebada (en África) y han caracterizado la evolución social y económica mundial (Rosales, 2000).

Son fuente importante de energía y se pueden consumir de diferentes formas: en grano entero (por ejemplo, el arroz), en forma de harina para la obtención de productos fundamentales como el pan y las tortillas o incluso, en forma de bebidas alcohólicas como la cerveza o el whiskey (Díaz, 2017).

Morfología de cereales

El ciclo vital de las plantas, en su fase de reproducción sexual, abarca la formación de estructuras que contienen un pequeño embrión. Este embrión se origina de la división celular de la ovocélula que es fertilizada por el núcleo espermático del polen. El embrión, envuelto en el tegumento derivado del óvulo es la unidad de dispersión, conservación y reproducción de la especie; la cual se le denomina semilla (Paucar, 2014).

Se conocen como cereales a los granos o semillas protegidos en su planta por una cubierta o vainas. Cada grano se conforma de cuatro partes: el germen; el interior feculento, el cual representa la mayor parte del grano; las capas exteriores, donde se almacenan los nutrientes, y la cáscara fibrosa (García, 2001).

Los elementos básicos de la estructura de una semilla son, la cáscara de celulosa, que no tiene valor nutritivo; el pericarpio y la testa, dos capas fibrosas con poco valor nutritivo; la capa de aleurona, rica en proteínas, vitaminas y minerales; el embrión o germen, que consiste en la plúmula y la radícula unidas a la semilla por el cotiledón; y el endospermo que abarca más del 50 por ciento del grano; como se observa en la figura 1. La parte del endospermo y la aleurona están formadas por células de paredes delgadas que varían de tamaño, forma y

composición en las diferentes partes de estos, principalmente compuestos por almidón y proteína respectivamente. Las células de la aleurona son pequeñas y de forma cúbica y contienen mayoritariamente proteína. No contienen gránulos de almidón, en cambio tienen alto contenido de proteína (20%), aceite (20%) y minerales como ácido fítico (20%). La capa del endospermo juega un papel muy importante durante la germinación de la semilla pues se sintetizan las enzimas correspondientes para desdoblar los compuestos del endospermo. En procesos de molienda y obtención de harinas, dicha capa es removida para obtener harinas más blancas (Latham, 2002).

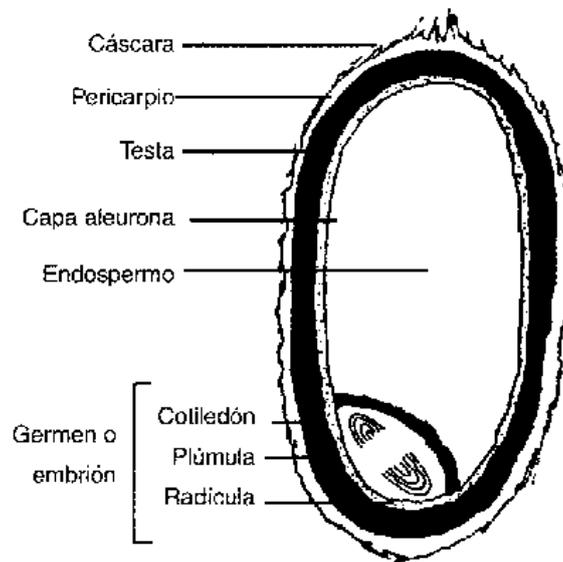


Figura 1. Esquema de la morfología de las semillas (Latham, 2002).

Componentes fisicoquímicos de los cereales

La composición de los cereales es distinta no solo de una especie a otra, sino que depende de la variedad dentro de la misma especie y las condiciones de desarrollo como son el suelo o el clima (Díaz, 2017).

La mayoría de los cereales tienen un valor nutritivo similar. Se conoce que 100 g de grano entero aportan 350 kcal, 8 a 12 g de proteína y cantidades disminuidas de calcio y hierro. En la tabla 1 se puede observar el aporte nutricional, así como los porcentajes de macromoléculas y vitaminas con las que cuentan distintos productos elaborados a base de cereales.

Tabla 1. Aporte nutricional de diversos productos a base de cereal.

Alimento	Energía (Kcal)	Proteína (g)	Grasa (g)	Calcio (mg)	Hierro (mg)	Tiamina (mg)	Riboflavina (mg)	Niacina (mg)
Harina de maíz entera	353	9.3	3.8	1	2.5	0.30	0.10	1.8
Harina de maíz refinada	368	9.4	1.0	3	1.3	0.26	0.08	0.10
Arroz pulido	361	6.5	1.0	4	0.5	0.08	0.02	1.5
Arroz precocido	364	6.7	1.0	7	1.2	0.20	0.08	2.6
Trigo entero	323	1.6	1.8	36	4.0	0.30	0.07	5.0
Harina de trigo blanca	341	9.4	1.3	15	1.5	0.10	0.03	0.7
Mijo, var. junco	341	10.4	4.0	22	3.0	0.30	0.22	1.7
Sorgo	345	10.7	3.2	26	4.5	0.34	0.15	3.3

Fuente: Latham, 2002.

Las proteínas varían según el cereal y la variedad, además dependen de las condiciones de cultivo como la fertilidad del suelo y el rendimiento del grano. Las proteínas de mayor calidad son las del arroz, pero es la avena la de mayor porcentaje. En cuanto a los lípidos suponen entre el 1 y el 4% de la energía, con la excepción que la avena supera el 6%. El perfil lipídico de los cereales es muy bueno porque la mayoría son ácidos grasos insaturados, adicionalmente, como cualquier alimento vegetal, carecen de colesterol. Para tener una dieta equilibrada es necesario complementar el consumo de cereales con alimentos ricos en proteínas, minerales, vitamina A y C (Ibarra, 2010).

Los cereales integrales contienen gran cantidad de vitaminas del grupo B (B1, B2, niacina, B5, B6) y minerales (hierro, magnesio, fósforo, manganeso y zinc). Sin embargo, la distribución de estos nutrientes es muy desigual entre las distintas partes del grano (se concentran en el germen y el salvado). En su estado seco los granos de cereal carecen de vitamina C y caroteno o provitamina A (excepto el maíz), lo que es fundamental tener en cuenta al elegir la versión del cereal que vayamos a consumir (Ramos, 2013).

Los cereales son clasificados como alimentos almidonados puesto que todos ellos contienen más del 60% de almidón, totalmente digeribles para el sistema digestivo humano. Los polímeros de almidón, conformados por unidades de glucosa, hacen que los cereales se consideren como principales fuentes de energía. El segundo grupo de compuestos más abundantes en los granos son las proteínas, casi todos los cereales contienen entre 8 y 20% de proteína (Verdini, 2018).

Los granos de cereales más consumidos son el maíz, el trigo y el arroz, pero también resultan importantes la avena, la cebada, el centeno, el teff, la quinoa y el mijo (Ramos, 2013). Son los principales cultivos a nivel mundial ya que la dieta de la mayoría de los pueblos del mundo se basa en estos alimentos pues satisfacen más del 50% de las necesidades energéticas de forma directa en el metabolismo humano. Sin embargo, el consumo de cereales predomina en países en desarrollo, al constituir el 70% del consumo energético recomendado, siendo que en Europa y otros países de América abarca únicamente el 40%. Los granos constituyen una parte fundamental de la alimentación humana. Proveen sustancias indispensables para nuestra vida como los carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales. Principalmente proporcionan carbohidratos y proteínas. En menor proporción aportan vitaminas, minerales, fibra y lípidos, especialmente si se consumen enteros (Verdini, 2018).

Actualmente se conoce que los alimentos poseen numerosos compuestos bioactivos beneficiosos para la salud. Entre ellos, diversos componentes de la fibra con un papel prebiótico como los fructanos o los β -glucanos, y compuestos antioxidantes como carotenoides y compuestos fenólicos presentes en alimentos de origen vegetal como frutas, hortalizas, cereales y legumbres, y compuestos correspondientes a la fracción lipídica en aceites.

Algunos de los antioxidantes mencionados son responsables del color de los alimentos como los colores amarillos, naranjas, y rojizos de frutas y hortalizas debidos a carotenoides o colores azulados y violetas debido a compuestos fenólicos. En los cereales se encuentran colores variados como tostados, amarillos en granos como el maíz, el trigo o la cebada o incluso azul-morado en diferentes variedades de maíz. Todos estos compuestos pueden representar numerosos beneficios para la salud (Díaz, 2017).

Historia de los cereales

Los cereales son un grupo de plantas dentro de la familia de las gramíneas; plantas monocotiledóneas de tallo cilíndrico, nudoso y generalmente hueco, hojas alternas que abrazan el tallo, flores agrupadas en espigas o en panojas y grano seco cubierto por las escamas de la flor. La semilla y el fruto son básicamente la misma cosa (Sánchez-Ken, 2019).

Debido a su importante aporte de nutrientes y energía en la alimentación humana, e incluso animal, los cereales han sido venerados por las diversas culturas alrededor del mundo desde la implementación de la agricultura. El término “Cereales” proviene del nombre de la diosa romana de la agricultura “Ceres”, que a su vez proviene del latín *crescere*, que significa “crecer”. Ceres era considerada la salvia misma que sale de la tierra, que se eleva y da vida a los brotes, hace madurar el trigo y amarillea las cosechas (Pérez Diestre, 2017).

En la antigua Grecia era la diosa Deméter, quien no solo enseñó a los hombres el cultivo de los cereales, sino también la tecnología de su panificación y el sacrificio que utiliza el hombre para relacionarse con la divinidad como ofrenda de tipo alimentario. Se presenta como la Madre Tierra humanitaria. Personifica tanto la fertilidad como la riqueza agraria. Era considerada como la inventora de los cereales (Barea, 2010).

En el antiguo Egipto, Osiris era reconocido como el dios de los cereales, la fertilidad y fungía como juez en el mundo de los muertos. Se representaba gráficamente en forma de momia con la piel negra y verdosa. El color negro representaba la fertilidad de la tierra, mientras que el color verde simbolizaba a la vegetación. Se creía que, al sepultar una efigie suya en la tierra, hecha de granos de cereal y de tierra, Osiris regresaba al mundo en la siguiente cosecha. Era concebido como energía creadora que aseguraba la germinación de las cosechas. Se decía que, al intervenir en el mundo de la muerte, podía convertir los cuerpos enterrados en nuevas cosechas y nueva vida. Era un emblema de resurrección (Evia, 2020).

Las culturas mesoamericanas prehispánicas conceptualizaban al maíz como una fuente de vida misma. Las distintas culturas en Mesoamérica tenían relaciones diversas con el maíz. Sin embargo, en todas ellas, el maíz, al ser considerado como sustento de la vida, era elevado al grado de deidad que debía ser venerada. En este sentido, la relación de estas culturas con el maíz puede describirse como una relación de reciprocidad al necesitarse mutuamente para su supervivencia.

Para los olmecas, Quetzalcóatl fue la manifestación del dios de maíz en un principio. Después representaron a los distintos procesos biológicos de la planta de maíz como etapas sagradas del dios de maíz. De 1150 al 500 a.C., el cultivo principal era el maíz y significaba fertilidad, renacimiento y abundancia (Florescano, 2002).

En la cultura maya el Popol Vuh narra la historia de Jun Junajpú, quien desciende al Xibalbá junto con su hermano, para rescatar a su padre; quien, a su vez, renace de la tierra en forma de dios del maíz. Realizaban ceremonias de siembra y cosecha del maíz para que la Madre Tierra les otorgara un cultivo abundante (González Torres, 2007).

Los mexicas se caracterizaban por contar con una cosmovisión amplia con respecto a la relación de elementos comunes con deidades. Estas representaban todo lo que era importante económica y culturalmente, así como desde el punto de vista alimenticio. Entre las deidades más sobresalientes se encuentran los dioses del maíz. Cintéotl representaba a la mazorca (*cintli* en náhuatl) pero había distintas representaciones del maíz según su variedad y la etapa de desarrollo de la planta, como Tlatlahquicinteotl, representación del maíz rojo; Iztahquicinteotl, representación del maíz blanco; Chicomecóatl, representación de la planta de maíz joven; e Ilamatecuhitl, representación de la planta de maíz madura (Broda, 2013).

Producción mundial de cereales

La implementación de la agricultura introdujo consigo dos prácticas fundamentales para la selección y adaptación de las especies vegetales endémicas de las diferentes regiones del mundo. Estas prácticas fueron, la domesticación y el cultivo de las plantas. Dichas prácticas se diferencian entre sí dado que el cultivo de las plantas se refiere a las prácticas agrícolas que se tienen a lo largo de la reproducción de una planta, es decir, la siembra, el cuidado y la recolección de los frutos o semillas; mientras que la domesticación se refiere a la manipulación (consciente o inconsciente) de la genética de una planta, también conocida como la selección artificial, con el fin de adaptar la morfología y fisiología de las variedades de plantas elegidas, las cuales poseían características que beneficiaban al ser humano de alguna u otra forma (como el tamaño del grano, el sabor o la facilidad de reproducción de la planta).

En Medio Oriente, Antiguo Egipto y Mesopotamia fueron domesticados el trigo (*Triticum monococcum* y *T. dicoccum*) y la cebada (*Hordeum vulgare*) alrededor de 9600 a.C., que actualmente

ocupan el 35% de los cultivos producidos mundialmente. Posteriormente, en 7500 a.C., en China se cultivaron el arroz (*Oryza sativa*) y la soja (*Glycine max*) mientras que en el año 8000 a. C en Mesoamérica los principales cultivos fueron el Maíz (*Zea mays*), el frijol (*Phaseolus lunatus*) y la calabaza (*Cucurbita pepa*). Las zonas pioneras en implementar la agricultura se ven remarcadas de anaranjado en la figura 2, mientras que las principales zonas agrícolas hoy en día, se ven remarcadas de amarillo (Díaz Guillén, 2010).

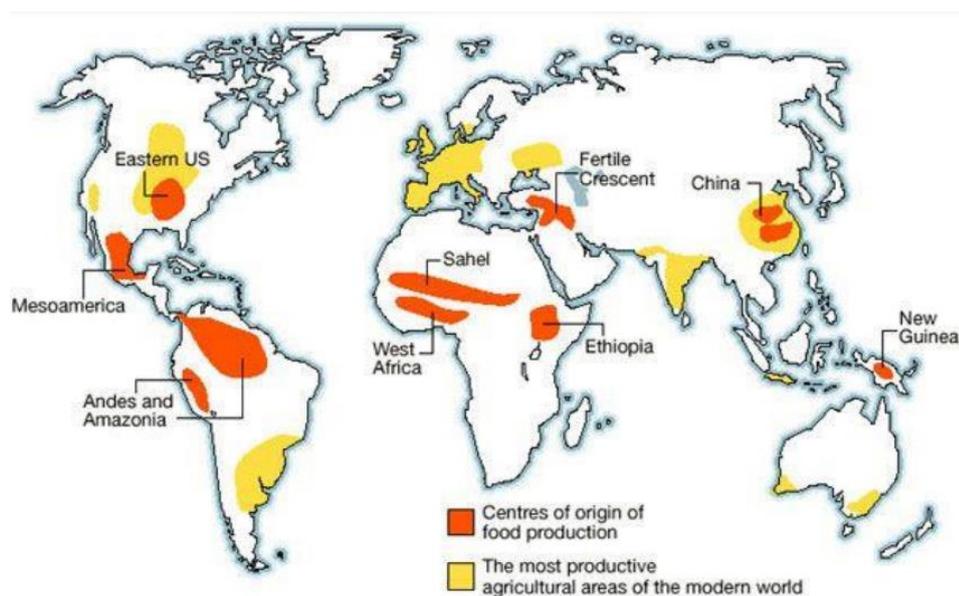


Figura 2. Mapa de las principales zonas agrícolas a nivel mundial, prehistóricas y actuales (Díaz Guillén, 2010).

Un ejemplo claro de la domesticación de especies vegetales es la del maíz. La primera variedad conocida fue el teosinte, una mazorca silvestre que luego de su modificación dio lugar al maíz conocido hoy en día, como se observa en la figura 3.

Actualmente, según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, en todos los años de este milenio, la producción mundial de granos ha superado los dos mil millones de toneladas, de las cuales, mil doscientos millones de toneladas se logran por lo general en los países en desarrollo, en tanto que los países desarrollados no han logrado que su producción alcance los mil millones de toneladas. Según las estimaciones de la FAO, la producción mundial de cereales en 2018 ascendió a 2609 millones de toneladas.

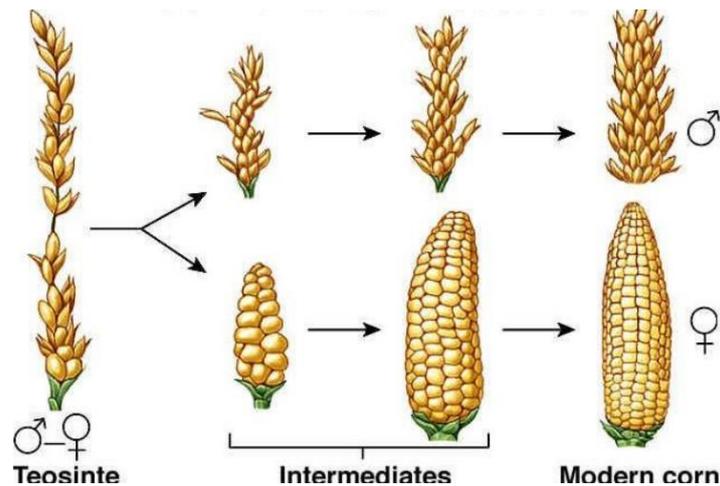


Figura 3. Representación de la evolución morfológica del maíz (*Zea mays*) (Latham, 2002).

Tras dicha revisión, el pronóstico de la utilización de cereales en 2018/19 se redujo debido a los recortes previstos en el uso como piensos de los principales cereales, especialmente en los Estados Unidos de América. Sin embargo, la estimación sobre la utilización mundial de cereales secundarios en 2018/19 representaba el 2.0% más que el nivel alcanzado en la campaña anterior, mientras que se preveía un aumento del 0.9% en la producción de arroz y 0.5% en la del trigo (FAO, 2019).

El pronóstico de la FAO sobre la producción mundial de cereales en 2020 se redujo en cerca de 13 millones de toneladas, principalmente debido a las expectativas de una disminución de la producción mundial de cereales secundarios. Pese a las revisiones a la baja, los pronósticos indicaron que la producción mundial de cereales alcanzará un nivel récord de 2 750 millones de toneladas, superando en un 1.6 % la producción de 2019 (FAO, 2020).

Actualmente la producción mundial de cereales ha ascendido a 2 785 millones de toneladas, como se observa en la figura 4. También se ha incrementado la producción de cereales secundarios desde la cosecha exitosa de arroz en India que supera por primera vez los 800 millones de toneladas. De igual manera en Colombia, Ghana y Perú se indica una mejora en la cosecha de esta campaña con respecto a lo pronosticado anteriormente (FAO, 2023).



Figura 4. Producción mundial de cereales en la campaña 2022/23 (FAO 2023).

En el 2019 se registraron como los principales países productores de cereales, mostrados en la figura 5, a China, Estados Unidos, India, Brasil, Rusia, Indonesia, Argentina, Francia, Ucrania y Canadá. China ocupando el primer lugar en producción de arroz y trigo, pero mantiene el segundo lugar en producción de maíz, encabezado por Estados Unidos (Elisha Sawe, 2019).

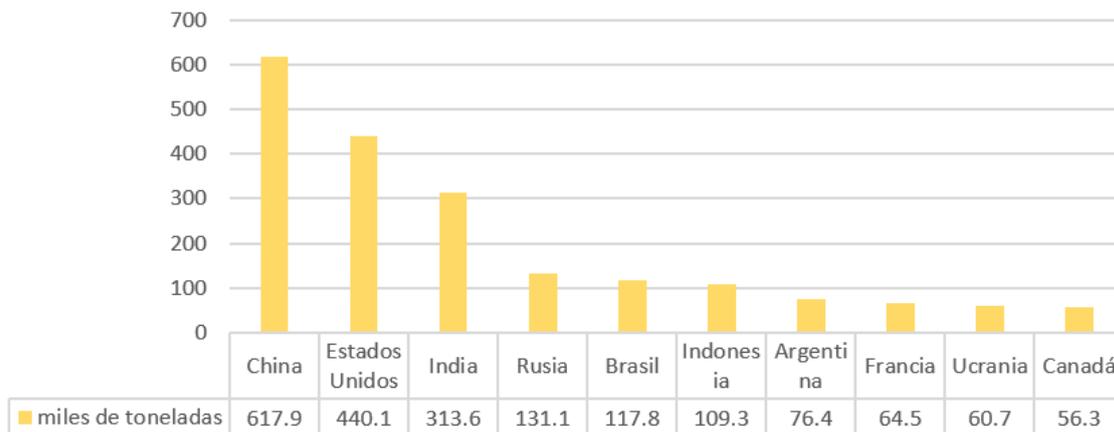


Figura 5. Principales productores de cereales

Por otro lado, el consumo de cereales, como el maíz y el trigo, se ve encabezado por Estados Unidos, China y la Unión Europea (fig.6) con 315.3, 277 y 83 miles de toneladas al año respectivamente (2018-2019), mientras que el consumo de arroz, como se observa en la figura 7, predomina en el continente asiático, principalmente con China, India e Indonesia (Elisha Sawe, 2019).

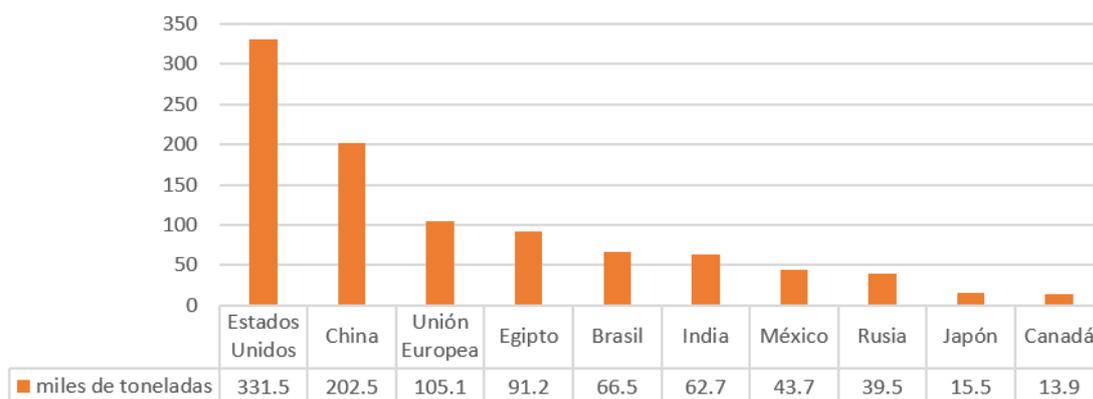


Figura 6. Principales consumidores de trigo y maíz

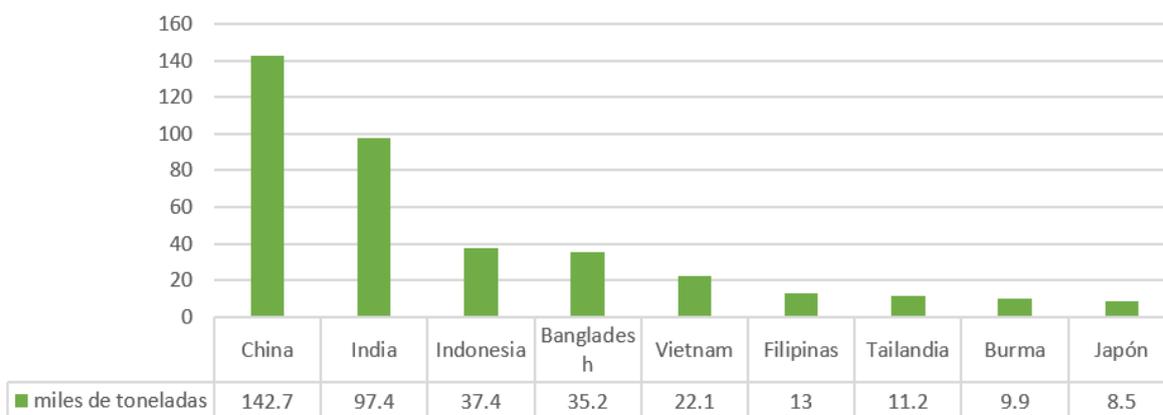


Figura 7. Principales consumidores de arroz.

METABOLITOS SECUNDARIOS (MS)

Las plantas son productoras de gran número de sustancias o productos metabólicos. Los metabolitos secundarios (MS) son compuestos derivados del metabolismo primario. Principalmente son utilizados por las plantas como mecanismo de defensa, pero para el ser humano son la fuente de distintos principios activos que se aprovechan en diversas áreas. Son utilizados en la industria farmacéutica, alimenticia, cosmética y como fuente de numerosas sustancias de interés agroquímico.

Anteriormente se creía que estas sustancias eran producidas inespecíficamente, pero después se encontró que poseen altos rendimientos y que tienen múltiples funciones en las plantas. Los MS, o compuestos secundarios, no presentan una actividad primordial en el metabolismo primario, sin embargo, son utilizados por el organismo vegetal como mecanismo de defensa ante hongos, herbívoros, virus o bacterias. Otros tienen funciones fisiológicas como el transporte de nitrógeno (alcaloides y pectinas), o protección contra los rayos ultravioleta (flavonoides). Además, son una fuente importante de principios activos para medicamentos y productos químicos (Pérez *et al.*, 2013).

Los compuestos secundarios son especialmente abundantes en organismos carentes de un sistema inmunológico, pero es en el reino animal donde ha ocurrido la mayor expresión y diversidad de estos. El interés en los metabolitos secundarios radica en que la mayoría de estos compuestos tienen alguna función aprovechable ya sea actividad antibacteriana, antioxidante, o anticancerígena; esto incita a nuevas investigaciones de los compuestos secundarios naturales con actividad biológica (Almaraz *et al.*, 2008).

Con la implementación del cultivo de células vegetales en suspensión se ha permitido el monitoreo del ambiente físico y químico de las células en crecimiento; así como el desarrollo y multiplicación de técnicas químicas analíticas, como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), y la espectroscopia de masas; también ha surgido el desarrollo de técnicas bioquímicas como la electroforesis para el análisis de proteínas. Gracias a la implementación de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha sido posible aislar y caracterizar gran número de enzimas responsables de establecer rutas de biosíntesis de un gran número de compuestos secundarios (Pérez *et al.*, 2013).

Clasificación De Metabolitos Secundarios

Los Metabolitos Secundarios se generan en las plantas durante distintas etapas de desarrollo y en respuesta a situaciones de estrés, desempeñando funciones de defensa, atracción y protección frente a insectos, así como adaptación a condiciones ambientales adversas. Los compuestos que se encuentran en diferentes tejidos vegetales como hojas, flores, semillas, tallos y raíces se derivan de los metabolitos primarios de la glucólisis. Existen tres rutas bioquímicas y tres familias de compuestos secundarios identificables (Harborne, 1993):

1. Ruta del ácido shikímico: Esta ruta utiliza el fosfoenolpiruvato y la eritrosa-4-fosfato en interacción con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs) para producir aminoácidos aromáticos y alifáticos. Estos aminoácidos son los precursores de los alcaloides y fenoles.
2. Ruta del ácido mevalónico: Esta ruta involucra la conjunción del acetil CoA para producir Terpenos.
3. Ruta de los policétidos (acetogeninas): Esta ruta también utiliza la conjunción del acetil CoA a través del acetato para generar compuestos secundarios nitrogenados.

Fenoles

Los compuestos fenólicos, también llamados fenoles o polifenoles vegetales son sustancias que poseen al menos un anillo aromático con un radical hidroxilo sustituyente en su estructura química, un grupo fenólico. El fenol se encuentra como producto en el reino vegetal, pero es más común que los compuestos fenólicos tengan dos o más grupos hidroxilo (Sotero, 2011).

De todos los metabolitos secundarios los polifenoles son los más distribuidos y complejos en el reino vegetal. Se han clasificado trece grupos diferentes de polifenoles y se identifican entre sí por el número de átomos de carbono en su esqueleto básico; C₆, que son los fenoles simples; C₆-C₁ o ácidos fenólicos; C₆-C₂, que incluye a los ácidos fenilacéticos y acetofenonas; C₆-C₃, que incluye a los ácidos hidroxicinámicos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas y cromonas; C₆-C₄ o naftoquinonas; C₆-C₁-C₆ o xantonas; C₆-C₂-C₆, que incluye a los estilbenos y antroquinonas; C₆-C₃-C₆ o flavonoides; (C₆-C₃)₂ o lignanos; (C₆C₃-C₆)₂ o biflavonoides; (C₆-C₃)_n o ligninas; (C₆)₆ o catecolaminas; y (C₆-C₃-C₆)_n o flavolanos, también llamados taninos condensados (Pérez *et al.*, 2013).

De acuerdo con Toro-Rojas (2012), los fenoles pueden ejercer su acción a través de diversos mecanismos, siendo los principales:

- Actuando como inhibidores, activadores o protectores de enzimas específicas.
- Funcionando como antioxidantes al capturar radicales libres.
- Actuando de manera indirecta como quelantes de iones de metales de transición, es decir, uniéndose a estos iones y reduciendo su capacidad de generar radicales libres.

Cada polifenol puede utilizar uno o varios de estos mecanismos, dependiendo de sus propiedades individuales. Algunas de las estructuras principales se muestran en la figura 8.

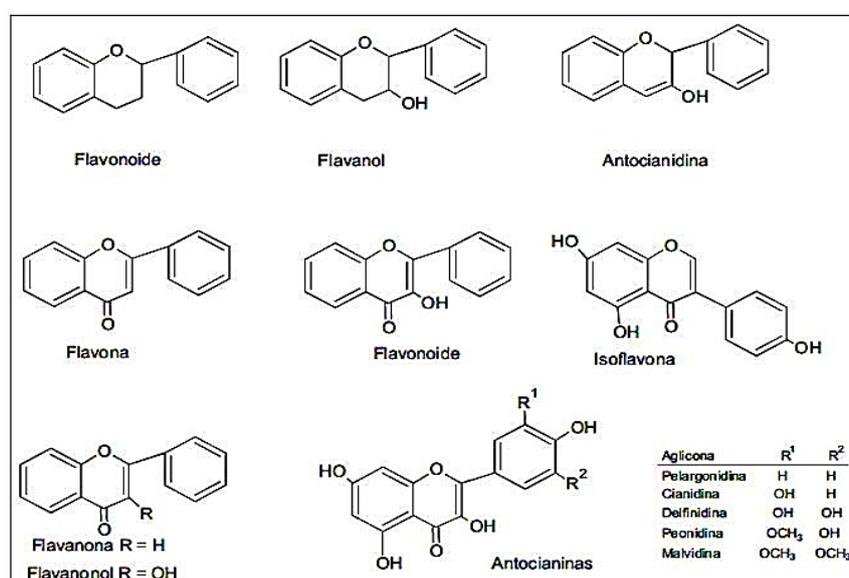


Figura 8. Estructura básica del grupo de los flavonoides (Sotero, 2011).

La diversidad química de los flavonoides está determinada principalmente por diferencias en el nivel de oxidación del anillo heterocíclico. Esta diversidad permite clasificar al grupo de los flavonoides en tres grupos diferentes; compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides. También se diversifican por los diferentes patrones de hidroxilación, glicosilación, metilación, metoxilación y acilación entre los anillos A y B. Las principales clases de flavonoides son las flavonas y los flavonoles. Ambos se caracterizan por presentar doble enlace entre el C2 y el C3 del anillo heterocíclico C y difieren entre sí por la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 3 en los flavonoles (Ávalos García, 2009).

Los flavonoides agrupan cinco tipos diferentes de compuestos: las flavanonas, también llamadas dihidroflavonas; los dihidroflavonoles, también llamados flavanonoles o 3-

hidroxiflavanonas; las dihidrochalconas; los flavanos; y los flavanoles. En conjunto estos cinco tipos de flavanoides reciben el nombre de dihidroflavonoides, ya que los carbonos 2 y 3 (o alfa y beta en el caso de las dihidrochalconas) de su estructura química están hidrogenados y no existe un doble enlace entre ellos. Las flavanonas, los dihidroflavonoles y las dihidrochalconas se diferencian de los flavanos y flavanoles por la presencia de un grupo carbonilo en el anillo heterocíclico en los tres primeros y su ausencia en los dos últimos. Los flavanoides se consideran compuestos con una distribución natural dentro del reino vegetal, más limitada que las flavonas y los flavonoles. Se han encontrado en helechos y gimnospermas (Almaraz *et al.*, 2008).

Terpenos

Los terpenos, también llamados terpenoides o isoprenoides, tienen como unidad estructural fundamental al compuesto de cinco átomos de carbono llamado isopentil pirofosfato. El nombre de isoprenoides fue dado porque éstos compuestos se descomponen a altas temperaturas y producen isopreno.

De acuerdo con el número de unidades de isopreno que contengan, los terpenos se clasifican en monoterpenos, con dos unidades; en sesquiterpenos, con tres; en diterpenos, con cuatro; en triterpenos, con seis, en tetraterpenos, con ocho y en politerpenos con más de veinte (Gatto, 2018).

Dentro de los monoterpenos se destacan los piretroides, con potente actividad insecticida y los constituyentes de aceites esenciales y las resinas de las plantas como el limoneno y el mentol, como se muestran en la figura 9.

Las sesquiterpenlactonas, y el gósipol, un dímero, son ejemplos de sesquiterpenos. Como ejemplos de los diterpenos están el ácido abiótico y el forbol, ambos componentes abundantes en las resinas de las plantas leñosas. Las fitoecdisonas, los cardenólidos o glicósidos cardíacos y las saponinas son importantes representantes de los triterpenos. Estos compuestos tienen potentes actividades biológicas sobre los animales, desde insectos hasta mamíferos. Por último, un polímero de 1500 a 15000 unidades de isopentenil es el elemento principal del hule en especies vegetales que sintetizan esta sustancia, de las cuales la más importante es el árbol del hule *Hevea brasiliensis* (Sotero, 2011).

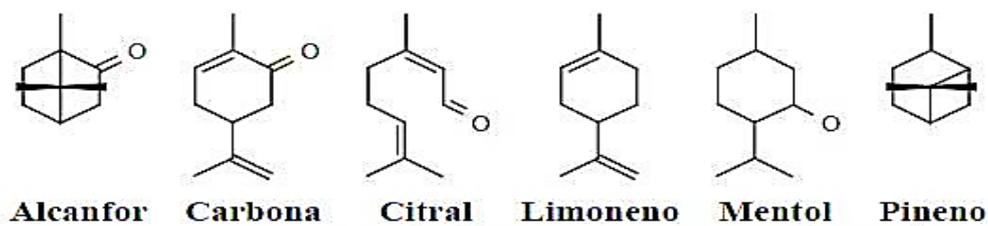


Figura 9. Estructura de algunos monoterpenos (Sotero, 2011).

Compuestos secundarios nitrogenados

Este grupo de compuestos secundarios es químicamente heterogéneo. La mayoría de ellos son sintetizados en plantas a partir de aminoácidos comunes. Pertenecen al grupo de compuestos secundarios nitrogenados los alcaloides, los glicósidos cianogénicos, los glucosinolatos o glicósidos de aceite de mostaza y los aminoácidos no proteicos (Almaraz *et al.*, 2008).

Los principales grupos de alcaloides son los alcaloides indolmonoterpénicos, que incluye ejemplos notables como la quinina y la estricnina, su estructura se puede observar en la figura 10; los alcaloides tropano, representados por sustancias como la cocaína; los alcaloides tipo benzilisoquinolina, que dan cuenta de elementos tan importantes como la morfina; y los alcaloides tipo bisbenzilisoquinolina, grupo al que pertenece el curare, que es una sustancia venenosa extraída del árbol de curare (*Strychnos toxifera*).

Los glicósidos cianogénicos y los glucosinolatos en sí mismos no son compuestos tóxicos, se convierten en tales cuando los tejidos dañados de las plantas estimulan su hidrólisis para producir respectivamente ácido cianhídrico, un potente inhibidor de la respiración celular, y nitrilos, tiocianatos e isotiocianatos, sustancias pungentes y químicamente muy activas. Los aminoácidos no proteicos son sintetizados por muchas especies de plantas.

Estos compuestos normalmente no forman parte estructural de las proteínas, sino que se encuentran en forma libre y pueden tener funciones duales, como material de reserva en las semillas y como sistemas de defensa contra herbívoros, sustituyendo aminoácidos proteicos y provocando alteraciones estructurales y funcionales en proteínas (Sotero, 2011).

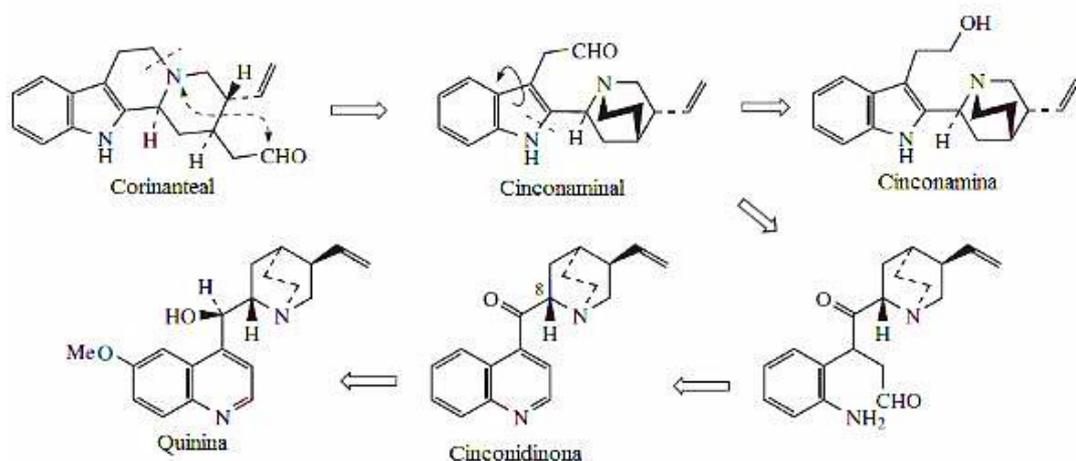


Figura 10. Estructura química de algunos alcaloides (Gatto, 2018).

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

El estudio de los componentes de una sustancia o mezcla se basa en tres etapas que permiten reconocer e identificar cada parte que la conforma. En primer lugar, se requiere obtener una muestra significativa. Luego, se deben aplicar distintas metodologías y técnicas para lograr el aislamiento de los componentes de la mezcla de manera pura y sin alteraciones. Los métodos de extracción se basan en las propiedades físicas de cada sustancia, como el punto de ebullición, la densidad y la solubilidad, entre otros. Estas propiedades proporcionan un amplio abanico de opciones para seleccionar la metodología más adecuada que se adapte a las características de la mezcla que se desea estudiar. Una vez aislados los componentes, se procede a su análisis e identificación (López *et al.*, 2005).

Este trabajo enfoca la atención en los métodos de extracción más eficientes para la obtención de metabolitos secundarios en material vegetal, principalmente de cereales.

Se conocen diversos métodos de extracción de analitos, los cuales pueden agruparse de manera general en técnicas convencionales y no convencionales (Reyes-Vargas, 2018).

Métodos de extracción convencionales

- Soxhlet

Es un método clásico de extracción en el que se emplea un aparato Soxhlet que permite la extracción repetida de los analitos utilizando un disolvente líquido que se evapora y condensa en un ciclo continuo. Como se muestra en la figura 11, el equipo está formado por un matraz, un cuerpo intermedio con sifón y refrigerante. Es una técnica que

presenta ventajas como la independencia del tipo de matriz y la transferencia múltiple de la muestra con el disolvente limpio. Sin embargo, también tiene inconvenientes como el consumo de grandes cantidades de disolvente, la posibilidad de evaporación del analito y un tiempo de ejecución prolongado (Reyes-Vargas, 2018).

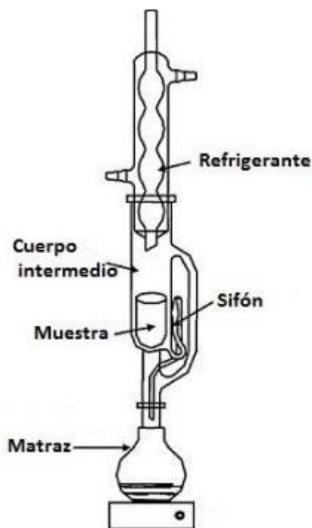


Figura 11. Esquema del equipo Soxhlet (Reyes-Vargas, 2018).

- Destilación por arrastre de vapor

La destilación por arrastre con vapor es una técnica utilizada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles de otras sustancias no volátiles presentes en la mezcla, como resinas, sales inorgánicas u otros compuestos orgánicos no arrastrables. En esta técnica, los vapores saturados de los líquidos inmiscibles siguen la Ley de Dalton sobre las presiones parciales. Según esta ley, cuando se mezclan dos o más gases o vapores que no reaccionan entre sí a temperatura constante, cada gas ejerce una presión igual a si estuviera solo, y la suma de las presiones de cada gas es igual a la presión total del sistema. Para esta técnica es necesario armar un equipo adecuado para la destilación compuesto por dos matraces, uno que contiene la muestra con solvente y otro con agua (Domínguez, 1990).

A continuación se muestra en la figura 12 un diagrama de un sistema de destilación por arrastre de vapor.

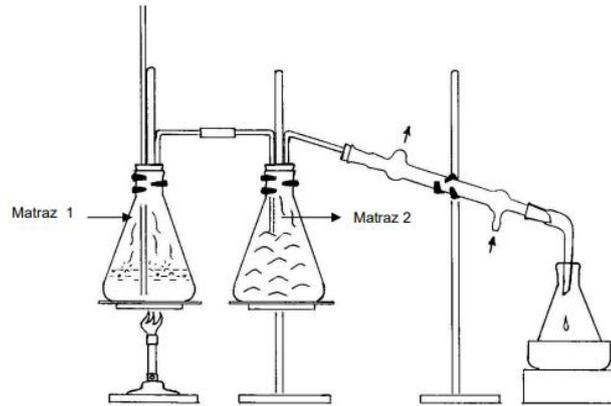


Figura 12. Esquema de un sistema de destilación por arrastre de vapor (Domínguez, 1990).

- Extracción por maceración

El método de extracción por maceración se basa en la compatibilidad entre el solvente utilizado y la muestra de interés, y consiste en sumergir la muestra en el solvente durante varias horas para que los compuestos solubles se disuelvan y puedan ser obtenidos. Para agilizar el proceso, se puede aplicar agitación continua al recipiente de maceración (Benítez *et. al.*, 2018).

La maceración puede realizarse en frío o aplicando calor. En la maceración en frío, se satura la muestra con el solvente seleccionado, cubriéndola por completo y dejándola reposar durante un tiempo prolongado. Este método presenta ventajas como la no necesidad de equipo especializado de extracción y la preservación de compuestos termolábiles debido a la ausencia de calor. Sin embargo, su desventaja radica en que el tiempo de extracción puede prolongarse varias horas. En el caso de la maceración con calor, el procedimiento es similar, cubriendo la muestra con un solvente específico, pero en este caso se expone a temperaturas de entre 20 y 25 °C (López, 2016).

A pesar de ser un método sencillo, seguro y económico, la maceración presenta una eficiencia baja. La eficacia de este método depende principalmente de los parámetros de operación, tanto controlables como no controlables, así como de la naturaleza de la matriz sólida y la composición química de los compuestos bioactivos de interés (Duarte-Trujillo *et. al.*, 2018).

Métodos de extracción no convencionales

- Asistida por Ultrasonido

El ultrasonido ha demostrado ser una técnica valiosa en la industria del procesamiento, ya que ofrece la capacidad de realizar evaluaciones no invasivas ni destructivas en compuestos delicados. En esta aplicación, se distinguen dos tipos principales de ultrasonido: el ultrasonido de señal y el ultrasonido de potencia.

El ultrasonido de señal se utiliza para monitorear procesos o productos mediante el uso de señales de baja intensidad, generalmente en el rango de 100 kHz a 1 MHz. En la industria de alimentos, se emplea principalmente como una herramienta de control de calidad y para la determinación de propiedades sensoriales. Este enfoque no invasivo permite evaluar la calidad de los alimentos sin causar alteraciones significativas en su estructura o composición (Corona-Jiménez *et.al.*, 2016).

El uso del ultrasonido en el procesamiento de compuestos ofrece beneficios significativos. Por un lado, el ultrasonido de potencia, con frecuencias entre 18 kHz y 100 kHz, induce modificaciones en la estructura física y química del medio, generando expansiones y colapsos de burbujas en la fase sólida. Esta interacción mejora la transferencia de masa y facilita la extracción de compuestos bioactivos. Además, estudios han demostrado que el ultrasonido es altamente efectivo, superando a métodos como la maceración, destilación y extracción con equipo Soxhlet. Estas ventajas lo convierten en una herramienta valiosa para el monitoreo no invasivo de procesos y productos, así como para la extracción eficiente de compuestos de interés (Azuola & Vargas, 2007).

- Asistida por microondas

La radiación de microondas tiene la capacidad de interactuar directamente con el material al absorber una porción de la energía electromagnética y convertirla en calor. Genera excitación en las moléculas causando migración de iones y rotación de dipolos que contribuyen en la transferencia de energía al solvente y material vegetal. Durante el proceso de extracción, la exposición al componente eléctrico de las microondas provoca una alineación de las moléculas dipolares de la mezcla solvente-muestra. Esto a su vez conduce a la migración de iones y la rotación de moléculas con momentos dipolares, generando energía en forma de calor (Rodríguez, 2014).

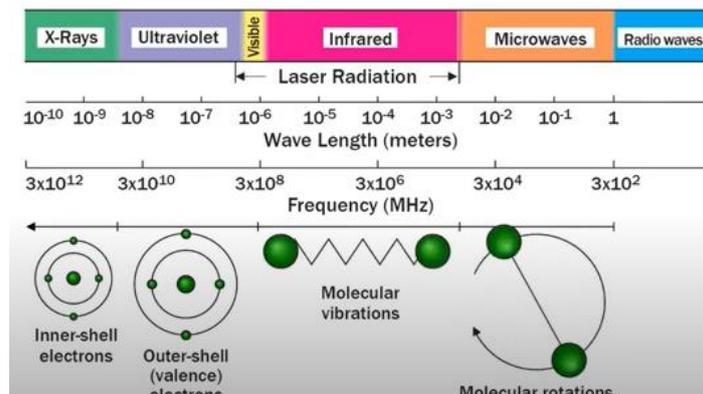


Figura 13. Longitud de distintas ondas electromagnéticas (Collins, 2008)

En la figura 13 se muestra que las microondas pertenecen a la categoría de ondas de poca longitud, precedidas únicamente por las ondas de radio, permitiendo la interacción de moléculas en rotación. Así mismo, en la tabla 2 se puede observar una comparación entre distintos tipos de radiación electromagnética y su energía cuántica. Las microondas poseen 1.013×10^{-5} eV, que es mucho menor que la energía cuántica necesaria para romper el enlace de hidrógenos entre moléculas de agua (fig.14), por lo que las microondas no pueden destruir o dañar moléculas presentes en las muestras de estudio, haciendo este método de extracción seguro para cualquier tipo de muestra (Collins, 2008).

Tabla 2. Energía cuántica de distintas ondas electromagnéticas

Tipo de onda	Frecuencia típica (MHz)	Energía cuántica (eV)
Rayos-y	3.0×10^{14}	1.24×10^6
Rayos-x	3.0×10^{13}	1.24×10^5
Ultravioleta	1.0×10^9	4.1
Visible	6.0×10^8	2.5
Infrarrojo	3.0×10^6	0.012
Microondas	2450	1.013×10^{-5}
Radio	1	4×10^{-9}

Fuente: Collins, 2008

Tipo de enlace químico	Energía del enlace químico (eV)
H-OH	5.2
C-CH ₃	4.5
H-NHCH ₃	4.0
H ₃ C-CH ₃	3.8
 CH ₂ -COOH	2.4
	0.21

Figura 14. Energía necesaria para romper distintos tipos de enlace (eV) (Collins, 2008).

La principal ventaja de la extracción asistida por microondas es la rapidez con la que se logran los resultados. El calentamiento uniforme y rápido permite acelerar el proceso de extracción, reduciendo significativamente el tiempo requerido en comparación con otros métodos convencionales. Además, se obtiene una mayor eficiencia en la extracción, ya que la radiación microondas promueve una mejor interacción entre el solvente y los compuestos de interés. Otras de las ventajas de la aplicación de este método son que se puede controlar la temperatura y el tiempo de extracción; que al ser un sistema cerrado no se producen vapores ácidos haciéndolo muy seguro para el personal; y solo es necesario entre 0.1 y 2g de muestra. Su rapidez y eficiencia la hacen una opción atractiva en diferentes campos, como la química, la farmacología y la industria alimentaria (Azuola & Vargas 2007).

- Extracción por fluidos supercríticos (SFE):

Cuando un fluido, como un solvente, se somete a temperaturas y presiones por encima de sus valores críticos, experimenta una transformación en un estado conocido como fluido supercrítico. El punto crítico (PC) es el punto en el cual el fluido alcanza su temperatura crítica (T_c) y presión crítica (P_c), como se muestra en la figura 15. En este estado, el fluido supercrítico exhibe propiedades únicas que lo diferencian tanto de los líquidos convencionales como de los gases. En el punto supercrítico, el fluido posee una densidad similar a la de un líquido pero exhibe la capacidad de difundirse y penetrar como un gas (Toro-Rojas, 2012).

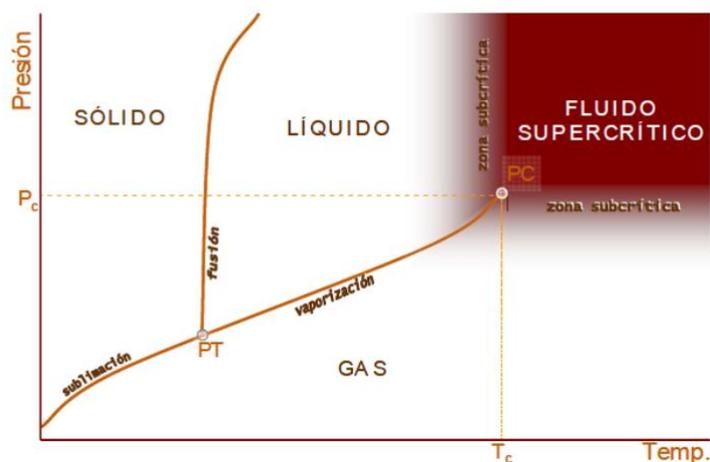


Figura 15. Diagrama de obtención de un fluido supercrítico (Reyes-Vargas, 2018).

Además, un fluido supercrítico presenta una viscosidad baja y una alta capacidad de disolución, lo que lo convierte en un excelente medio para la extracción de compuestos de interés. La solubilidad de diferentes sustancias en un fluido supercrítico puede ser ajustada modificando la temperatura y la presión, lo cual ofrece flexibilidad en el proceso de extracción. La tabla 3 muestra las temperaturas y presiones críticas de los solventes más frecuentemente usados, sin embargo, la extracción por fluidos supercríticos (EFS) utiliza generalmente dióxido de carbono (CO_2) en estado supercrítico, como agente de extracción. El CO_2 supercrítico tiene propiedades intermedias entre un gas y un líquido, lo que lo hace eficiente para la extracción selectiva de analitos (Reyes-Vargas, 2018).

Tabla 3. Temperatura y presión críticas de distintos compuestos.

Compuesto	Temperatura Crítica (°C)	Presión crítica (bar)
Dióxido de carbono	31.1	72
Agua	374.2	214.8
Acetona	235	47
Etanol	243.4	72
Metanol	239	78.9
n-Hexano	234.2	30.1
Amoniaco	132.5	109.8

Fuente: Reyes-Vargas, 2018.

METODOLOGÍA

Tipo de investigación

El presente trabajo se realizó bajo el esquema de investigación de tipo cualitativa al tratarse de un documento que recolecta y compara información sustraída de diversas fuentes de información acerca de la extracción de metabolitos secundarios, aplicado a cereales.

Diseño de investigación

La presente investigación fue realizada con la estructura de una investigación no experimental (documental).

Lugar de realización de la investigación

Debido a la contingencia sanitaria, que inició en el mes de marzo del año 2020, provocada por el virus SARS-COV-2, no fue posible realizar la investigación de manera presencial en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Productos Funcionales (LIDPF) de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), ubicado en el edificio 27, sobre la 5a Pte. Nte. 1150, Col. Lajas Maciel. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Por lo tanto, la investigación se realizó de manera virtual con ayuda de diversas bases de datos mencionadas a continuación.

Desarrollo de la investigación

La presente investigación fue realizada siguiendo las etapas que se presentan enseguida:

- 1.- Compilación y análisis de información, procedente de diversas bases de datos científicas como Scielo, Google Académico, EBSCO, entre otras; acerca de las técnicas y metodologías utilizadas para la extracción de metabolitos secundarios de material vegetal en un período entre 2020 y 2023.
- 2.- Síntesis de información recopilada, en el apartado “Marco Teórico” de esta investigación, así como parte del apartado “Desarrollo del Tema” del Manual Metodológico para la Identificación de Metabolitos Secundarios en Cereales.
- 3.- Diseño y edición del Manual Metodológico para la Identificación de Metabolitos Secundarios en Cereales.
- 4.- Integración del Manual completo a la presente investigación; el cual cuenta con la siguiente distribución de contenido, de manera general:

- I. Portada

- II. Contenido
 - II.I Propósito
 - II.II Introducción
 - II.III Desarrollo de la Investigación
 - II.IV Conclusiones
- III. Glosario

RESULTADOS

Se obtuvo como resultado el Manual Metodológico para la Extracción de Metabolitos Secundarios en Cereales, que podrá ser utilizado en la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Alimentos por estudiantes que desarrollen trabajos de investigación sobre distintos tipos de cereales, y que estén interesados en la extracción de metabolitos secundarios dentro de su composición. Es decir, esta guía o manual permanecerá disponible para todo el público que quiera acceder a la información proporcionada en el Manual.

CONCLUSIONES

Las plantas ofrecen innumerables beneficios a los seres humanos. Además de proporcionarnos energía a través de la alimentación, contienen sustancias químicas que pueden prevenir y tratar enfermedades, contribuyendo así a una vida saludable. A lo largo de la historia, se han identificado más de 100 especies vegetales con propiedades curativas. En la industria alimentaria, se ha promovido la investigación y desarrollo de productos que aprovechan los metabolitos secundarios de las plantas, los cuales poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antibacterianas.

A lo largo de este trabajo se han discutido diferentes métodos de extracción, incluyendo la extracción por maceración, la extracción por ultrasonido y la extracción asistida por microondas. Cada método tiene sus propias características y beneficios.

La extracción por maceración es un método económico y sencillo. Aunque puede llevar tiempo debido a su proceso prolongado de extracción, resulta altamente eficaz y ofrece extractos de alta calidad. Esta técnica es accesible para cualquier persona, ya que no requiere conocimientos técnicos especializados en el manejo de equipos complejos. Es una excelente opción cuando los recursos económicos son limitados y se dispone de tiempo suficiente. La aplicación de ultrasonido de potencia ha demostrado su eficacia en la extracción de compuestos bioactivos al alterar la estructura del medio, lo cual facilita la liberación de los compuestos deseados. Por otro lado, la extracción asistida por microondas utiliza la radiación de microondas para calentar la muestra y acelerar el proceso de extracción. Ambas técnicas son rápidas y eficientes en su desempeño. Sin embargo, es importante tener en cuenta que se requieren equipos especializados para llevar a cabo estas extracciones, lo cual puede resultar costoso. Aunque se puede mejorar la transferencia de masa en ambas técnicas, es necesario considerar el costo y la disponibilidad de estos equipos especializados.

En conclusión, no hay un método universalmente superior, ya que cada uno tiene sus aplicaciones específicas. La selección del método adecuado dependerá de varios factores, como el tipo de muestra, los compuestos de interés, los recursos disponibles y los objetivos del estudio de las características de la muestra y los objetivos del estudio. Es recomendable realizar pruebas preliminares y considerar las necesidades específicas antes de decidir el método de extracción más apropiado.

GLOSARIO

A

Acuoso Que se encuentra disuelto en agua

AlCl₃ Cloruro de Aluminio

Análisis Sensorial Análisis normalizado de alimentos que se realiza con los sentidos

AOAC Association of Analytical Communities

B

Bacteria Microorganismo procariota unicelular

C

Carbohidrato Biomolécula compuesta principalmente por Carbono

Compuesto Sustancia formada por dos o más elementos de la tabla periódica

Cromatografía Método físico de separación de fase estacionaria y fase móvil

E

eV Electrovoltio

Evolución Cambio o transformación en caracteres fenotípicos y genotípicos de un organismo

F

FNCA Facultad de Nutrición y Ciencias de los Alimentos

Funcional, producto Alimento que además de cumplir funciones nutricionales cumple una función específica

H

Herbívoro Animal que se alimenta principalmente de plantas

Hongo Organismo eucariota del reino Fungi

HPLC (High Potency Chromatography) Cromatografía de Alta Eficiencia

K

KMnO₄ Permanganato de Potasio

L

LIDPF Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Productos Funcionales

Liofilización Método de deshidratación por sublimación

Lípido Macromolécula soluble en solventes no polares

M

Metabolismo Conjunto de reacciones químicas en las células de un organismo para obtener energía química

MS Metabolito Secundario

N

NaCl Cloruro de Sodio

Nm Nanómetro

O

OMS Organización Mundial de la Salud

P

Proteína Macromolécula formada por aminoácidos

S

Semilla Grano contenido en el interior del fruto de una planta

Sol Solución

Solvente Sustancia en la que se disuelve un soluto

Soxhlet Material de vidrio utilizado para la extracción de compuestos

TLC (Thin Layer Chromatography) Cromatografía de Capa Fina

U

UNICACH Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas

V

Viraje Variación de color de un indicador en la valoración ácido-base

Virus Agente infeccioso microscópico que se replica dentro de las células de un organismo sano.

REFERENCIAS DOCUMENTALES

AGUILAR VILLALOBOS, Alejandra. Metodología para la Destilación por Arrastre de Vapor. Universidad Autónoma Metropolitana. 2012. Disponible en: <http://quimicaorganica1alejandraaguiar2012/02/practica-3-destilacion-por-arrastre-de.html> citado: mayo 2021

ALMARAZ, Natalia et al. El metabolismo secundario en las plantas, un nuevo concepto. México. Ed. UBAMARI. 2008. p10-25

APONTE, Miguel et al. Fitoquímicos Venezuela. Ministerio del Poder Popular de la Salud. 2008 p 6-7.

ARENAS, Paola. Industria Alimentaria en Sudamérica. Argentina. 2014. Disponible en: <https://viajandosudamerica.wordpress.com/2014/06/17/la-industria-agroalimentaria-en-sudamerica-ii/> Citado: mayo 2021

ÁVALOS García, Adolfo. Metabolismo secundario en plantas. 2009. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145, 2009 ISSN: 1989-3620

AZUOLA, Rocío & **VARGAS**, Pedro. 2007. Extracción Asistida por Ultrasonido (EUA). Rev. Tecnología en Marcha, vol. 20-40-2007.

BENÍTEZ, Ricardo *et. al.*, 2018. Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. Rev. Facultad de Ciencias Básicas. Vol. 15 núm. 1 (2019). Universidad Militar Nueva Granada. Pp. 6-8.

BRODA, Johanna. 2013. Ritos y deidades del ciclo agrícola. Arqueología Mexicana #120 pp.53-61

CATALDO MOLLO, Geraldine et al. Extracción y Microbiología de Frutas y Hortalizas. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú 2015. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/3292/IAcamogp.pdf?sequence=1&isAllowed=y> citado: mayo 2021

COLLINS, Michael, 2008. Extraction Method Assisted by Microwaves. CEM, North Carolina, USA.

CORONA JIMÉNEZ, Edith *et.al.*, 2017. Extracción Asistida Por Ultrasonido De Compuestos Fenólicos De Semillas De Chia (*Salvia Hispanica L.*) Y Su Actividad Antioxidante. Facultad de Ingeniería Química. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Avenida San Claudio y 18 Sur. C.P. 72570. Ciudad Universitaria. Puebla, Puebla. Mexico.

DÍAZ GUILLÉN, Fermín. 2010. El proceso de la domesticación en las plantas. UNAM. Rev. Cava del tiempo #28

DÍAZ, María. Producción invernal de reservas forrajeras: cebada, trigo, avena y colza. Serie Extensión INTA Paraná N° 81 2017. p 57-64

DUARTE TRUJILLO, Astrid *et. al.*, 2018. Extraction of bioactive substances from *Pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) by dynamic maceration. Rev. Acta Biológica Colombiana vol. 25 núm.. 1 Pp 65-71. Bogotá, Colombia.

DOMÍNGUEZ, Susana. 1990. Química Orgánica Experimental. Limusa-Noriega, México.

ELISHA Sawe. 2019. Principales consumidores de cereales en el mundo. Rev. WordAtlas No.8

FAGRO. Granos de cereales. Aspectos generales, composición química e interés tecnológico. 2016

FAO. Información sobre operaciones postcosecha. Cereales y granos. 2019 FAO. Situación alimentaria mundial. Oferta y demanda de cereales. 2020

FAO. Situación Alimentaria Mundial. Nota Informativa de la FAO sobre la Oferta y la Demanda de Cereales. 2023.

FUENTEALBA SANDOVAL, Carlos Manuel. Metabolitos Secundarios Presentes en el Género TRITICUM. Facultad de Agronomía. Universidad de Concepción. Chile, 2015. Disponible en: Metabolitos secundarios presentes en el género Triticum y sus posibles beneficios para la salud humana.pdf (udec.cl) citado: mayo 2021

GARCÍA, Yolanda. El maíz en México: biodiversidad y cambios en el consumo. Universidad Autónoma Metropolitana. Análisis Económico ISSN: 0185-3937. 2001 p32-36

GATTO, Daniel. Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum var. glabriusculum*) en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. Revista Argentina de Microbiología. Vol. 47 Num.1. 2015. P 72-77

GUÍA GARCÍA, Jorge Luis. 2020. Principales Métodos de Extracción de Compuestos Bioactivos en Plantas. Universidad Interserrana del Estado de Puebla Ahuacatlán, México.

GONZÁLEZ TORRES, Yolotl. 2007. El maíz en Mesoamérica. UNAM Rev. Dimensión Antropológica Vol.41.

Grupo SIPSE. 2020. Osiris. Dios del cereal y la fertilidad. Mérida

HARBORNE, J.B, 1993. Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press. London.

IBARRA, Rodrigo. Maíz, trigo y arroz. Los cereales que alimentan al mundo. Universidad Autónoma de Nuevo León. Primera edición, 2010

JIMÉNEZ, Braulio. Composición Nutricional de la Cebada. España. Guía de Nutrición. 2018. P 3,4.

L. “Noni” Y. Cuantificación Espectrofotométrica De Los Flavonoides Totales. Rev. Scientia vol. 2 2010

LATHAM, Michael. 2002. Nutrición Humana en el mundo en desarrollo. Colección FAO. Alimentación y Nutrición No. 29 cap. 26. Roma, Italia.

LÓPEZ, Camila. 2016. Obtención de extractos de compuestos bioactivos. Universidad de las Américas Puebla. Puebla, México.

LÓPEZ SÁNCHEZ et. al. 2005. Métodos físicos de separación y purificación de sustancias orgánicas. Dpto. Química. Universidad de Las Palmas. Gran Canaria, España.

MAS TORO, Dairon et al. Análisis preliminar de los metabolitos secundarios de polvos mixtos de hojas de plantas medicinales. Rev. Cubana Plant Med [online]. 2017, vol.22, n.1 [citado 2021-05-27]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962017000100005&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1028-4796.

MENDOZA, Iván. Caracterización de soluciones formadoras de películas elaboradas con harina y almidón de cebada. México. IPN. 2012. p 22-24.

NIETO, José y **GONZÁLEZ Melesio**. Cadena agroalimentaria de cebada. México. IPN. 2003. Pp 18, 21, 22-25.

ORTEGA, M et. al., 2015. Cereales de grano completo y sus beneficios sanitarios. Rev. Nutrición Hospitalaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

PACHECO ESTEVA, Mary Carmen. 2022. Métodos de Extracción de Metabolitos Secundarios. SOMUCAAB, México.

PAUCAR, F. Study of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) as a natural sweetener and its use in benefit of the health. Scientia Agropecuaria [online]. 2014, vol.5, n. 2014 pp.157-163

PEREDO LUNA, Héctor et al. Aceites Esenciales: Métodos de Extracción. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas Puebla, Cholula, México. 2009. Disponible en: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf) Citado: mayo 2021

PÉREZ, Margarita et. al. Terpenos y Terpenoides. Universidad Central de Venezuela. 2013. P 6-8

PÉREZ, Noraida y JIMENEZ, Ramón. Cultivos Tropicales, vol. 37, núm. 2, abril-junio. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba 2011. pp. 127-133

PÉREZ-DIESTRE, T. 2017. Cosmovisión Mexica. BUAP. Rev.de la Facultad de Filosofía y Letras. P.53

RAMÍREZ, L. Historia de los cereales. La cebada. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 2018.

RAMOS, R. Los cereales en la alimentación del lactante y el niño pequeño. Acta Pediatra Esp. 2013 p77, 83-89

REYES VARGAS, José. 2018. Extracción con Fluidos Supercríticos: Aplicaciones de Interés Farmacéutico. Universidad de Sevilla. España. P.4-19.

RUIZ REYES, Segundo Guillermo et al. Identificación Preliminar De Los Metabolitos Secundarios De Los Extractos Acuosa Y Etanólica Del Fruto Y Hojas De Morinda Citrifolia

RODRÍGUEZ ÁLVAREZ, Margarito et al. Procedimientos para la Extracción de Aceites Esenciales de Plantas Medicinales. SAGARPA. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste. México 2012. Disponible en: https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/540/1/rodriguez_m.pdf Cita do: Mayo2021

RODRÍGUEZ, Carlos. 2014. Estudio De La Técnica De Extracción Asistida Por Microondas Para Su Aplicación En La Determinación De Hidrocarburos Totales De Petróleo En Suelos. Centro de Servicios Ambientales y Químicos CESAQ-PUCE, Quito-Ecuador

ROMÁN PÁEZ et. al. 2016. Guía sobre principios básicos de cromatografía y sus aplicaciones. SENNOVA. pp.13-26 Colombia.

ROSALES, Sergio. Uso de granos de cereales enteros en la alimentación. BM Editores, SA de CV Xicoténcatl No. 85. 2000.

SAGARPA. Cebada, Grano Mexicana. México. SAGARPA. 2017. 3, 6, 7-10.

SÁNCHEZ-KEN, F. 2019. Red de diversidad biológica del occidente mexicano. INECOL A.C.

SEPÚLVEDA JIMÉNEZ, Gabriela, Porta Ducoing, Helena, Rocha Sosa, Mario. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. Revista Mexicana de Fitopatología [en línea]. 2003, 21(3), 355-363[fecha de Consulta 26 de mayo de 2021]. ISSN: Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221317>

SERRA, Laura et al. El libro de los cereales. España. Ed. Evergráficas S.L. 2010. p 4-11.

SOTERO, Víctor et. al. Evaluación de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en pulpa y semillas de cuatro frutales amazónicos de la familia Sterculiaceae. Rev. Soc. Quím. Perú v.77 n.1 Lima 2011. P 5-10

TORO-ROJAS, María Trinidad. 2012. Extracción De Compuestos Fenólicos De Residuos De Palta Hass Mediante Efs-Co2-Etanol Y Su Estabilización En Hidrogeles De Alginato De Propiedades Reológicas Y Térmicas Definidas. Universidad de Chile. Santiago, Chile. P 11-13.

TÚNEZ-MUÑOZ. 2014. Cromatografía en capa fina de lípidos. Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. España.

UNAM. Estructura y Morfología de los Cereales. 2013.

VERDINI, Roxana. Cereales y Derivados. Universidad Nacional de Rosario, 2018. Argentina. Disponible en: 2018-B-CEREALES Y DERIVADOS (unr.edu.ar) citado: mayo 2021.

ANEXOS

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y
ARTES DE CHIAPAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN Y
ALIMENTOS**

**MANUAL METODOLÓGICO
PARA LA EXTRACCIÓN DE
METABOLITOS SECUNDARIOS
EN CEREALES**

Elaborado por

Mariana Gabriela Chapa Barrios

Arturo Alberto Velázquez López

CONTENIDO

Propósito.....	44
Introducción.....	45
Desarrollo del tema.....	47
Los Cereales.....	47
Consideraciones generales previas a la extracción.....	49
Selección del material vegetal.....	49
Selección del solvente.....	49
Pretratamiento de Material Vegetal.....	50
Métodos de extracción de Metabolitos secundarios.....	51
Métodos convencionales.....	51
Extracción por arrastre de vapor.....	51
Extracción con equipo Soxhlet.....	52
Extracción por maceración en frío sin agitación.....	53
Métodos no convencionales.....	54
Extracción asistida por microondas (EAM).....	54
Extracción asistida por ultrasonido (EAU).....	55
Extracción por fluidos supercríticos (EFS).....	56
Determinación Cuantitativa de Metabolitos Secundarios Específicos.....	57
1. Determinación Cuantitativa de Flavonoides.....	57
2. Determinación de Taninos por Método de Titulación.....	59
3. Determinación Cuantitativa de Alcaloides.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Esquema de un grano de trigo.....	46
Fig. 2 Esquema de un equipo de destilación por arrastre.....	50
Fig. 3 Ejemplo de equipo de microondas.....	55
Fig. 4 Diagrama del equipo de extracción por ultrasonido UP400S.	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Solventes comúnmente utilizados para compuestos secundarios, ordenados de mayor a menor polaridad.....	46
Tabla 2. Simulación de resultados de promedios y curvas de calibración.....	56

PROPÓSITO

El presente manual está destinado a contribuir a la base de datos de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), con un Manual Metodológico para la Extracción de Metabolitos Secundarios en Cereales que, a estudiantes de la Licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Alimentos los Alimentos (FCNA) de la UNICACH, a estudiantes de licenciaturas afines que se encuentren desarrollando un proyecto de investigación; o al público en general que desee obtener información sobre la metodología utilizada para la extracción de metabolitos secundarios en cereales, sirva como herramienta en la investigación de compuestos producidos por especies vegetales que puedan ser utilizados en la diversificación de productos funcionales.

INTRODUCCIÓN

Gracias a los diversos procesos evolutivos, las plantas han desarrollado la capacidad de producir compuestos, ajenos a sus funciones vitales. Estos son utilizados por la planta para combatir y sobrevivir a situaciones de estrés o que puedan perjudicar al organismo vegetal tales como bacterias patógenas, insectos y hongos. Los metabolitos secundarios (MS) son compuestos derivados del metabolismo primario, no presentan una actividad primordial en el metabolismo primario de la planta, sin embargo, algunos son utilizados como mecanismo de defensa antihongos, herbívoros, virus o bacterias; otros tienen funciones fisiológicas como el transporte de nitrógeno (alcaloides y pectinas), o protección contra los rayos ultravioleta (flavonoides). Además, son una fuente importante de principios activos para medicamentos y productos de interés (Pérez *et al.*, 2013).

Hasta ahora se conocen alrededor de 20 000 variedades de MS. Sepúlveda-Jiménez *et al.*, (2003) los clasifican como Nitrogenados y No Nitrogenados, de acuerdo con su composición química. Dentro del grupo de los MS Nitrogenados se encuentran los alcaloides, aminoácidos no proteicos, glucosinolatos, glucósidos cianogénicos y aminas. Mientras que, los terpenos, poliacetilenos, policétidos y los fenilpropanoides, pertenecen al grupo de los MS No Nitrogenados. Las diferencias entre los MS son ocasionadas por diferentes reacciones que suceden dentro de la planta. Esto permite tener un abanico amplio de compuestos con propiedades diferentes y específicas para cada situación; lo que se considera como un mecanismo de adaptación de las plantas. Muchos de los beneficios que se obtienen de compuestos como los MS han sido utilizados desde la antigüedad no solo por las plantas sino por los seres humanos, como antioxidantes, antimicrobianos e insecticidas.

Generalmente los MS son extraídos de plantas medicinales de las cuales se conoce el beneficio que aportan a la salud para prevenir o curar enfermedades. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido a 119 sustancias químicas encontradas en diversas especies de plantas con propiedades medicinales, como mencionan Mas-Toro *et al.*, (2012) en su investigación sobre extracción de metabolitos secundarios en variedades de polvos vegetales.

El presente manual desglosa información necesaria para realizar la extracción de MS presentes en especies diferentes de cereales comercialmente consumidos (cebada, avena, trigo, entre otros), con el fin de brindar un antecedente de información para posteriores

investigaciones o desarrollo de productos funcionales aprovechando los metabolitos secundarios encontrados en el material vegetal estudiado.

DESARROLLO DEL TEMA

LOS CEREALES

Se conocen como cereales a las semillas comestibles de las gramíneas de cultivo; como el arroz, avena, cebada, centeno, maíz, mijo, trigo y sorgo. Cada grano se encuentra protegido en su planta por una cubierta o vainas, formado de tres partes principales, como se muestra en la fig. 1: el germen, el interior feculento o endospermo (el cual representa la mayor parte del grano) y las capas exteriores de cáscara fibrosa (donde se almacenan los nutrientes) conocido como Salvado (García, 2001).

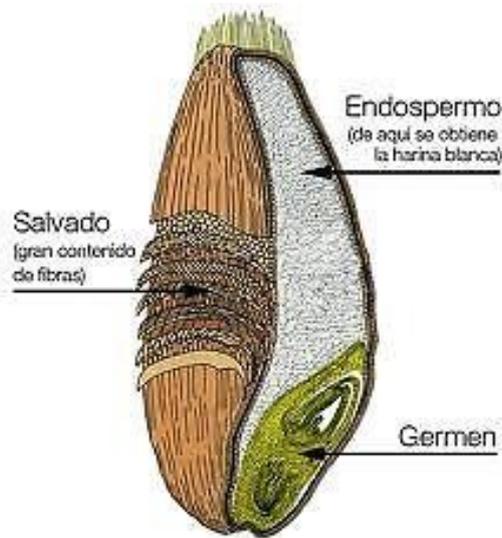


Fig. 1. Esquema de un grano de trigo (Verdini, 2018).

Los cereales han sido la base de la alimentación humana por décadas. Son los principales cultivos a nivel mundial y la dieta de la mayoría de los pueblos se basa en estos alimentos ya que satisfacen más del 50% de las necesidades energéticas de forma directa en el metabolismo humano. Principalmente proporcionan carbohidratos, proteínas y en menor proporción, vitaminas, minerales, fibra y lípidos; especialmente si se consumen enteros (Verdini, 2018).

Los cereales de grano entero o integral son aquellos que presentan todas sus partes en la misma proporción (salvado, endospermo y germen). El salvado y el germen proporcionan un alto contenido de fibra y de vitaminas (B₁ y B₂), tocoferoles, calcio, así como algunos compuestos con actividad antioxidante.

El consumo de cereales integrales recomendado al día es de 6 a 10 porciones, según la revista española *Nutrición Hospitalaria* (2015). Se demostró que el consumo de cereales enteros es altamente beneficioso para la salud del consumidor, sin embargo, se demostró a través de análisis sensoriales y pruebas de aceptabilidad que el consumo de cereales enteros o productos integrales no es tan elevado como se esperaría. Esto es debido a que su sabor, textura y color disminuyen la aceptabilidad de consumo (Ortega *et al.*, 2015).

Como la mayoría de las plantas, los cereales producen compuestos químicos que funcionan como mecanismo de defensa ante situaciones de estrés o peligro. Dichos compuestos son llamados Metabolitos Secundarios (MS) y han sido estudiados por varios años para su aprovechamiento en productos comercializables. Por lo tanto, la extracción de metabolitos secundarios de cereales se vuelve una alternativa ideal para brindar a la población una gama de productos alimentarios que contengan todos los beneficios extraídos de estas semillas, pero posean propiedades sensoriales agradables para el público en general (Fuentealba-Sandoval, 2015).

Los metabolitos secundarios son una variedad de sustancias químicas con propiedades funcionales distintas por lo que cuentan con composiciones distintas. Algunos compuestos son lábiles o volátiles y pueden verse afectados o contaminados por algunos de los solventes que se utilizan comúnmente. Por lo anterior, el método por elegir dependerá, por un lado, de las facilidades económicas y técnicas con las que se cuenten, así como de las necesidades y características del material vegetal. Es importante conocer las consecuencias que tendrán los diversos métodos sobre los compuestos que se quieran extraer (Peredo-Luna *et al.*, 2009).

Existen diferentes métodos para la extracción de metabolitos. Este manual describe técnicas de extracción convencionales (destilación por arrastre de vapor, con equipo Soxhlet, por maceración) y no convencionales (extracción asistida por microondas, asistida por ultrasonido y por fluidos supercríticos). No obstante, para la utilización de cualquier método de extracción es necesario aplicar un pretratamiento al material vegetal seleccionado con el objetivo de que esté en las condiciones esenciales de trabajo.

Consideraciones generales previas a la extracción

Selección del material vegetal

Antes de realizar la extracción de metabolitos secundarios de una planta, es recomendable seleccionar una especie vegetal reconocida por producir el compuesto o sustancia de interés. Además, es crucial tener un conocimiento adecuado de la botánica de la especie vegetal en estudio. Es importante familiarizarse con su taxonomía para poder identificarla correctamente y asegurarse de trabajar con un ejemplar correspondiente a la planta de interés.

Es beneficioso realizar investigaciones en la literatura especializada en áreas como la ecología, la toxicología y la botánica. Estas fuentes proporcionarán información relevante sobre las propiedades químicas básicas de la especie en cuestión. Conocer estas propiedades previas permitirá tener una mejor comprensión de los compuestos presentes en la planta y sus posibles aplicaciones. Además, puede proporcionar datos sobre las condiciones ambientales óptimas para el crecimiento de la planta, así como indicaciones sobre los períodos de cosecha adecuados para obtener los metabolitos en su máxima concentración y calidad (Pacheco-Esteva, 2022).

Selección de solventes

Es de gran importancia evaluar la polaridad y solubilidad de los componentes objetivo previo a la extracción. Estos factores desempeñan un papel clave, ya que brindan información sobre la seguridad, la facilidad de manipulación, así como el grado de pureza y solubilidad del compuesto obtenido.

El conocimiento de la polaridad de los metabolitos secundarios permite determinar qué tipo de solvente o mezcla de solventes es más adecuada para lograr una extracción efectiva. Los compuestos con una mayor polaridad tienden a ser más solubles en solventes polares, mientras que aquellos con menor polaridad suelen requerir solventes no polares. Esta información ayuda a seleccionar el solvente más apropiado, maximizando así la eficiencia de la extracción y la recuperación de los metabolitos deseados (Guía-García, 2020).

Asimismo, la solubilidad de los constituyentes objetivo es un factor por considerar, ya que determina la capacidad del solvente para disolver eficientemente los metabolitos secundarios de interés. Al considerar la polaridad y solubilidad de los metabolitos secundarios, se puede garantizar un proceso de extracción más efectivo, con una mayor pureza y rendimiento de los compuestos obtenidos. Esta información también contribuye a la selección de los

métodos de separación y purificación más apropiados para obtener metabolitos secundarios de alta calidad y aplicabilidad en diversos campos (Benítez, *et. al.*, 2018).

A continuación se muestra la polaridad que presentan los solventes comúnmente utilizados para compuestos como los metabolitos secundarios.

Tabla 1. Solventes comúnmente utilizados para compuestos secundarios, ordenados de mayor a menor polaridad.

Solvente	Extracción
Éter de petróleo, Hexano	Lípidos, Ceras, Pigmentos
Tolueno, Diclorometano, Cloroformo	Aceites volátiles, Antraquinonas
Acetato de Etilo, N-Butanol	Flavonoides, Cumarinas
Etanol, Metanol	Heterósidos en general
Sol. Hidroalcohólicas, Agua	Saponinas, Taninos
Agua Acidificada	Alcaloides

Fuente: Pacheco-Esteva, 2022.

Pretratamiento de material vegetal

Previo a la obtención de los extractos del material vegetal que se desea estudiar, se realizan los siguientes pasos para preparar las muestras, propuestos por Pacheco-Esteva (2022):

1. Se deben seleccionar los granos de cereales que presenten condiciones favorables para ser utilizados, es decir, que no presenten daños en su estructura, marcas de insectos, hongos o presenten diferencias significativas a comparación de los demás granos. Si se trabaja con especies de semillas que cuenten con una cáscara demasiado dura, deberá retirarse. Se deben seleccionar aproximadamente 100 g.
2. Posteriormente, los granos deberán ser enjuagados con abundante agua con el fin de eliminar cualquier partícula extraña que impida obtener un extracto puro como polvo, trozos de cáscara o de hojas secas.
3. El material vegetal limpio deberá ser colocado en una estufa de secado entre 30 y 50°C por 72 horas para eliminar el exceso de humedad de las muestras sin perjudicar sus componentes químicos.
4. Finalmente se reducirá el tamaño de las partículas del material vegetal. Se puede utilizar un mortero y pistilo o colocar la muestra en una licuadora o procesador de alimentos en intervalos de unos cuantos segundos hasta obtener partículas de 0.5 mm.

Nota: Si se desea utilizar el material vegetal fresco para la extracción de metabolitos secundarios, es importante tener en cuenta que debe ser utilizado inmediatamente después

de la cosecha. Esto se debe a que las sustancias de interés presentes en el material vegetal son susceptibles a la descomposición y pueden perder su actividad biológica o química con el tiempo. Es importante destacar que el material vegetal fresco puede presentar algunas ventajas, como la disponibilidad inmediata de los metabolitos secundarios en su forma más activa y la posible preservación de compuestos volátiles que podrían perderse durante el secado. Sin embargo, también se debe tener en cuenta que el material fresco puede contener más agua, lo que podría requerir ajustes en las condiciones de extracción para garantizar una adecuada disolución de los metabolitos en los solventes utilizados. Una vez que se ha asegurado la frescura del material vegetal, se puede proceder con el paso 4 del proceso de extracción, de manera similar a como se haría con material vegetal seco (Guía-García, 2020).

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

En este Manual se describen los métodos de extracción convencionales y no convencionales utilizadas más comúnmente; señalados a continuación:

I. Métodos de extracción convencionales:

Extracción o destilación por arrastre de vapor

Esta técnica es preferiblemente utilizada para la extracción de compuestos que no sean hidrosolubles, ya que al término de la destilación con vapor de agua se obtendrá un producto que al condensarse formará dos fases. Una será el compuesto deseado y otra el agua, por lo que serán de fácil separación. Se basa en la inyección directa de vapor de agua en una mezcla compuesta por la sustancia que se desee extraer (volátil) y otra no volátil. A diferencia de una destilación simple, se obtiene un destilado puro que requiere únicamente de una decantación para su separación. En realidad, en lugar de “arrastrar”, el vapor de agua forma otra fase que no puede ser mezclada con la fase volátil; cediendo a esta su calor latente para lograr evaporarse. Al contar con dos fases inmiscibles, ambas se comportarán como si fueran la única sustancia en el destilador. La destilación por arrastre de vapor de agua es una técnica sencilla y económica. El mayor inconveniente que presenta es que el tiempo de espera para la obtención del compuesto a extraer es muy largo (Peredo-Luna *et al.*, 2009).

Según Cataldo-Mollo *et al.*, (2015), este método se divide en tres etapas:

1. Extracción: En esta etapa el vapor de agua que se introduce disminuye la presión de los componentes volátiles, reduciendo su temperatura. Se utiliza vapor de agua comúnmente para evitar que el componente que se desea extraer se mezcle con el vapor.
2. Condensación: El vapor de agua permite volatilizar el extracto de MS. Ambos se transportan por el condensador que a su vez es refrigerado por agua fría. La abrupta diferencia de temperaturas permite que el extracto se condense y se vuelva líquido, permitiendo su separación por diferencia de densidades.
3. Separación: Una vez que el vapor generado se condense, la mezcla de aceite y agua sale por el tubo o manguera del destilador. La separación se logrará por decantación donde el agua, que se encontrará en la parte inferior de la mezcla por tener mayor densidad, podrá eliminarse cuidadosamente dejando en el recipiente el aceite con metabolitos secundarios separado.

En la fig. 2, se puede apreciar el equipo necesario para realizar este tipo de extracción, así como la distribución del material.



Fig. 2 Esquema de un equipo de destilación por arrastre (Peredo-Luna et al., 2009).

Extracción con equipo Soxhlet

El método descrito por Ruiz-Reyes *et al.* (2010) describe que para la extracción de metabolitos secundarios por digestión se deberán colocar 15 g de muestra en las cápsulas de los tubos del equipo Soxhlet. Se agregarán 30 ml de etanol al 50 % v/v y se dejarán en el equipo por 24 horas.

Posteriormente agregar 90 ml de ácido sulfúrico al 10 % y 90 ml de etanol al 50% y calentar. Comenzar a tomar el tiempo de extracción hasta que la mezcla llegue a ebullición. Una vez concluido el tiempo, dejar enfriar y filtrar con vacío.

Lavar el residuo con 135 ml de etanol al 50%. Evaporar en baño maría hasta obtener la mitad del volumen inicial. Dejar enfriar por 30 minutos. Filtrar el precipitado haciendo cuatro lavados de 20 ml de agua destilada a 10°C.

Cuando se hayan realizado los lavados correctamente, eliminar el residuo del filtrado y los lavados. Los restos del recipiente y el papel filtro deberán ser enjuagados con 70 ml de etanol al 96%.

Extracción por maceración en frío sin agitación

La maceración es un proceso en el cual se pone en contacto una matriz sólida, como un material biológico en polvo, con un solvente durante un tiempo específico. El solvente puede ser agua, alcoholes alifáticos (como el etanol), o una mezcla de ambos. La combinación de la matriz sólida con el solvente se conoce como tintura (Duarte-Trujillo *et. al.*, 2018).

Para este método, descrito por Benítez *et. al.*, (2018), se necesitará el siguiente material:

- 6 gramos de muestra seca (molida o entera)
- 3 vasos de precipitado de 100 ml
- Alcohol al 98%
- Papel aluminio y cinta
- Espátula
- Probeta de 100 ml
- Vidrio de reloj
- Balanza Analítica

1. Colocar 2 g de muestra en cada vaso de precipitado.
2. Realizar tres muestras para cada proceso de extracción requerido.
3. Cubrir la muestra seca con 63 ml de alcohol etílico al 98% y asegurarse de que esté completamente cubierta.
4. Proteger la muestra cubriéndola con papel aluminio y asegurándolo con cinta para evitar la evaporación del solvente.
5. Dejar reposar las muestras durante un período de entre 12 y 48 horas para permitir la extracción de los compuestos.
6. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, separar el solvente de la muestra vegetal mediante filtración.

7. Transferir el residuo de cada extracción a una estufa de secado y mantenerlo a una temperatura de 30°C durante una hora.
8. Permitir que el material se enfríe hasta que sea manipulable y luego pesarlo para obtener el peso final.

La siguiente ecuación ayudará a obtener el valor del porcentaje de rendimiento de la extracción (%R), donde W_i es el peso inicial y W_f es el peso final.

$$\%R = \frac{w_i - w_f}{w_i} * 100$$

Nota: Para la extracción por maceración dinámica con aumento de temperatura realizar los pasos del 1 al 4 de la metodología descrita anteriormente. Posteriormente, colocar los recipientes sobre una parrilla de agitación y mantener a una temperatura de 20 a 25°C durante 6 horas y continuar con los pasos 6 al 8 (Duarte-Trujillo *et. al.*, 2018)

II. Métodos de extracción no convencionales

Extracción asistida por microondas

En la extracción asistida por microondas, se utiliza un sistema cerrado que consta de un recipiente hermético que contiene la muestra y el solvente. La muestra puede ser sólida o líquida, y el solvente se elige de acuerdo con la naturaleza de los compuestos a extraer (Azuola & Vargas, 2007).

Antes de utilizar un sistema de extracción por microondas, es importante considerar la naturaleza de los materiales involucrados. Collins (2008) clasifica los materiales en tres categorías: conductores, dieléctricos y aislantes. Los conductores, como los metales, reflejan las microondas y no permiten la conducción de calor. Los dieléctricos, como la porcelana, interactúan con las microondas y pueden alterar su patrón, lo que dificulta la generación de calor uniforme. Los aislantes, como el teflón, el vidrio o el cuarzo, permiten el paso de las microondas sin calentarse, pero retienen el calor emitido por la sustancia que contienen. Debido a estas características, los materiales aislantes son los más adecuados para realizar extracciones asistidas por microondas.

Se describirá a continuación la metodología propuesta por Rodríguez (2014) para la extracción asistida por microondas.

Pesar 2, 3, 4 y 5g de muestra preparada. Colocar la muestra en los cartuchos del equipo con 10 ml de disolvente. Probar con las variables de tiempo (5, 10, 15, 20 min) y temperatura (40, 50, 60, 70 y 80°C).



Fig. 3 Ejemplo de equipo de microondas (Rodríguez, 2014).

Extracción asistida por ultrasonido

El sonido de alta frecuencia utilizado en la sonicación o extracción por ultrasonido se genera mediante un transductor ultrasónico que convierte la energía eléctrica en vibraciones mecánicas. Estas vibraciones se transmiten al líquido de la muestra, creando una serie de ciclos de compresión y expansión. Durante la fase de compresión, se generan regiones de alta presión que pueden inducir la formación y colapso de microburbujas en el líquido. Cuando estas microburbujas colapsan, se generan fuerzas de cavitación, que producen intensas fuerzas de corte y turbulencia en la muestra, lo que resulta en la fragmentación de partículas, la ruptura de enlaces químicos o la liberación de compuestos de interés (Azuola & Vargas, 2007).

La siguiente metodología descrita por Corona-Jiménez (2016) propone la utilización de un equipo de ultrasonido de sonda UP400S Hielsher, Teltow, Alemania (fig. 4).

Colocar 5g de la muestra en el recipiente de extracción con 50 ml de hexano (o metanol), asegurando un adecuado sellado para evitar pérdidas o contaminaciones externas. A

continuación, someter la muestra a tratamiento de ultrasonido durante diferentes tiempos: 5, 10 y 15 minutos. Ajustar la intensidad del ultrasonido a amplitudes correspondientes al 50%, 75% y 100% de la potencia de salida, que en el caso del modelo UP400S es de 400 W.

Una vez finalizada la etapa de extracción, proceder a la centrifugación de la mezcla. Utilizar una velocidad de centrifugación de 2701 x g, a una temperatura de 4 °C, durante un tiempo de 10 minutos. Almacenar el sobrenadante obtenido por no más de 24 horas a 4°C en un recipiente oscuro hasta su análisis.

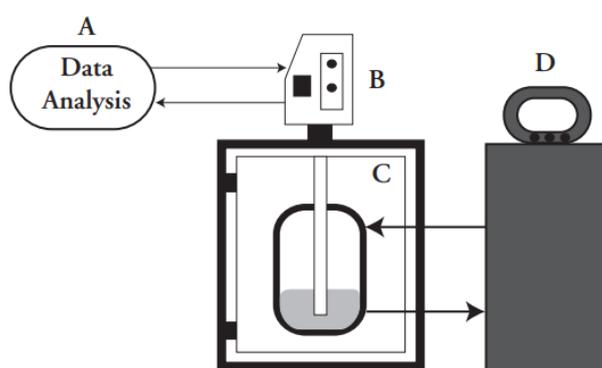


Fig. 4 Diagrama del equipo de extracción por ultrasonido UP400S. A: Computadora portátil, B: Sistema de sonda de ultrasonido, C: Recipiente de extracción con Camisa, D: Enfriador. (Corona-Jiménez, 2016).

Extracción por fluidos supercríticos

La utilización de fluidos supercríticos en la extracción ofrece un enfoque eficiente y sostenible para obtener compuestos de interés. La capacidad de ajustar las propiedades del fluido supercrítico mediante la manipulación de la temperatura y la presión brinda oportunidades para optimizar el proceso de extracción y obtener extractos de alta pureza.

El método descrito por Toro-Rojas (2012) utiliza un equipo de extracción supercrítica del tipo Spe-ed EFS-2 modelo 7071 (Applied Separations, Allentown, PA). Este equipo trabaja con reguladores de temperatura, presión y flujo. Tiene una cámara de calentamiento, un vaso de extracción, regulador de presión, colector de extracto y medidor de flujo de salida de solvente.

Es necesario preparar la mezcla seca y triturada con un solvente de apoyo (puede ser etanol si se utiliza CO₂ como solvente principal).

Se debe colocar 10 ml de solvente de apoyo gota a gota sobre 20g de muestra, hasta formar una mezcla homogénea. Cubrir y dejar reposar por 16 horas antes de la extracción.

Una vez transcurrido el tiempo colocar 20 g de sustrato húmedo en el vaso de extracción de 50 ml por cada muestra que se desee analizar. Colocar los vasos de extracción con muestras en el equipo de extracción supercrítica. La temperatura por utilizar puede variar entre los 40 y 60 °C y la presión entre 200 y 400 bares.

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS ESPECÍFICOS

Una vez que se hayan extraído los MS del material vegetal seleccionado, se debe realizar el análisis cuantitativo de los mismos presentes en el producto obtenido. Las metodologías utilizadas fueron propuestas por Cabrera-Carrión *et al.*, (2015).

1. Determinación cuantitativa de flavonoides

Los reactivos necesarios para realizar la extracción son, el extracto obtenido con cualquier método previamente descrito del material vegetal con el que se trabajará, cloruro de aluminio, metanol y agua destilada. Así mismo, se utilizarán como materiales: 6 tubos de ensayo pequeños, una micropipeta, una probeta de 100 ml, un matraz aforado de 100 ml, siete matraces aforados de 10 ml, un vaso de precipitado de 50 ml, un agitador de vidrio y un vidrio de reloj. Los equipos que se utilizarán son, un espectrofotómetro y una balanza analítica (Cabrera-Carrión *et al.*, 2015).

Se prepararán tres soluciones diferentes antes de comenzar con la extracción (Solución de AlCl₃ al 2%, Solución del extracto obtenido de 1 g/L, Solución de trabajo de 200 mg/L).

- a) Solución de AlCl₃ al 2% (Sol. 1): Pesar 3 g de AlCl₃ en el vidrio de reloj y diluir en un vaso de precipitado con 20 ml de agua destilada. Agitar hasta que se haya disuelto por completo. Verter la solución en un matraz aforado de 100 ml y aforar con agua destilada.
- b) Solución de extracto obtenido de 1 g/L (Sol. 2): Pesar 10 mg del extracto y disolver en 5 ml de metanol. Pasar la solución a un matraz aforado de 10 ml y aforar con metanol.

c) Solución de trabajo de 200 mg/L (Sol. 3): Tomar 2 ml de la sol. 2 y agregar a un matraz aforado de 10 ml. Aforar con metanol.

Posteriormente se prepararán las soluciones necesarias para elaborar una curva de calibrado. Con ella se obtendrán valores de referencia que serán usados para comparar la concentración real del extracto puro posteriormente. Se prepararán 5 soluciones a diferentes concentraciones (10, 20, 25, 40 y 50 mg/L) a partir de la Sol. 3 de 200 mg/L.

1. Tomar 2.5 ml de la Sol. 3 y aforar con metanol a 10 ml en un matraz para preparar la solución a 50 mg/L de concentración.
2. Tomar 2 ml de la sol. 3 y aforar con metanol a 10 ml en un matraz para la solución con concentración de 40 mg/L.
3. Para preparar la solución de 25 mg/L, se toman 5 ml de la solución de 50 mg/L y se aforan con metanol en un matraz de 10 ml.
4. Para preparar la solución de 20 mg/L, se toman 5 ml de la solución de 40 mg/L y se aforan con metanol en un matraz de 10 ml.
5. Por último, la solución de 10 mg/L se obtiene tomando 5 ml de la solución previamente obtenida de 20 mg/L. Verter en un matraz aforado de 10 ml y aforar con metanol.

Una vez preparadas todas las soluciones se tomará 1 ml de cada una de ellas y se colocarán respectivamente en tubos de ensayo de 5 ml. Agregar a cada tubo 1 ml de AlCl_3 al 2% y 1 ml de metanol. Preparar un blanco para calibrar el espectrofotómetro colocando 1.5 ml de metanol y 1.5 ml de solución de AlCl_3 al 2% en un tubo de ensayo.

Dejar reposar todas las soluciones por una hora. Pasado este tiempo, proceder a realizar las lecturas en el espectrofotómetro a 420 nm. Utilizar los valores de concentración y lecturas de absorbancia para realizar una curva de calibración.

Análisis del Extracto

Colocar 0.5 ml del extracto que se desee analizar en un tubo de ensayo. Agregar 1 ml de la solución de AlCl_3 al 2% y 1.5 ml de metanol. Al igual que las soluciones anteriormente preparadas, se dejará reposar por 1 hora. Realizar las lecturas en el espectrofotómetro a 420nm. Realizar por triplicado.

2. Determinación de taninos por método de titulación

Este método utiliza las reacciones de oxidación con permanganato de potasio (KMnO_4) como solución titulante para luego comparar las lecturas de las valoraciones con los valores conocidos del ácido tánico. Con este método se determinan taninos como polifenoles usando el método volumétrico de Lowenthal adaptado al método de la AOAC (1980), usando curva de calibración con ácido tánico como patrón de referencia, se utiliza KMnO_4 como solución titulante y al índigo de carmín como indicador, se determina el volumen (ml) de permanganato de potasio requeridos para oxidar los fenoles presentes en la muestra (Cabrera-Carrión *et al.*, 2015).

Se deberán preparar las siguientes soluciones para la cuantificación de fenoles no taninos:

- A) Solución Índigo Carmín: Pesar 0.2 g de índigo tindisulfonato (NaSO_3)₂. Disolver en 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Colocar la mezcla en un matraz aforado de 100 ml y aforar con agua destilada.
- B) Solución Ácido Oxálico: Disolver 0.45 g de ácido oxálico, previamente secado a 60°C por 1 hora, en agua. Colocar en un matraz aforado de 50 ml y aforar con agua destilada.
- C) Agar al 10%: Pesar 10 g de agar y disolver en 100 ml de agua destilada.
- D) Solución de Cloruro de Sodio Ácida: Saturar con cloruro de sodio una solución de ácido sulfúrico al 5%.
- E) Realizar la valoración del permanganato de potasio (KMnO_4) con ácido oxálico.

Para realizar la curva de calibrado es necesario preparar 5 soluciones patrón que servirán como material de referencia en el análisis de resultados.

Para fenoles taninos:

1. Se preparan cinco soluciones con ácido tánico a diferentes concentraciones (5, 10, 20, 40 y 50 mg/ L).
2. Titular cada una con KMnO_4 por triplicado. Anotar los resultados en una tabla, concentración de ácido tánico vs volumen de KMnO_4 .
3. De las soluciones utilizadas anteriormente (concentraciones (5, 10, 20, 40 y 50 mg/ L) se colocarán, en distintos vasos de precipitado, 5ml de cada una. Agregar 2 ml de índigo

carmín y 100 ml de agua destilada y titular con KMnO_4 . Anotar los volúmenes gastados para cada concentración y realizar una curva de calibración.

Para fenoles no taninos:

1. Tomar 5 ml de las soluciones con ácido tánico a diferentes concentraciones (5, 10, 20, 40 y 50 mg/ L) y agregar 2.5 ml de la solución de agar al 10%, 5 ml de solución de NaCl ácida y 0.5 g de caolín en polvo a cada una.
2. Agitar las muestras por 30 minutos sin aumentar la temperatura. Dejar sedimentar y filtrar.
3. A la solución filtrada se le agregarán 5ml de índigo carmín y se aforarán a 100 ml con agua destilada.
4. Titular con KMnO_4 . Realizar la curva de calibración para fenoles no taninos.

Análisis de la muestra

Parte 1

Tomar 5 ml del extracto de MS obtenido a través de cualquiera de los métodos descritos anteriormente y mezclar con 5 ml de la solución índigo carmín. Aforar en un matraz aforado de 100 ml con agua destilada.

Titular con KMnO_4 hasta observar un cambio de color de azul a verde. Posteriormente, agregar de gota a gota el KMnO_4 hasta observar el viraje a un color amarillo brillante. Asignar el número o letra que se prefiera para identificar la solución titulada (ejemplo: Solución “A”).

Parte 2

Tomar otros 5 ml del extracto que se tenga y mezclarlos con 2.5 ml de solución de agar al 10%, 5 ml de solución de NaCl ácida y 0.5 g de caolín en polvo. Agitar las muestras por 30 minutos sin aumentar la temperatura. Dejar sedimentar y filtrar. A la solución filtrada se le agregarán 5 ml de índigo carmín y se aforarán a 100 ml con agua destilada. Titular con KMnO_4 . Asignar el número o letra, diferente al asignado previamente, que se prefiera para identificar la solución titulada (ejemplo: Solución “B”)

Calcular la cantidad de fenoles taninos y no taninos con ayuda de las curvas de calibración y los promedios obtenidos de las titulaciones “A” y “B” como se muestra en la tabla 1.

Tabla 2. Simulación de resultados de promedios y curvas de calibración.

Promedio de las titulaciones de "A"	Concentración con curva de calibración	Promedio de las titulaciones de "B"	Concentración con curva de calibración
A= 1.4 ml	Y-0.15/0.005	B= 0.4 ml	$Y-0.114/0.0037=$ $(0.4-0.114) / 0.0037$

Fuente: *Cabrera-Carrión et al., 2015.*

3. Determinación Cuantitativa de Alcaloides

Esta metodología está basada en la técnica descrita por *Rojas et al., (2015)*, el cual se fundamenta con la reacción de alcaloides que contienen nitrógeno en su composición con la sustancia verde de bromocresol (BCG), susceptible al equipo de espectrofotometría con una lectura a 470 nm. Este método es sencillo, eficaz y no se ve interferido por otros compuestos.

Los equipos y materiales necesarios para esta técnica son los siguientes:

- Atropina
- Solución fosfato ácido de sodio (pH 4.7)
- Agua destilada
- Verde bromocresol
- Cloroformo
- Hidróxido de sodio
- Papel aluminio
- Pipetas de 1ml y 5ml
- Vasos de precipitado de 25,50,100 y 250ml
- Tubos de ensayo
- Embudos
- Equipo de venoclisis
- Balanza
- Espectrofotómetro

Procedimiento:

1. Preparar las soluciones de trabajo.

Para la solución de verde bromocresol, pesar 70 mg de verde bromocresol y mezclar en un vaso de precipitado con 3 ml de NaOH y 5 ml de agua destilada. Aforar en un matraz balón a 1 litro.

Para la solución de ácido cítrico, aforar a 1 litro 42 g de ácido cítrico.

Para la solución tampón de fosfato ácido de sodio, aforar 71.6 g de fosfato a 1 litro y corregir pH hasta 4.7.

Por último, aforar 1mg de atropina en un matraz volumétrico de 10 ml.

2. Preparar la curva de calibración.

Medir alícuotas de la solución de atropina de 0.5, 0.8, 1, 1.2, 1.5 y 2 ml. Colocar cada una en diferentes embudos de separación.

Preparar un blanco con agua destilada y 6 soluciones patrones con cada alícuota (de 0.5, 0.8, 1, 1.2, 1.5 y 2 ml), colocando en cada embudo de separación 5 ml de fosfato y 5 ml de verde bromocresol. Agregar 2 ml de cloroformo a los siete embudos.