



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE FLAVONOIDES DE
BIOMASA DE CHILE (*Capsicum annuum* L.) MEDIANTE
DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS ASISTIDOS POR
ULTRASONIDO**

Por:

LCA. LUIS ALFONSO JIMÉNEZ ORTEGA

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS PARA
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Luis Alfonso Jiménez Ortega, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



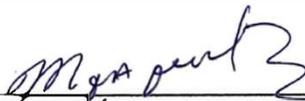
Dr. José Basilio Heredia
Director de tesis



M.I. Pedro de Jesús Bastidas Bastidas
Integrante del comité de tesis



Dr. Josué David Mota Morales
Integrante del comité de tesis



Dr. Miguel Ángel Angulo Escalante
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Optimización de la Extracción de Flavonoides de Biomasa de Chile (*Capsicum annuum* L.) Mediante Disolventes Eutécticos Profundos Asistidos por Ultrasonido” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Luis Alfonso Jiménez Ortega, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pablo Wong González".

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico brindado durante mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD), por brindarme la facilidad de instalaciones e infraestructura para desarrollar mis estudios de posgrado.

Al proyecto financiado por CONACyT: Desarrollo de Innovaciones Tecnológicas para una Agricultura Mexicana Libre de Agroinsumos Tóxicos, del cual se obtuvo recursos para el desarrollo del presente estudio.

Al Dr. Basilio Heredia por aceptarme en su grupo de trabajo y por la confianza brindada. Por aceptar incursionar en esta línea de investigación. Por todas las oportunidades brindadas para enseñar a otros y por las invitaciones de escritura ¡Muchas gracias!

Al Mtro. Pedro Bastidas por todas las facilidades brindadas en su laboratorio, por estar siempre en la mejor disposición de ayudarme, por el compromiso y dedicación que tuvo como profesor y asesor. Por todos los consejos e ideas brindadas, por toda su enseñanza la cual fue de gran valía para mí. Por fomentar el superarme cada día más, por siempre estar receptivo a las nuevas propuestas. Gracias por el tiempo y recursos compartidos y depositados en este estudio.

Al Dr. Josué Mota por aceptar formar parte de mi comité, compartir su conocimiento e ideas, estar en la mejor disposición de hacer colaboraciones, por su compromiso y dedicación a este trabajo y gracias por fomentar en mí las ganas de siempre crecer profesionalmente y demostrarme que se puede llegar lejos.

Al Dr. Miguel Angulo por apoyarme con la facilidad de trabajar en su laboratorio y por ayudarme a visualizar el potencial industrial de recursos naturales.

Agradezco el apoyo de mi familia en particular de mi esposa Bárbara por confiar en mí, por apoyarme en esta incursión, por fomentarme siempre, por la paciencia, tolerancia, comprensión, y valor mostrado durante este periodo. A mi familia Alma, Eduardo, Carlos y Víctor por enseñarme todo lo que soy.

DEDICATORIA

Dedico la presente tesis a mi esposa Bárbara, por toda la paciencia, tolerancia y comprensión mostrada durante estos dos años, por siempre estar ahí al pie del cañón, por ser una excelente mujer, amiga y esposa. Por todos los sacrificios que hemos pasado, por todo eso y más, te dedico el presente trabajo. ¡Gracias barbie!

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIAS	5
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	17
2.1 Producción Agrícola de México.....	17
2.1.1 Impacto Ambiental.....	17
2.1.2 Aprovechamiento de Biomasa Agrícola.....	18
2.1.2.1 Composición.....	19
2.2 Chile (<i>Capsicum annum</i> L.).....	21
2.2.1 Generalidades.....	21
2.2.2 Producción.....	23
2.2.3 Usos Etnofarmacológicos.....	23
2.2.5 Pimiento Morrón.....	25
2.3 Metabolitos secundarios.....	27
2.3.1 Clasificación General.....	28
2.3.1.1 Biosíntesis de fenilpropanoides.....	30
2.3.1.1.1 Ruta biosintética del ácido shikímico.....	30
2.3.1.1.2 Ruta biosintética de fenilpropanoides.....	30
2.3.1.1.3 Ruta biosintética de ácidos fenólicos.....	31
2.3.1.1.4 Ruta biosintética de flavonoides.....	32
2.4 Flavonoides.....	32
2.4.1 Clasificación.....	32
2.4.1.1 Chalconas.....	33
2.4.1.2 Auronas.....	33
2.4.1.3 Flavonas.....	34
2.4.1.4 Flavonoles.....	34
2.4.1.5 Flavanonas.....	34
2.4.1.6 Flavanoles (flavan-3-ols).....	35
2.4.1.7 Flavanonoles.....	35
2.4.1.8 Isoflavonoides.....	35
2.4.1.9 Antocianidinas.....	35
2.4.2 Fuentes Principales.....	36

CONTENIDO (continuación)

2.4.3 Potencial Antioxidante y Funcionalidad Biológica.....	37
2.5 Química Verde.....	42
2.6 Métodos de Extracción de Metabolitos Secundarios.....	44
2.6.1 Tradicionales.....	45
2.6.1.1. Maceración con disolventes orgánicos.....	45
2.6.1.2 Toxicidad e impacto ambiental.....	46
2.6.2 Emergentes.....	46
2.6.2.1 Disolventes Eutécticos Profundos (DES).....	46
2.6.2.1.1 Síntesis.....	49
2.6.2.1.2 Propiedades fisicoquímicas.....	49
2.6.2.1.3. Usos.....	52
2.6.2.1.4 Evaluación ambiental y toxicidad de DES.....	53
2.6.2.1.5 DES para extracción de metabolitos secundarios.....	55
2.7. Ultrasonido.....	58
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	61
4. JUSTIFICACIÓN.....	62
5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	63
6. HIPÓTESIS.....	64
7. OBJETIVOS.....	65
7.1 Objetivo General.....	65
7.2 Objetivos Particulares.....	65
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	66
8.1 Material en Estudio.....	66
8.2 Acondicionamiento.....	66
8.3 Identificación de Fitoquímicos de Biomasa de Pimiento Morrón (Etapa I).....	67
8.3.1 Extracción de Fitoquímicos por Disolventes Orgánicos.....	67
8.3.2 Tamizaje Fitoquímico.....	67
8.3.3 Identificación de Compuestos Orgánicos Volátiles Mediante GC/MS.....	70
8.4 Síntesis de DES (Etapa II).....	71
8.5 Evaluación Fisicoquímica y Espectroscópica de los DES Sintetizados.....	72
8.5.1 pH.....	72
8.5.2 Densidad.....	72
8.5.3 Viscosidad.....	72
8.5.4 Conductividad Eléctrica.....	73
8.5.5 Miscibilidad.....	73
8.5.6 Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).....	73
8.5.7 Análisis Estadístico.....	73
8.6 Extracción de Flavonoides Totales, Luteolina 7- <i>O</i> -glicósido y Quercetina 3- <i>O</i> -ramnósido para Seleccionar el HBD (Etapa III).....	74
8.6.1 Cuantificación de Flavonoides Totales.....	74

CONTENIDO (continuación)

8.6.2 Cuantificación de Luteolina 7- <i>O</i> -glicósido y Quercetina 3- <i>O</i> -ramnósido.....	74
8.6.3 Análisis Estadístico.....	75
8.7 Optimización del Proceso de Extracción de Flavonoides Totales, Luteolina-7- <i>O</i> -glicósido y Quercetina 3- <i>O</i> -ramnósido (Etapa IV).....	76
8.8 Evaluación Antioxidante <i>in vitro</i> del Extracto Optimizado (Etapa V).....	77
8.8.1 ABTS/TEAC.....	77
8.8.2 DPPH.....	78
8.8.3 ORAC.....	78
8.8.4 FRAP.....	79
8.8.5 Análisis Estadístico.....	79
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	80
9.1 Identificación de Fitoquímicos de Biomasa de Pimiento Morrón (Etapa I).....	80
9.1.1 Tamizaje Fitoquímico.....	80
9.1.2 Identificación de Compuestos Orgánicos Volátiles Mediante GC/MS.....	83
9.2 Evaluación Fisicoquímica y Espectroscópica de los DES Sintetizados (Etapa II).....	86
9.2.1 pH.....	87
9.2.2 Densidad.....	89
9.2.3 Viscosidad.....	91
9.2.4 Conductividad Eléctrica.....	92
9.2.5 Miscibilidad.....	94
9.2.6 Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).....	96
9.3 Extracción de Flavonoides Totales, Luteolina 7- <i>O</i> -glicósido y Quercetina 3- <i>O</i> -ramnósido para Seleccionar el HBD (Etapa III).....	100
9.3.1 Cuantificación de Flavonoides Totales.....	101
9.3.2 Cuantificación de Luteolina 7- <i>O</i> -glicósido y Quercetina 3- <i>O</i> -ramnósido.....	106
9.4 Optimización del Proceso de Extracción de Flavonoides Totales, Luteolina-7- <i>O</i> -glicósido y Quercetina 3- <i>O</i> -ramnósido (Etapa IV).....	111
9.4.1 Flavonoides Totales.....	111
9.4.2 Luteolina 7- <i>O</i> -glicósido.....	113
9.4.3 Quercetina 3- <i>O</i> -ramnósido.....	115
9.4.4 Optimización.....	119
9.5 Evaluación Antioxidante <i>in vitro</i> del Extracto Optimizado (Etapa V).....	124
10. CONCLUSIONES.....	127
11. RECOMENDACIONES.....	129
12. REFERENCIAS.....	130

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Pirámides de valorización de biomasas y estrategias de prevención de desperdicios agrícolas y alimenticios.....	21
2. Diversidad de <i>Capsicum</i> spp.....	22
3. Clasificación general de fitoquímicos.....	29
4. Estructura molecular de los flavonoides.....	33
5. Causas que propician el estrés oxidativo y su efecto en las células.....	39
6. Estructura de la quercetina, resaltando los grupos OH y dobles enlaces responsables de la capacidad antioxidante.....	40
7. Maceración con disolventes orgánicos.....	46
8. Diagrama de fases eutéctico.....	47
9. Formación de los DES.....	49
10. Interacciones supramoleculares entre el aceptor y donador de enlaces de hidrógenos	50
11. Modelo por el cual los DES son capaces de solubilizar fitoquímicos de células vegetales.....	57
12. Fenómenos químicos y físicos ocurridos durante la ultrasonicación.....	59
13. pH de los DES evaluados a 20 °C.....	88
14. Densidad de los DES evaluados a 20 °C.....	90
15. Conductividad eléctrica de los DES evaluados a 20 °C.....	93
16. Espectro de infrarrojo del DES ChCl/ácido láctico 1:1 y 1:4 molar.....	97
17. Espectro de infrarrojo del DES ChCl/ácido levulínico 1:1 y 1:4 molar.....	97
18. Espectro de infrarrojo del DES ChCl/1,4 butanediol 1:1 y 1:4 molar.....	98
19. Espectro de infrarrojo del DES ChCl/Etilenglicol 1:1 y 1:4 molar.....	99
20. Espectro de infrarrojo del DES ChCl/glicerol 1:1 y 1:4 molar.....	99
21. Espectro de infrarrojo del DES ChCl/1,6 hexanediol 1:1 y 1:4 molar.....	100
22. Extracción de flavonoides totales mediante DES y disolventes orgánicos.....	102
23. Extracción de quercetina3- <i>O</i> -ramnósido mediante DES y disolventes orgánicos.....	107
24. Estructura molecular de la quercetina3- <i>O</i> -ramnósido y luteolina 7- <i>O</i> -glucósido.....	108
25. Extracción de luteolina 7- <i>O</i> -glucósido mediante DES y disolventes orgánicos.....	109

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Página
26. Gráfica de contorno de flavonoides totales, donde se observa la región donde se optimiza la extracción acorde a la potencia y al tiempo de extracción.....	113
27. Gráfica de superficie de respuesta para flavonoides totales.....	113
28. Gráfica de contorno de luteolina 7- <i>O</i> -glucósido, donde se observa la región donde se optimiza la extracción acorde a la potencia y al tiempo de extracción.....	115
29. Gráfica de superficie de respuesta para luteolina 7- <i>O</i> -glucósido.....	115
30. Gráfica de contorno de quercetina 3- <i>O</i> -ramnósido, donde se observa la región donde se optimiza la extracción acorde a la potencia y al tiempo de extracción.....	117
31. Gráfica de superficie de respuesta para quercetina 3- <i>O</i> -ramnósido.....	117
32. Gráfica de contornos superpuestas de las tres variables para optimizar la extracción de flavonoides totales, quercetina 3- <i>O</i> -ramnósido y luteolina 7- <i>O</i> -glicósido.....	120

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Metabolitos secundarios y funcionalidades identificadas en subproductos de <i>Capsicum annuum</i> spp.....	26
2. Sitios de almacenamiento de fitoquímicos en plantas.....	29
3. Clasificación de los flavonoides de acuerdo a su precursor biosintético.....	31
4. Clasificación de radicales libres y no radicales.....	38
5. Donadores y aceptores de hidrógenos usados para sintetizar DES.....	48
6. Métodos para realizar el tamizaje fitoquímico.....	67
7. Rampa de temperatura del horno del cromatógrafo de gases.....	70
8. Aceptor y donadores de hidrógenos empleados en el estudio.....	71
9. Diseño central compuesto rotatable con variables codificadas y naturales.....	76
10. Tamizaje fitoquímico de biomasa de pimiento morrón.....	82
11. Compuestos orgánicos volátiles presentes en la biomasa de pimiento morrón.....	83
12. Viscosidad en megapascales (mPa.s) de los DES evaluados a 20 °C.....	91
13. Miscibilidad de los DES evaluados en disolventes orgánicos.....	95
14. Miscibilidad de los DES evaluados en solventes orgánicos.....	95
15. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable de respuesta flavonoides totales.....	112
16. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable de respuesta luteolina 7- <i>O</i> -glucósido.....	114
17. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable de respuesta quercetina 3- <i>O</i> -ramnósido.....	116
18. Resultados experimentales de flavonoides totales, quercetina 3- <i>O</i> -ramnósido, luteolina 7- <i>O</i> -glucósido de las 13 corridas del diseño central compuesto rotatable.....	118
19. Valores experimentales obtenidos siguiendo las condiciones óptimas arrojadas por el modelo matemático.....	119
20. Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> del extracto optimizado.....	124

RESUMEN

México es el segundo productor agrícola de Chile a nivel mundial, por consiguiente su modelo de producción intensiva genera grandes cantidades de biomasa (hojas, tallos, semillas, raíces y frutos de desecho), la cual si no se trata de forma sustentable puede impactar de forma negativa al medio ambiente. Esta biomasa contiene cantidades importantes de compuestos benéficos para la salud humana. Para extraer estos compuestos en un marco de sustentabilidad es necesario el uso de tecnologías alternativas que se apeguen a los principios de la química verde, como los disolventes eutécticos profundos (DES). Los DES son disolventes que además de ser biodegradables, presentan baja toxicidad y bajo impacto ambiental, por lo que representan una alternativa viable para la extracción de fitoquímicos de biomásas agrícolas. El objetivo de la presente investigación fue optimizar la extracción de flavonoides con actividad antioxidante de biomasa agrícola (tallos y hojas) de pimiento morrón, mediante DES asistidos de ultrasonido. Para esto se sintetizaron y evaluaron las características fisicoquímicas (pH, densidad, viscosidad, miscibilidad, conductividad eléctrica) y espectroscópicas (FTIR) de varios DES basados en cloruro de colina (ChCl); se identificaron los fitoquímicos presentes en la biomasa de pimiento morrón por medio de pruebas colorimétricas y se optimizó la extracción de flavonoides totales, quercetina 3-*O*-ramnósido y luteolina 7-*O*-glicósido mediante un diseño central compuesto rotatable. Para cuantificar ambos metabolitos se usó UPLC-ESI-MS/MS, mientras que para evaluar el potencial antioxidante *in vitro* del extracto optimizado se usaron pruebas colorimétricas (ABTS, DPPH, ORAC y FRAP). Los DES presentaron propiedades tanto fisicoquímicas como espectroscópicas características, producto de la formación de enlaces de hidrógeno entre sus componentes. El DES con mayor capacidad de extracción de flavonoides fue ChCl/1,6 hexanediol 1:1 molar, con 906.05 ± 3.39 mg EQ/100 g de BS (base seca), siendo superior a los controles con disolventes convencionales. Así mismo se logró optimizar el tiempo (35.30 seg) y potencia del ultrasonido (74.89 %), obteniendo 14.54 ± 0.49 y 14.14 ± 0.16 $\mu\text{g/g}$ BS de quercetina 3-*O*-ramnósido y luteolina 7-*O*-glicósido, respectivamente, los cuales mostraron tener capacidad antioxidante. La biomasa de pimiento morrón es fuente de flavonoides antioxidantes, por lo que es posible recuperarlos con DES, los cuales son superiores a los disolventes convencionales en cuanto a capacidad de extracción.

Palabras clave: Fitoquímicos, Disolventes Eutécticos Profundos, Flavonoides, Antioxidantes.

ABSTRACT

Mexico is the second agricultural producer of chili worldwide, therefore its intensive production model generates a significant amount of biomass (leaves, stems, seeds, roots, and waste fruits), which if not treated sustainably can negatively impact the environment. This biomass contains large amounts of beneficial compounds for human health. To extract these compounds within a sustainable framework, it is necessary to use alternative technologies that adhere to green chemistry principles such as deep eutectic solvents (DES). DES are type of solvent that, in addition to being biodegradable, have low toxicity and low environmental impact, so they represent a viable alternative extraction of phytochemicals from agricultural biomass. The objective of this research was to optimize the extraction process of flavonoids with antioxidant activity from agricultural biomass (leaves and stems) of bell pepper, utilizing ultrasound-assisted DES. For this, the various choline chloride (ChCl)-based DES were synthesized and their physicochemical (pH, density, viscosity, electrical conductivity) and spectroscopic (FTIR) characteristics were evaluated. The phytochemicals present in the biomass of bell pepper were identified and the extraction of quercetin 3-*O*-rhamnoside and luteolin 7-*O*-glucoside was optimized by employing a central rotating compound design. UPLC-ESI-MS/MS was used to quantify both metabolites. To evaluate the antioxidant potential of the optimized extract, colorimetric tests (ABTS, DPPH, ORAC, and FRAP) were used. The DES exhibited characteristic physicochemical and spectroscopic properties as a result of hydrogen bond formation between their components. DES with the highest flavonoid extraction capacity was ChCl/1.6 hexanediol 1:1 molar, with 906.05 ± 3.39 mg EQ/100 g of dry biomass, higher than controls with conventional solvents. Likewise, optimizing the time (35.30 sec) and the ultrasound extraction power (74.89 %) it was possible to, extract 14.54 ± 0.49 and 14.14 ± 0.16 $\mu\text{g/g}$ of quercetin 3-*O*-rhamnoside and luteolin 7-*O*-glycoside, respectively, which showed antioxidant activity. Non-food bell pepper biomass is a source of antioxidant flavonoids, thus it could be valued by recovering them with DES, which is superior to conventional solvents in terms of extraction capacity.

Keywords: Valorization, Phytochemicals, Deep eutectic solvents, Flavonoids, Antioxidants

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura intensiva es una parte importante del motor alimentario mundial, puesto que de ahí derivan los principales productos alimenticios como granos, semillas, frutas y hortalizas, las cuales proveen de nutrimentos importantes para el mantenimiento del organismo, como vitaminas, minerales, antioxidantes y otros compuestos que coadyuvan a mantener una buena salud y nutrición. Se prevé que la población mundial para el 2030 aumente a más de 8 mil millones de personas. Por lo tanto para asegurar la nutrición y disponibilidad de alimentos se estima un incremento proporcional en la producción de alimentos agrícolas. Según la FAO, la producción agrícola aumentará un 70 % más de lo producido actualmente, por lo que se intensificarán los sistemas productivos, lo cual se espera que impacte directamente al medio ambiente (FAO, 2020a, 2020b).

Los principales impactos medioambientales de la agricultura provienen del uso de agroquímicos, y de la producción de materia orgánica, sedimentos, sales, entre otros insumos inorgánicos (como los plásticos) los cuales al final de la cosecha se suelen verter a cuerpos de agua, o se combustionan. La FAO menciona a la agricultura como el mayor productor de aguas residuales, además, se añaden a las tierras de cultivo, más de 115 millones de toneladas de fertilizantes nitrogenados minerales lo que propicia una acumulación en suelos, que si no se tratan de forma adecuada, más del 35 % puede terminar en los océanos.

El uso de fertilizantes, herbicidas, fungicidas y otros plaguicidas asciende a 4.6 millones de toneladas anualmente, de las cuales el 25 % son usados en países en vías de desarrollo. Por otro lado más de 700 xenobióticos y sus metabolitos (productos de transformación), han sido identificados en medios acuáticos, sin mencionar la presencia de dioxinas en el aire, producto de la quema de residuos agrícolas que potencialmente merman la salud de los trabajadores del campo, así como de comunidades aledañas. Un compuesto altamente tóxico que se deriva de la quema agrícola es el carbono negro el cual está presente en partículas de 2.5 μm las cuales pueden penetrar los pulmones y el torrente sanguíneo, ocasionando patologías cardíacas, pulmonares, cáncer, entre otras, provocando más de 7 millones de muertes prematuras anualmente, además de acelerar el calentamiento global de 460 a 1,500 veces más que el dióxido de carbono (CCA, 2014; FAO, 2018; ONU, 2020).

En México existe la NOM-015-SEMARNAT/SAGARPA-2007, la cual regula el uso de fuego en el sector agrícola, pecuario y forestal, aunado al programa establecido por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural "Mi parcela no se quema", la cual promueve otros métodos de valorización de subproductos agrícolas, para evitar ser quemados. Sin embargo, se cuenta con indicios de que aún se sigue llevando a cabo quemados de parcelas y desechos orgánicos agrícolas (DOF, 2009; SADER, 2020; SADER, 2021).

México es el segundo productor de chile a nivel mundial. Es un cultivo con alto valor económico; durante el 2021 se cosecharon 147,807.80 hectáreas representando un valor de la producción de \$ 30, 642,661.36. El estado de Sinaloa es el principal productor, en el 2021 produjo 659,683.91 toneladas de chile verde. Los mercados extranjeros que mayor demandan este producto son Estados Unidos, Canadá y España. Se estima que para el 2030 se producirán alrededor de 4.49 millones de toneladas. Los principales tipos de chiles producidos son pimiento morrón, jalapeño, poblano y serrano (SIAP 2020; SAGARPA 2016). Los grandes volúmenes de producción de este fruto, desprenden miles de toneladas de biomasa (hojas, tallos, raíces, frutos), los cuales al final de la cosecha, el productor no suele aprovechar su potencial, por el contrario las disposiciones finales afectan al medio ambiente y a la salud humana y animal (Castro-Garzón *et al.*, 2020; CYTED, 2020; ONU, 2020; Polenta, 2016).

La biomasa es una fuente abundante de fitoquímicos como flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides, alcaloides, terpenos, saponinas, entre otros, los cuales han demostrado ser antioxidantes, anticancerígenos, antitumorales, antidiabéticos, antiobesogénicos y antimicrobianos, por mencionar algunas. Dicho esto es importante buscar alternativas de valorización de biomasa, como la obtención de nutraceuticos para la producción de alimentos funcionales y/o suplementos alimenticios, que puedan coadyuvar a mejorar la salud de quién los consume. Así mismo se pueden generar bioplaguicidas que se puedan usar en los mismos cultivos, generando una economía circular y sustentable. Todo esto puede generar nuevas fuentes de empleo, industrias y por ende la economía del estado incrementaría (Kavitha *et al.*, 2020; Kosseva, 2020; Nguyen, 2017; Sharma *et al.*, 2018).

La valorización debe llevarse a cabo de forma sustentable y ecológica. En este sentido, es altamente deseable que la extracción de los fitoquímicos se realice con disolventes verdes, es decir que no generen una contaminación medio ambiental o residuos tóxicos secundarios. Es por ello que el auge de los disolventes eutécticos profundos (DES) y disolventes eutécticos profundos naturales

(NaDES) ha incrementado en los últimos años y se ha posicionado como una alternativa viable y escalable a los disolventes orgánicos volátiles comúnmente usados. Estos disolventes están compuestos por aceptores y donadores de protones (es decir forman enlaces de hidrógeno) como cloruro de colina, betaína, urea, azúcares, ácidos orgánicos, terpenos, alcoholes y ácidos grasos, los cuales no generan toxicidad, ni residualidad, además de presentar una alta capacidad de extracción de fitoquímicos en comparación con los disolventes tradicionales (Clarke *et al.*, 2018; Ji *et al.*, 2020; Kalhor *et al.*, 2019).

El objetivo del presente estudio fue optimizar la extracción de flavonoides de biomasa de pimiento morrón (*Capsicum annuum* L), mediante DES basados en cloruro de colina, asistidos de ultrasonido.

2. ANTECEDENTES

2.1 Producción Agrícola de México

México se caracteriza por sus altos volúmenes de producción agrícola, las condiciones climatológicas y edafológicas lo hacen un sitio altamente rentable y productivo en comparación con otros países. En el 2020 según el SIAP (2021), los cultivos de mayor producción fueron el maíz en grano, frijol, sorgo en grano, avena forrajera en verde, maíz forrajero en verde, trigo en grano, cebada en grano, sorgo forrajero en verde, soya y chile verde. En cuanto al valor de su producción destacan el maíz grano, chile verde, tomate rojo, sorgo en grano, frijol, papa, trigo en grano, maíz forrajero en verde, fresa y algodón hueso.

Los estados mayores productores de hortalizas durante el 2020 en la modalidad riego y temporal, fueron Zacatecas, Tamaulipas, Sinaloa, Jalisco, Guanajuato, Chiapas, Chihuahua, Puebla, Veracruz y México, esto por su cantidad de hectáreas cosechadas. Sin embargo los estados con mayor valor de su producción fueron Sinaloa, Jalisco, Guanajuato, Sonora, Michoacán, Chihuahua, Zacatecas, México, Tamaulipas y San Luis Potosí (SIAP, 2021).

Tan solo en el 2020 se cultivaron 14, 250,395.2 hectáreas, de las cuales se cosecharon 13, 572,178.42, representando un valor de \$ 343, 683,571.1. Sin duda México es un país con potencial agroalimentario, sin embargo la gestión de residuos debe ser estricta y monitoreada constantemente, puesto que también se derivan enormes cantidades de desechos y subproductos los cuales en algunas ocasiones no se les da la disposición correcta, ocasionando serios daños medioambientales y de salud (SIAP, 2021).

2.1.1 Impacto Ambiental

Los grandes volúmenes de producción de hortalizas y frutos, originan miles de toneladas de biomasa y subproductos tales como hojas, tallos, raíces y frutos, los cuales si no se tratan

adecuadamente pueden ejercer un impacto negativo en el medio ambiente. Además de contaminar por sí mismos (proliferación de fauna nociva, putrefacción, afectaciones paisajísticas), contienen residuos de plaguicidas, los cuales generan una contaminación mayor, ya que esta biomasa se suele quemar, arrojar a cuerpos de agua, o reintegrar al suelo. Todas estas prácticas propician serios daños medioambientales, ya que desprenden metabolitos y dioxinas para el ecosistema y que, a través de su difusión en el suelo, pueden lixivarse a aguas subterráneas alterando el equilibrio biológico y contaminando los mantos freáticos.

Producto de la combustión en el aire se liberan dioxinas y metabolitos, generando serios daños al sistema respiratorio del ser humano. Además, esta práctica en vez de beneficiar al suelo, ocasiona pérdida de nutrientes, destrucción de microorganismos y organismos benéficos, aumenta la erosión, entre otros efectos no deseados (CCA, 2014; del Puerto Rodríguez *et al.*, 2014; FAO, 2018; Li *et al.*, 2021; ONU, 2020; RAPAM, 2017; SADER, 2020; SADER, 2021; Zaynab *et al.*, 2021).

Se han identificado plaguicidas y otros xenobióticos como hidrocarburos policíclicos aromáticos alrededor del mundo, esto consecuencia de quemas agrícolas. Estos contaminantes por las corrientes trans-pacíficas se transportan miles de kilómetros. Un ejemplo de esto es que se han identificado en Estados Unidos, residuos de dieldrin, lindano y clorpirifos, provenientes de incendios forestales y quemas agrícolas en Siberia, Rusia (Genualdi *et al.*, 2009).

Algunas de las prácticas dadas a estos residuos agrícolas, han demostrado que no generan utilidad, si no que contaminan al medio ambiente, causando pérdidas al productor (Galanakis, 2013; Kalhor *et al.*, 2019; Kasapidou *et al.*, 2015; Nayak *et al.*, 2019). Por lo que valorizar las biomásas y generar modelos de agricultura sostenible basados en una bioeconomía circular es una tendencia en la investigación tanto básica como aplicada (Duque-Acevedo *et al.*, 2020).

2.1.2 Aprovechamiento de Biomasa Agrícola

Investigaciones recientes describen la importancia de la valorización de biomásas, ya que son fuente de compuestos de importancia médica y alimenticia, además que se coadyuva a mitigar el impacto ambiental de la agricultura. Es por ello que la búsqueda de aplicaciones que sean rentables y sustentables es un tema de investigación de alto impacto para la agricultura y sustentabilidad de

los países primeros productores de frutas y hortalizas como lo es México.

Actualmente se han publicado numerosos libros y publicaciones científicas donde se recopilan usos y posibles transformaciones agroindustriales de biomasa, destacando su alta sustentabilidad, rentabilidad y factibilidad económica e industrial (Amran *et al.*, 2021; Anal, 2017; Cattaneo *et al.*, 2021; Doria *et al.*, 2021; Kosseva, 2020; Kumar, 2020; Majerska *et al.*, 2019; Nguyen, 2017; Yang *et al.*, 2021).

La biomasa tiene amplias aplicaciones industriales. Puede ser útil para la producción de combustibles (biometano, bioetanol, biohidrógeno, bioaceites), recuperación de moléculas con alto valor agregado (aditivos, aceites esenciales, vitaminas, antioxidantes, enzimas, proteínas, ácidos orgánicos), producción de bio materiales (polímeros, recubrimientos, fertilizantes, adsorbentes) (Koul *et al.*, 2022; Nayak *et al.*, 2019), producción de biochar (carbón vegetal), el cual es resultado del proceso de pirólisis de la biomasa, esta se usa para remediación de suelos, captación de carbono, descontaminación de aguas residuales, catálisis y para mejorar la fertilidad del suelo, por mencionar algunas (Wang y Wang, 2019).

La valorización de biomasa contribuye al desarrollo de rutas sustentables, generación de bioeconomías, economías circulares y por ende todo esto aporta a minimizar el cambio climático y la degradación de recursos naturales. La Unión Europea es una de las regiones más activas en la promoción y contribución de legislaciones en pro de estas acciones. En la Figura 1, se muestra la pirámide de valorización de residuos alimenticios, partiendo de la opción más sustentable a la menos. También se plasma la pirámide de valorización de biomasa destacando las opciones con mayor valor agregado. Si se analizan ambas se puede concluir que la extracción de bioactivos es la opción más rentable y que más aporta a la sustentabilidad de los procesos.

2.1.2.1 Composición. La biomasa agrícola se compone principalmente de tallos, hojas, raíces y otros órganos vegetativos no aprovechables directamente para consumo humano. En la mayoría de los casos la mayor proporción son los tallos los cuales se encuentran conformados por celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina. Ligados o unidos a estos se pueden encontrar algunos fitoquímicos, sin embargo, para extraerlos se necesita romper los enlaces entre ellos y los polímeros resilientes que componen estas biomasa. La mayoría de estos compuestos son ácidos fenólicos y sus alcoholes, los cuales conforman las redes de lignina. Se han identificado flavonoides ligados, los

cuales se pueden obtener mediante digestiones ácidas y/o alcalinas. Zhu *et al.* (2020), identificaron mediante UPLC-ESI-qTOF-MS/MS flavonoides ligados en extractos de soya, haba y frijol; aunque en su mayoría fueron ácidos fenólicos, los flavonoides identificados fueron daidzeina, genisteina, vitexina, quercetina, miricetina, ampelopsina, catequina y honoventina.

La celulosa y hemicelulosa son de los polisacáridos con mayor presencia en la pared celular. La hemicelulosa se divide en mananos, xilanos y glucanos, los que a su vez pueden estar conformados por monosacáridos y ácidos como el glucorónico, galacturónico y metilglucuronato. La interacción que pueden llegar a tener estos polisacáridos con los flavonoides ocurre durante el procesamiento de la biomasa. Sin embargo, algunos ácidos como el ferulico y antocianinas como la cianidina 3-glucósido se pueden unir a la celulosa mediante interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno, entre los grupos hidroxilo y los átomos de oxígeno de los enlaces tipo éter de los azúcares presentes en los polisacáridos. Además, las antocianinas pueden formar enlaces supramoleculares tipo π - π entre ellas, formando grandes unidades, los que interaccionan con los componentes de la pared celular. Estas interacciones pueden verse influenciadas por factores ambientales como la fuerza iónica, el pH, tiempo de exposición, proteínas presentes y la estructura de ambos compuestos. Los ácidos fenólicos, taninos y antocianinas se pueden unir con mayor facilidad a la celulosa que otros polifenoles, por otro lado, glicósidos de quercetina se pueden unir al β -glucano presente en la hemicelulosa de algunos cereales (Rocchetti *et al.*, 2022; Siemińska-Kuczer *et al.*, 2022).

El grado de hidroxilación, esterificación, hidroxigenación, metilación, metoxilación, glicosilación, así como el peso molecular cumplen un rol particular en la formación de uniones de flavonoides con polisacáridos de la pared celular. Se ha observado que los flavonoles tienen mayor afinidad por polisacáridos, mientras que en las flavonas, flavanonas e isoflavonas estas interacciones disminuyen. Algunos de los flavonoides ligados que han sido identificados son rutina, kaempferol, quercetina, catequina, apigenina, epicatequina, luteolina, proantocianidinas, miricetina, naringenina, hesperidina, morina y algunos glicósidos del kaempferol y de la quercetina (Rocchetti *et al.*, 2022).

Otro material con valor agregado es la lignina la cual se usa para la generación de energía, resinas, recubrimientos, aditivos industriales, polímeros, etcétera. Potencialmente se puede extraer de residuos agrícolas. Sin embargo, no se encuentra en altas proporciones como es el caso de la madera (Haghdan *et al.*, 2016).

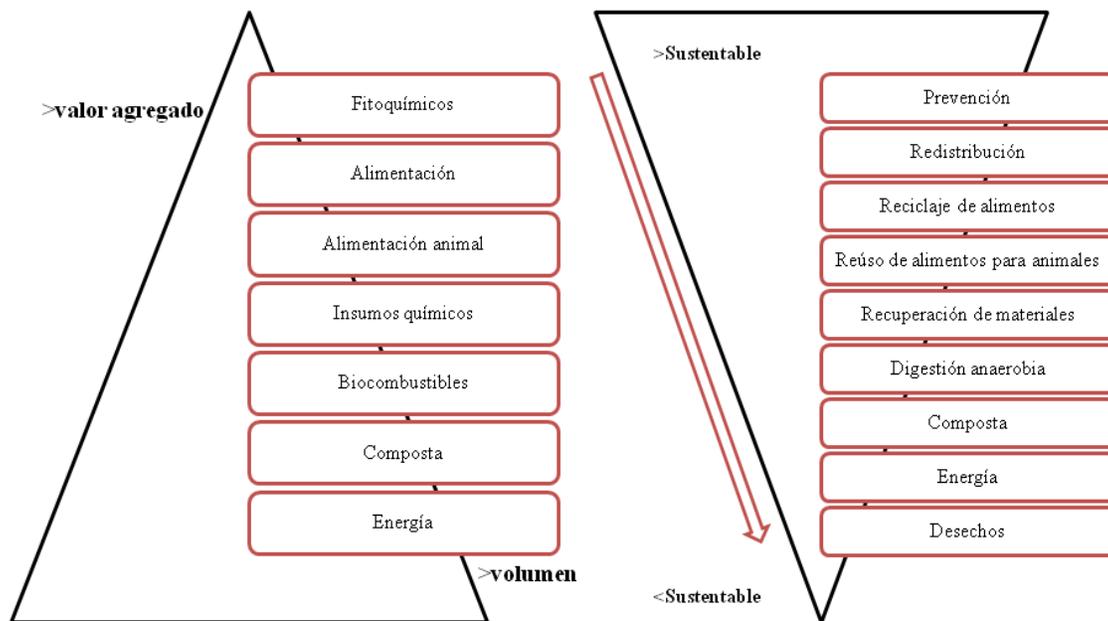


Figura 1. Pirámides de valorización de biomásas y estrategias de prevención de desperdicios agrícolas y alimenticios (Berbel *et al.*, 2018; Klein *et al.*, 2022; Moshtaghian *et al.*, 2021)

2.2 Chile (*Capsicum annuum* L.)

2.2.1 Generalidades

El chile es un alimento cultural y tradicional altamente apreciado en México. Esta planta pertenece al género *Capsicum* de la familia *Solanaceae*. México es el centro de domesticación y diversificación de la especie, la cual resalta con dos géneros *C. annuum* con seis variedades y *C. frutescens* con una variedad. De las variedades más reconocidas a nivel mundial destaca el jalapeño, serrano, habanero, poblano y el pimiento morrón. En la Figura 2 se aprecia la gran diversidad de chiles que se usan en la gastronomía mundial (Escalante-Araiza *et al.*, 2021).

Otros autores mencionan la existencia de cinco especies domesticadas como *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. annuum* siendo esta última la más relevante en cuanto a consumo, producción y comercialización nacional e internacional (Hernández *et al.*, 2015).

El chile es originario de México, donde el primer registro data del 7000-3000 a.C. registrado en lo

que era el Valle de Tehuacán, Puebla. Todas las especies son originarias de América, distribuyéndose desde el sur de Estados Unidos hasta las zonas cálidas y templadas de Sudamérica. Se creó que el género *Capsicum* es originario de Bolivia central, donde migró a los Andes y el Amazonas. Este producto junto con el maíz y el frijol fue la base de la alimentación de las culturas prehispánicas de Mesoamérica. El nombre náhuatl del chile es "Chilli o Xilli". Actualmente se han desarrollado variedades mejoradas mediante la biotecnología, con características sensoriales y químicas particulares, dando origen a la comercialización a escala global de este fruto (Hernández *et al.*, 2015).



Figura 2. Diversidad de *Capsicum* spp. (Hernández-Pérez *et al.*, 2020)

El fruto es una baya hueca carnosa o semi-cartilaginosa, donde se encuentran las semillas, puede alcanzar una gran diversidad de tamaños desde 1 cm hasta 30 cm de largo, con formas redondas, alargadas, curvas, y presentan una amplia gama de tonalidades pasando del verde, amarillo, rojo, naranja, morado, café y negro, entre otras (Hernández *et al.*, 2015). Las plantas se caracterizan por presentar tallos erectos, herbáceos y ramificados de color verde oscuro, con raíces que pueden llegar a alcanzar profundidades de 0.70 a 1.20 m y lateralmente hasta 1.20 m. Su altura promedio es de 60 cm y las flores son perfectas (hermafroditas) formándose en las axilas de las ramas, que presentan colorantes blanco o púrpura.

2.2.2 Producción

México es el segundo país con mayor producción de chiles en el mundo y líder en la exportación. A nivel nacional, Sinaloa es el principal estado productor de chile, donde la variedad pimiento morrón es la que se produce mayormente. Tomando en cuenta la producción de todas las especies y variedades de chile en México, durante el 2019 se produjeron 3, 238,245 toneladas, donde Sinaloa aportó 757,769 toneladas, participando con el 20.6 % del total de la producción de hortalizas a nivel nacional. El chile se encuentra disponible todo el año resaltando los meses de septiembre, octubre y noviembre. Los destinos de exportación principales son Estados Unidos, el cual aporta una derrama económica de 884,864,636 dólares, seguido de Canadá, España, Reino Unido, Cuba, Japón, Guatemala, Alemania, Países Bajos, China y Brasil. El pimiento morrón es la variedad más exportada con una venta en el 2019 de 1,138,774 toneladas significando un aumento de 37,441 toneladas respecto del 2018 (SIAP, 2021).

Particularmente durante el 2020 se sembraron en México, un total de 7,371.32 hectáreas de pimiento morrón, con una producción total de 605,836.36 toneladas, con un rendimiento de 82.19 udm/ha, y con un valor en la producción de 8, 218,273.43 pesos. Por lo anterior, el pimiento morrón es la variedad mayormente exportada de México y con mayor derrama económica (SIAP, 2021).

2.2.3 Usos Etnofarmacológicos

Desde tiempos prehispánicos el chile fue usado para tratar padecimientos y como parte de la alimentación diaria de la población. Tradicionalmente se emplea como estimulante de la digestión y como analgésico. Otros usos empleados son como colorante textil (Hernández *et al.*, 2015).

Recientes artículos de revisión han recopilado estudios clínicos, *in vitro* e *in vivo*, donde se han evaluado extractos de diferentes tipos y variedades de *Capsicum*; resaltan las actividades antioxidantes por el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides, capsaicinoides y terpenos. La capsaicina y los flavonoides se han vinculado con la mitigación del desarrollo de patologías

crónicas degenerativas como la obesidad, inflamación, diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer, entre otras (Zimmer *et al.*, 2012). Extractos ricos en capsaicinoides y fenoles han presentado efectos antimicrobianos y antivirales (Khan *et al.*, 2014). Los compuestos fenólicos identificados en frutos de Chile principalmente han sido apigenina, quercetina, luteolina y sus glicósidos; estos compuestos pertenecen al grupo de las flavonas y flavonoles y se caracterizan por presentar amplios efectos bioactivos para la salud.

Se han identificado también carotenoides, los cuales son responsables de las tonalidades rojizas, naranjas, y amarillas, dentro de los más estudiados han sido el β -caroteno, zeaxantina, violaxantina, luteína y β -criptoxantina, sin embargo, se han aislado más de 52 moléculas carotenoides. Estos compuestos también ejercen capacidad antioxidante, protegiendo a las células del daño oxidativo coadyuvando a la reducción de patologías crónicas degenerativas (Antonio *et al.*, 2018; Hernández-Pérez *et al.*, 2020).

Por otro lado, el género *Capsicum*, es el único donde se encuentra la capsaicina, un alcaloide bioactivo. La capsaicina y sus derivados como la nordihidrocapsaicina, dihidrocapsaicina y homocapsaicina entre otros, son responsables de la pungencia de los frutos, además se han estudiado ampliamente, identificando propiedades anticancerígenas, antiobesogénicas, antihipercolesterolémicas, trastornos dermatológicos, gastrointestinales, obesidad, dolores neuropáticos e inflamatorios, problemas urinarios, fallos renales y neurogénicos (Escalante-Araiza *et al.*, 2021; Srinivasan, 2016). En el Cuadro 1 se describen algunos fitoquímicos identificados de subproductos de Chile.

2.2.5 Pimiento Morrón

El pimiento morrón forma parte del género de hierbas tropicales perteneciente a la familia de la Dulcamara Solanáceas, que se refiere a las variedades de Chile dulce, las cuales son numerosas, caracterizadas por un amplio rango de tamaños y colores, debido a su variabilidad genética. La especie que engloba al pimiento morrón es *Capsicum annuum* L. (INIFAP, 2013).

Es una planta herbácea perenne, con ciclo anual, de porte variable entre los 0.5 y 2 m. Las plantas de gran tamaño corresponden a los híbridos y mejoramientos genéticos, que se suelen cultivar en

invernadero. Su sistema radicular se caracteriza por tener una raíz pivotante y profunda, la cual presenta raíces adventicias que horizontalmente pueden llegar a medir entre 0.5 y 1 m. El tallo es limitado y erecto. A partir de la cruz (altura de ramificación) emite 2 o 3 ramas dependiendo de la variedad. Se continúa ramificando de forma dicotómica hasta el final del ciclo. La hoja es entera, imberbe y lanceolada con un ápice pronunciado (acuminado) y un pecíolo largo y poco aparente. El haz es glabro con textura lisa y suave, de color verde (la tonalidad puede depender con base su variedad) y brillante. Las inserciones de las hojas en el tallo son de forma alterna y su tamaño también depende de la variedad, pero existe una correlación entre el tamaño de la hoja adulta y el peso del fruto. Las flores son solitarias en cada nudo del tallo, con inserción en las axilas de las hojas. Son pequeñas y se manifiestan con una corola blanca, su polinización es autógama, aunque puede presentarse un porcentaje de alogamia inferior al 10 % (Pinto *et al.*, 2018).

El fruto es una baya hueca, semi cartilaginosa y deprimida, con tonalidades que varían desde el verde, amarillo, blanco, café, morado, roja y naranja. La mayoría de las variedades comienzan su maduración con un color verde y culminan en el color de destino. Su tamaño es variable dependiendo la variedad, va desde el mini (menor a 10 g) hasta frutos de 500 g. Las semillas se encuentran insertadas en una placa cónica de disposición central, son de forma redonda, reniformes, de color amarillo pálido y su longitud puede variar de 3 a 5 mm (Pinto *et al.*, 2018).

Cuadro 1. Metabolitos secundarios y funcionalidades identificadas en subproductos de *Capsicum annuum* spp.

Órgano	Extracto	Método	Compuestos	Funcionalidad	Método	Ref.
Semillas	Hexano	GC-FAME, Folin-Ciocalteu	Ácidos grasos polinsaturados y CFT	AOX	DPPH, FRAP	(Azabou <i>et al.</i> , 2017)
Tallos	Metanol	Folin-Ciocalteu, HPLC/UV,	Capsaicina, ácidos fenólicos, flavonoides	AOX, antiinflamatoria	MTT, UV	(Chen <i>et al.</i> , 2012)
Hojas	Metanol	Espectrofotométrico	Ácido ascórbico y CFT	N/E	N/E	(Chiaiese <i>et al.</i> , 2019)
Semillas	Etanol y metanol	HPTLC, espectrofotométrico	Flavonoides, taninos, polifenoles, carotenoides, clorofila	Antimutagénico, inhibitorio de enzimas relacionadas con el MetS, AOX	Ames Test, DPPH, Inhibición de ERO'S, Peroxidación lipídica.	(Di Sotto <i>et al.</i> , 2018)
Hojas	Acetona	Espectrofotométrico	Carotenoides, clorofila, polifenoles, flavonoides	N/E	N/E	(Díaz-Pérez <i>et al.</i> , 2019)
Hojas	Metanol	Espectrofotométrico, Folin-Ciocalteu.	CFT	AOX	DPPH, Captación de ERO'S	(Drobac <i>et al.</i> , 2017)
Tallo y hojas	Acetonitrilo	HPLC-UV. Folin-ciocalteu	Capsaicina, CFT	N/E	N/E	(Estrada <i>et al.</i> , 2002)
Hojas	Acetonitrilo	UHPLC-MS/MS	Aminoácidos	N/E	N/E	(Florencio-Ortiz <i>et al.</i> , 2018)
Hojas	Tris-HCl	HPLC/DAD	Péptidos	Antimicrobiano	MIC	(Games <i>et al.</i> , 2013)
Hojas	Acuoso	HPLC-UV	N/D	Antiinflamatorio	ELISA	(Hazekawa <i>et al.</i> , 2017)
Tallos/raíces	Etil acetato, metanol	RMN, IR, MS, CC, TLC	Sesquiterpenos (Canusenol A-J)	N/E	N/E	(Kawaguchi <i>et al.</i> , 2004)
Hojas	Acetona, metanol	Espectrofotométrico	Capsaicina, ácido ascórbico, flavonoides, carotenoides, tocoferoles, azúcares libres, ácidos orgánicos	AOX	ABTS, DPPH	(Kim <i>et al.</i> , 2011)
Hojas	Metanol	Espectrofotométrico	Flavonoides, clorofila, carotenoides	AOX	ABTS, DPPH	(León-Chan <i>et al.</i> , 2017)
Hojas	Etanol	Folin-	Flavonoides,	N/E	N/E	(Mardani-

Órgano	Extracto	Método	Compuestos	Funcionalidad	Método	Ref.
		Ciocalteu	antocianinas			Talae et al., 2016)
Hojas	Metanol	HPLC-UV	Ácidos fenólicos	N/E	N/E	Reigosa et al., 1999
Tallos	Hexano	HPLC	Vit. E, Vit A.	N/E	N/E	(Romo-Hualde et al., 2012)

N/E (No estudiada); ERO'S (Especies Reactivas de Oxígeno); CFT (Compuestos fenólicos totales); RMN (Resonancia magnética nuclear); IR (espectrometría de infrarrojo); MS (espectrometría de masas); CC (cromatografía de columna); TLC (cromatografía de capa fina); HPTLC (Cromatografía de capa fina de alta resolución); MIC (mínima concentración inhibitoria); ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas); AOX (antioxidante); MetS (Síndrome metabólico).

2.3 Metabolitos Secundarios

Los metabolitos secundarios, son compuestos de bajo peso molecular producidos por el metabolismo secundario de las plantas. Estas moléculas no son vitales para su crecimiento, desarrollo y/o supervivencia, sin embargo, juegan un papel fundamental para su adaptación y tolerancia a condiciones climáticas adversas, así como a otros estímulos de estrés de fuentes bióticas o abióticas. Cuando la planta se encuentra sometida a este tipo de estrés incrementa la producción de metabolitos secundarios, los cuales la protegen de la depredación (Cisneros-Zevallos, 2021; Surjadinata et al., 2021). Anu et al., (2017), menciona que el metabolismo secundario facilita las reacciones bioquímicas del primario, por lo que es de suma importancia. Así mismo el ser humano ha explotado estos compuestos a su favor, puesto que han sido estudiados, demostrando una amplia gama de actividades biológicas e industriales, resaltando su utilización para la fabricación de pigmentos, saborizantes, gomas, ceras, medicamentos, plaguicidas, que en la actualidad son redituables y eficientes.

Los metabolitos secundarios se pueden dividir en tres grupos principales polifenoles, terpenos y alcaloides, sin embargo se encuentran otros como saponinas, esteroides, compuestos sulfurados, glicósidos, entre otros (Anu et al., 2017).

2.3.1 Clasificación General

Los metabolitos secundarios se encuentran extensivamente en plantas, hongos, bacterias, algas y otros organismos marinos, así como anfibios. Se caracterizan por presentar un bajo peso molecular, bioactividad y presentarse en bajas concentraciones en comparación con otros productos, como, los generados del metabolismo primario. Su biosíntesis está influenciada por factores del desarrollo, y otros abióticos como estreses, los cuales pueden incrementar su cantidad.

Algunos metabolitos importantes para la correcta función de las plantas, son las fitoanticipinas las cuales son sintetizadas como compuestos inactivos que posteriormente pueden ser transformados en activos, otros metabolitos se denominan fitoalexinas los cuales se generan bajo condiciones de estrés y sólo se pueden encontrar una vez generado el estímulo (Gutzeit *et al.*, 2014). Algunos fitoquímicos solo se pueden encontrar en especies de plantas específicas (betalainas en las Caryophyllales, glucosinolatos en las Brassicales y poliacetilenos en Asteraceae y Apiaceae).

Se pueden sintetizar en todos los órganos de las plantas desde raíces, tallos, hojas, flores y semillas, y se almacenan en compartimientos específicos, (los tricomas glandulares suelen almacenar compuestos tóxicos como terpenos y alcaloides). Los compuestos hidrofóbicos (apolares) se encuentran en membranas y/o organelos presentes en el retículo endoplásmico o en vesículas específicas. Mientras que los hidrofílicos (polares) comúnmente se encuentran en las vacuolas, citosol y/o apoplastos, de igual forma su biosíntesis se produce en esos mismos compartimientos (Gutzeit *et al.*, 2014). En el Cuadro 2, se resumen los compartimientos de almacenamiento de fitoquímicos en las plantas. La clasificación general de los fitoquímicos se plasma en la Figura 3.



Figura 3. Clasificación general de fitoquímicos (Younas *et al.*, 2018)

Cuadro 2. Sitios de almacenamiento de fitoquímicos en plantas

Clase	Compuestos	Compartimiento de almacenamiento		
		Tejido	Célula	
Polar	Alcaloides	Laticifer	Vacuola	
	Amino ácidos no proteinogénicos			
	Glicósidos digitalis			
	Glicósidos cianogénicos			
	Alcaloides			
	Saponinas			
	Glicósidos			
	Flavonoides			
	Antociadinidinas			
	Betalainas			
	Taninos			
	Glicósidos cianogénicos			
	Glucosinolatos			
	Aminas			
	Taninos			
No polares	La mayoría de compuestos polares durante su biosíntesis	Tricoma Ducto de resinas Laticifer	Apoplastos Citoplasma	
	Flavonoides			
	Terpenos			
	Flavonoides			
	Diterpenos			
	Quinonas			
	Flavonoides			
	Politerpenos			
	Antraquinonas			Célula de aceite
	Terpenos			
	Ceras			
	Flavonoides			
	Terpenos			
	Alcaloides			
	Terpenos			
Alcaloides				
Alcaloides				
Ubiquinonas				
Moléculas apolares durante la hidroxilación enzimática	Célula de aceite	Cutícula		

(Gutzeit *et al.*, 2014)

2.3.1.1 Biosíntesis de fenilpropanoides

2.3.1.1.1 Ruta de biosintética del ácido shikímico. Resulta ser la precursora de la mayoría de las clases de metabolitos secundarios y compuestos aromáticos de plantas; esta ruta consiste en reacciones catalizadas por siete enzimas. El ácido shikímico es producido por el fosfoenolpiruvato y eritrosa 4-fosfato, los cuales son condensados por la 3-deoxi-D-arabino-heptulosoato 7-fosfato (DAHP) esto mediante la enzima DAHP sintasa. Posteriormente se obtiene 3-dehidroquinato, a través de la enzima 3-dehidroquinato sintasa, también se obtiene 3-dehidroshikamato por la enzima 3-dehidroquinato deshidratasa y finalmente se obtiene el shikamato, por la acción de la enzima shikamato deshidrogenasa. Las reacciones subsecuentes son vitales para la producción de aminoácidos aromáticos. Una vez biosintetizado el shikamato se transforma en shikamato 3 fosfato mediante la enzima shikamato quinasa, dando lugar a la 5-enolpiruvilshikamato 3-fosfato (EPSP), esto por acción de la enzima 5-enolpiruvilshikamato 3-fosfato sintasa. Este último producto es transformado en corismato, por la acción de la enzima corismato sintasa. Por su parte el corismato biosintetiza el triptófano, la fenilalanina y tirosina (Campos-Vega *et al.*, 2013; Cress *et al.*, 2013; Vermerris *et al.*, 2006).

2.3.1.1.2 Ruta biosintética de fenilpropanoides. Particularmente la biosíntesis de fenilpropanoides (flavonoides, monolignones, ácidos hidroxicinámicos, ésteres sinapílicos, cumarinas y estilbenos), comienza por la desaminación de L-fenilalanina, catalizada por la enzima fenilalanina amonio liasa por sus siglas en inglés (PAL), lo que resulta en ácido cinámico *trans*. Este a su vez este se hidroxila por medio de la enzima ácido cinámico 4-hidroxilasa (C4H), y mediante la enzima 4-ácido cumárico CoA ligasa (4CL) produce ácido *p*-cumárico. Posteriormente se produce *p*-cumaril coenzima A, que subsecuentemente mediante reacciones enzimáticas diversas dan como resultado distintos ácidos fenólicos y sus alcoholes como ácido *p*-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido sináptico y sus alcoholes como el *p*-coumaril alcohol, coniferol alcohol y sinapil alcohol, responsables de la biosíntesis de lignina y lignanos.

Estas reacciones involucran la adición de grupos hidroxilo en la posición 4 del anillo del ácido cinámico, si se adiciona un segundo grupo hidroxilo en la posición 3 se produce ácido caféico y si

se metila se obtiene ácido ferúlico. Cabe mencionar que esta ruta metabólica es una de las más importantes en términos del flujo de carbono en las plantas ya que más del 20 % del total del metabolismo está relacionado con esta ruta metabólica (Campos-Vega *et al.*, 2013; Vermerris *et al.*, 2006).

2.3.1.1.3 Ruta de biosíntesis de ácidos fenólicos. Los ácidos fenólicos más abundantes en las plantas son el gálico y el salicílico, el primero es precursor de elagitaninos y galotaninos, mientras que el segundo es un compuesto de defensa y señalización, responsable de enviar señales para activar el sistema de defensa de la planta. El ácido gálico puede producir mediante biosíntesis directa de un intermediario de la ruta del ácido shikímico, o bien se puede producir a través de la fenilalanina y otros ácidos fenólicos (cinámico, *p*-cumárico, 3,4,5-trihidroxicinámico, cafeico o protocatecuico) (Vermerris *et al.*, 2006). En el Cuadro 3 se plasma la clasificación de los flavonoides de acuerdo a su precursor biosintético.

Cuadro 3. Clasificación de los flavonoides de acuerdo a su precursor biosintético

Flavonoide	Precursor biosintético		
	Fenilalanina (R1 = H; R2 = H)	Tirosina (R1 = OH; R2 = H)	Ácido cafeico (R1= OH; R2= OH; R3= OMe)
Flavanonas	(2 S)-pinocembrina	(2 S) naringenina	(2S) eriodictol
Isoflavonas	5,7-dihidroxiisoflavona	Genisteina	Orobol
Flavonas	Apigenina	Luteolina	Crisina
Flavonoles	Kaempferol	Quercetina	Miricetina
Glucósidos de antocianinas	Pelargonidina 3-O-glucósido	Cianidina 3-O-glucósido	Delfinidina 3-O-glucósido
Estilbenos	Pinosilvin	Resveratrol	Piceatanol
Cucurminoides	Dicinamoilmetano	Bisdemtoxicucurmina	Cucurmina

(Cress *et al.*, 2013)

2.3.1.1.4 Ruta de biosíntesis de flavonoides. La biosíntesis de flavonoides comienza por la condensación de *p*-cumaril-CoA, junto con tres moléculas de malonil-CoA, esta reacción es catalizada por la enzima chalcona sintasa (CHS) la cual produce 4, 2', 4', 6' tetrahydroxichalcona, que en reacciones subsecuentes da paso a la formación de flavanonas (naringenina), las cuales son

progenitoras de las estructuras de los demás flavonoides (Cress *et al.*, 2013; Vermerris *et al.*, 2006).

2.4 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos conformados por 15 carbonos, con una estructura C6-C3-C6. Se caracterizan por presentar dos anillos de benceno unidos a un grupo de tres carbonos. Según su grado de insaturación y oxidación se dividen en diferentes clases, esto es debido a su complejidad molecular que implica las características del anillo B y la hidroxilación y glicosilación de los anillos A, B y C (Figura 4). Estos compuestos son uno de los grupos de fitoquímicos más abundantes en las plantas (se han reportado más de 6,500), y suelen estar presentes unidos a un azúcar (glicosilados), sin embargo se han reportado en su forma aglicona, los cuales son de polaridad baja-media y se acumulan en las vacuolas de las plantas (Tsao *et al.*, 2009).

Algunos de los nombres por los cuales se suelen denominar son polifenoles o fenólicos, sin embargo, el primero hace referencia a la gran clasificación de estos compuestos que previamente se mencionaron. Y fenólicos hace referencia a compuestos con más de un grupo hidroxilo en el anillo bencénico. Se caracterizan por manifestarse como pigmentos (antocianinas) en las plantas, esto para atraer polinizadores y también sirven como compuestos de defensa contra depredadores y patógenos. Sin embargo una de las cualidades más interesantes son sus efectos biológicos para la salud humana (Tsao *et al.*, 2009).

2.4.1 Clasificación

Dentro de la clasificación de los flavonoides destacan las flavonas, isoflavonas, flavan-3-oles (flavanoles), flavonoles, flavanonas y antocianidinas, sin embargo también se encuentran las chalconas y auronas (Tsao *et al.*, 2009; Vermerris *et al.*, 2006).

2.4.1.1 Chalconas. Estos compuestos se caracterizan por presentar una cadena lineal con tres

carbonos unidos a los anillos A y B, esta cadena contiene un doble enlace, en las dihidrochalconas (la cadena C3 se encuentra saturada). Presentan coloraciones amarillentas. Algunas chalconas son la buteína la cual se encuentra en algunas flores, la floridzina se encuentra en las hojas de las manzanas y presenta actividad antitumoral (Tsao *et al.*, 2009; Vermerris *et al.*, 2006).

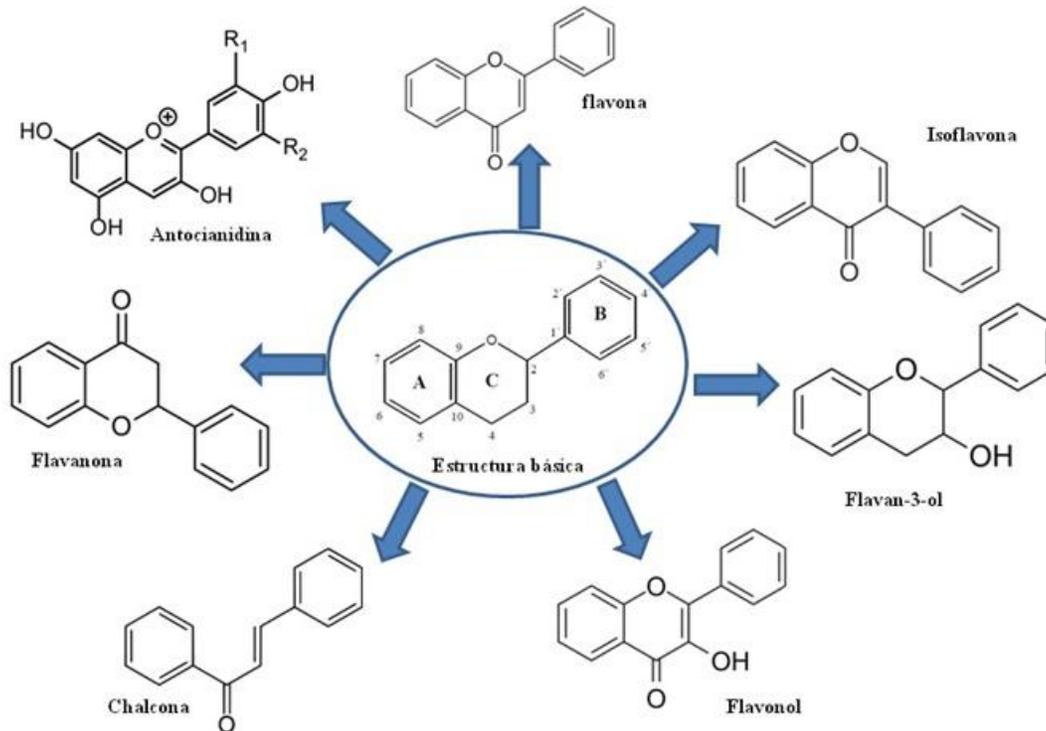


Figura 4. Estructura molecular de los flavonoides (Reddy *et al.*, 2020)

2.4.1.2 Auronas. Las auronas son derivadas de la ciclización de las chalconas, donde el grupo meta-hidroxilo reacciona con el α -carbono y forma cinco heterociclos. Presentan tonalidades amarillentas y se encuentran en géneros selectos de plantas como *Antirrhinum*, *Cosmos bipinnatus* y *Limonium* (Ayabe *et al.*, 2010; Tsao *et al.*, 2009; Vermerris *et al.*, 2006).

2.4.1.3 Flavonas. Las flavonas presentan un doble enlace en la posición 2 y 3, y una cetona en la posición 4. La mayoría presenta un grupo hidroxilo en la posición 5 del anillo A, al igual se pueden presentar hidroxilaciones en otras posiciones como la 7 del mismo anillo, o 3' y 4' del anillo B, esto

dependiendo de la fuente de donde se obtengan. Se suelen encontrar en angiospermas. La glicosilación ocurre en las posiciones 5 y 7 del anillo C, mientras que la metilación y acilación en los grupos hidroxilos del anillo B. Algunas moléculas se pueden polimetoxilar, como la tangeretina y nobiletina. Resalta dentro de este grupo la luteolina y apigenina (Albuquerque *et al.*, 2021; Tsao *et al.*, 2009; Vermerris *et al.*, 2006).

2.4.1.4 Flavonoles. Contienen un doble enlace entre el carbono 2 y 3 del anillo B, con un grupo hidroxilo unido al carbono 3 y un grupo carboxilo al carbono 4. Se diferencian de las flavonas por el grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C, el cual puede glicosilarse. Pueden presentar grupos hidroxilos y/o metilos, por lo que es una de las clases de flavonoides más extensas con al menos 393 moléculas agliconas identificadas. Las moléculas más conocidas de este grupo son la quercetina, miricetina y el kaempferol (Albuquerque *et al.*, 2021; Tsao *et al.*, 2009; Vermerris *et al.*, 2006).

2.4.1.5 Flavanonas. Las flavanonas o dihidroflavonas, presentan un doble enlace entre la posición 2 y 3 del anillo C, y un grupo carboxilo en la posición 4. Se presentan en menor proporción en comparación con otros grupos de flavonoides, las moléculas representativas son la naringenina y hesperetina. Se pueden encontrar polihidroxiladas y varios de esos grupos hidroxilo se pueden metilar o glicosilar, dando lugar a un gran número de derivados (flavanonas preniladas, furanoflavanonas, piranoflavanonas y flavanonas benziladas) (Albuquerque *et al.*, 2021; Tsao *et al.*, 2009; Vermerris *et al.*, 2006).

2.4.1.6 Flavanoles (flavan-3-oles). Se caracterizan por presentar un grupo hidroxilo unido a la posición 3 del anillo C. Son un grupo con gran diversidad estructural siendo uno de los más extensos dentro de los flavonoides. Los compuestos mayoritarios se denominan catequinas y epicatequinas, donde resalta el té verde (*Camellia sinensis*), por ser una excelente fuente. La galocatequina y epigalocatequina contienen un grupo hidroxilo extra en el anillo B. Estos flavonoides pueden formar polímeros, quiere decir procianidinas (proantocianidinas o taninos

condensados), los cuales contienen de 2 a 60 unidades monoméricas de flavonoles, dicha polimerización ocurre entre un enlace carbono-carbono entre la posición 8 de la unidad terminal y el carbono 4 del extensor (Albuquerque *et al.*, 2021; Tsao *et al.*, 2009; Vermerris *et al.*, 2006).

2.4.1.7 Flavanonoles. Son similares a las flavanonas, solamente se añade un grupo hidroxilo en la posición 3. Se pueden presentar con amplia diversidad debido a las sustituciones presentes, sin embargo, el flavanonol más conocido es la taxifolina (Albuquerque *et al.*, 2021; Tsao *et al.*, 2009; Vermerris *et al.*, 2006).

2.4.1.8 Isoflavonoides. Los isoflavonoides son los únicos flavonoides que presentan una sustitución bencenoide en la posición 3 del anillo C, lo que les brinda estructuralmente una similitud con los estrógenos, por lo que algunas de las bioactividades que presentan son relacionadas con receptores estrogénicos. Estos compuestos están limitados a presentarse en la familia Leguminosae, resaltando la soya o germinados, algunas moléculas son la genisteina y daidzeina (Albuquerque *et al.*, 2021; Tsao *et al.*, 2009; Vermerris *et al.*, 2006).

2.4.1.9 Antocianidinas. Las antocianidinas y antocianinas son el único grupo de flavonoides que puede manifestarse mediante colores, pueden variar desde tonalidades rojizas, azules, moradas, violetas, magenta y/o negra, esto es debido a su naturaleza química las cuales son cationes flavilios y/o sales de cloro. Estas tonalidades dependen del pH (ácidas= rojo; intermedio= morado-azul; alcalino= verde-amarillo), al igual de su acilación o metilación de los grupos hidroxilo en los anillos A y B. Se denominan antocianinas cuando se encuentran glicosiladas en la posición 3 del anillo C, y estas variaciones pueden brindar más de 500 moléculas diferentes. Las agliconas más comunes son la cianidina, delphinidina y pelargonidina (Albuquerque *et al.*, 2021; Tsao *et al.*, 2009; Vermerris *et al.*, 2006).

2.4.2 Fuentes Principales

Los alimentos con mayor cantidad de flavonoides son las frutas y hortalizas, seguido de granos, semillas y legumbres. Algunas de las que destacan por su contenido son las fresas, lichi, uvas, cocoa, berries, manzanas, cebollas, té, cítricos, alcachofa, perejil, col de Bruselas, entre otros, sin embargo, puede variar significativamente dependiendo de las condiciones de crecimiento y procesamiento. Dependiendo del país y/o región, serán las fuentes accesibles de flavonoides. En Estados Unidos proviene en mayor proporción de la manzana, chocolate y uvas, con un promedio de ingesta de 239 mg/día, mientras que de la población europea es de 428 mg/día. Sudamérica es una de las regiones con mayor consumo de flavonoides por su diversidad gastronómica (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009; Ballard *et al.*, 2019; Williamson, 2020).

Las alcaparras son la mayor fuente de flavonoles (490 mg/100 g peso fresco), otras fuentes son las cebollas, kale, berries, cocoa, té, vino tinto y especias. Por su parte las flavonas se encuentran mayoritariamente en el perejil, orégano y tomillo (25-650 mg/100 g peso fresco), la apigenina resalta en alcachofas, apio, cebolla morada y lechuga. Las flavanonas se encuentran presentes en productos cítricos (frescos y/o procesados), la naringenina es el más abundante y se encuentra presente en la toronja, en la lima resalta la hesperitina, mientras que en la naranja se encuentran cantidades sobresalientes de ambas. El eriodictiol se encuentra presente principalmente en el limón. Las isoflavonas solamente se encuentran en leguminosas como soya y sus derivados, las más representativas son la genisteína, daidzeína y glicetina. Las antocianinas se encuentran principalmente en frutos y vegetales con tonalidades rojizas-azuladas, las más representativas son las uvas, berries, cereza, ciruelas, calabaza roja, cebolla morada, rábano, berenjena, cabe mencionar que su presencia incrementa conforme avanza la madurez del fruto. Puntualmente en las berries se han identificado cianidina, delphinidina, malvidina, peonidina y petunidina, mientras que la malvidina predomina en los vinos tintos, las cerezas y ciruelas son ricas en cianidina; la delphinidina predomina en la berenjena y la pelargonidina en fresas y rábanos (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009; Ballard *et al.*, 2019; Williamson, 2020).

Los flavanoles, se encuentran presentes en un amplio número de alimentos y bebidas derivadas de frutos, como el vino tinto, cerveza, nueces, té, chocolate, donde los predominantes son las catequinas y epicatequinas, por su parte la epigallocatequina, catequina 3-galato, epigallocatequina

3-galato y galocatequina son abundantes en el té verde y cocoa (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009; Ballard *et al.*, 2019; Williamson, 2020).

2.4.3 Potencial Antioxidante y Funcionalidad Biológica

El envejecimiento es un proceso biológico inevitable, el cual se origina del cambio en las células y tejidos, los cuales a través de los años sufren un deterioro causado por factores ambientales, endógenos y genéticos (Di Meo *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2004).

Este cambio ocurre principalmente en las biomoléculas como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, los cuales se deterioran ocasionando patologías crónico degenerativas y posteriormente la muerte celular y del individuo. Existen moléculas que se encuentran estrechamente relacionadas con el envejecimiento y la muerte celular, las cuales se denominan radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO's). El oxígeno paradójicamente es la principal fuente de estas últimas, debido que la mitocondria de organismos aeróbicos, consume poco más del 90 %, siendo esencial para la vida y al mismo tiempo causando la oxidación y muerte de células vitales (Chaverri *et al.*, 2006; Di Meo *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2004).

Sin embargo, resaltan otros radicales (Cuadro 4), que se caracterizan por ser altamente reactivos. Estos radicales libres son cualquier tipo de compuesto químico (atómico o molecular) que es capaz de subsistir por sí mismo. Se caracterizan por presentar uno o más electrones desapareados en un mismo orbital molecular o atómico, volviéndolo inestable y altamente reactivo captando electrones y/o protones de moléculas vitales para la vida. Los más importantes son los derivados del nitrógeno, oxígeno, carbono e hidrógeno. Cabe mencionar que también se pueden encontrar compuestos clasificados como no radicales, que de igual forma son altamente reactivos, sin embargo por su naturaleza química se incluyen en otras especies de compuestos (derivados del cloro, nitrógeno) (Lozada *et al.*, 2019).

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio en el balance homeostático, (entre los compuestos pro-oxidantes y los antioxidantes). Este estado se caracteriza por la producción excesiva de radicales libres, deteriorando la salud de la persona y ocasionando el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas (Zeng *et al.*, 2021).

Cuadro 4. Clasificación de radicales libres y no radicales

Radicales libres	No radicales
Especies Reactivas de Oxígeno	Especies Reactivas de oxígeno
Superóxido O ₂ ⁻	H ₂ O ₂
Hidroxilo OH	Ácido hipobromoso HOBr ^a
Hidroperoxilo HO ₂	Ácido hipocloroso HOCl ^b
Carbonato CO ₃ ⁻	Ozono O ₃
Peroxilo RO ₂	Oxígeno de orbital único O ₂ ⁻¹
Alcoxi RO	Peróxidos orgánicos: ROOH
Radical de dióxido de carbono CO ₂	Peroxinitrito ONOO ^{-d}
Oxígeno de orbital único	Peroxinitraro O ₂ NOO ^{-d}
	Ácido peroxinitroso ONOOH ^d
	Peroxomonocarbonato HOOCO ₂ ⁻²
Especies Reactivas de Cloro	Especies Reactivas de Cloro
Átomo clorinado Cl	Ácido hipocloroso HOCl ^b
	Nitrilo clorado NO ₂ Cl ^e
	Dióxido clorinado ClO ₂
	Cloraminas
Especies Reactivas de Nitrógeno	Especies Reactivas de Nitrógeno
Óxido nítrico	Ácido nitroso
Dióxido de nitrógeno	Catión nitrosilo
Radical nitrato	Anión nitroxi
	Tetróxido dinitrogenado
	Trióxido dinitrogenado
	Peroxiacetyl nitrato

(Lozada *et al.*, 2019)

Algunos de los factores de mayor relevancia en la aparición del estrés oxidativo es el genético y la predisposición a padecer ciertas patologías, sin embargo los hábitos también son factores importantes como la ingesta elevada de grasas saturadas, sedentarismo, obesidad y otros hábitos como el consumo de drogas o alcohol en exceso (Figura 5) (Guan *et al.*, 2021).

La actividad medicinal de los flavonoides está estrechamente relacionada con su estructura molecular, la cual resalta por la presencia de dobles enlaces, anillos aromáticos, y grupos hidroxilo los cuales con capaces de captar radicales libres y ERO's (Figura 6).



Figura 5. Causas que propician el estrés oxidativo y su efecto en las células (Guan *et al.*, 2021)

La capacidad antioxidante se debe a la capacidad de estabilizar radicales libres donando electrones/protones, quelar metales o catalizar su reacción, activar enzimas endógenas, reducir radicales producidos por α -tocoferoles e inactivar oxidasas, entre otras. Aspectos de biodisponibilidad y bioaccesibilidad tienen que ver con esta actividad biológica, puesto que moléculas de peso molecular elevado deben ser degradadas previamente para poder ser absorbidas por el intestino delgado y posteriormente ser transferidas al torrente sanguíneo. Este grado de polimerización puede predecir la capacidad antioxidante a nivel *in vivo*. Así mismo el estado en el que se encuentre la molécula dependerá la potencia de la bioactividad (Heim *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2013).

Los métodos comúnmente empleados para evaluar capacidad antioxidante de compuestos fenólicos son *in vitro* y están basados en la capacidad de transferir electrones y/o protones, (reacciones redox), reducción de cobre (CUPRAC), reducción de radicales (ABTS, DPPH), capacidad reductora de hierro (FRAP). Otros métodos se basan en la competición de características termodinámicas, entre los sustratos y los antioxidantes, entre ellos se incluyen el método ORAC (capacidad de absorbancia del radical oxígeno), capacidad captadora de peróxido (PSC) y ensayo de reducción de radicales peróxidos totales (TRAP) (Vuolo *et al.*, 2019).

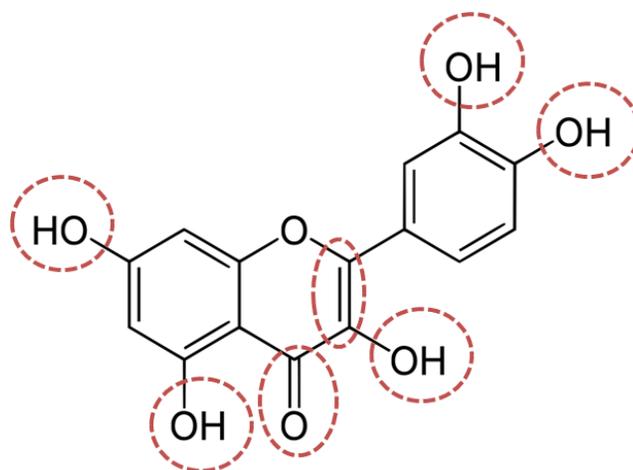


Figura 6. Estructura de la quercetina, resaltando los grupos OH y dobles enlaces responsables de la capacidad antioxidante (Farooqui *et al.*, 2010)

Se ha investigado la capacidad antioxidante de subproductos agrícolas y agroindustriales, como cáscaras, bagazos, hojas y tallos. Ferreyra *et al.*, (2021), identificaron en el racimo de uvas (tallos y caña), ácidos fenólicos como gálico, siríntrico, cinámico, *p*-cumárico, flavanoles como catequina, epicatequina, galato de epicatequina, galocatequina, flavanonas como naringenina, flavonoles como quercetina-3-glucósido, kaempferol y miricetina, entre otros. Estos, tras su digestión simulada *in vitro*, mantuvieron su actividad antioxidante (200-2000 $\mu\text{mol ET/g}$ peso seco), con contenidos de hasta 150 mg de compuestos fenólicos totales, equivalentes de ácido gálico por g de peso seco.

Las plantas medicinales y aromáticas presentan compuestos fenólicos con capacidad antioxidante, tal es el caso de el té dulce (*Lithocarpus litseifolius*), el cual es un producto que se consume desde hace cientos de años en China. Este contiene 2',6'-dihydroxy-4'-methoxyl-dihydrochalcona, trilobatina, floridzina, floretina, 3-hydroxiphlorizina e isoquercitrina, que le confieren una alta capacidad antioxidante (11.5 mg equivalentes de ácido ascórbico/g de peso seco) (Liu *et al.*, 2021). Se han identificado ácidos fenólicos en la pulpa del olivo, los cuales demostraron ser antioxidantes, además de inhibir enzimas relacionadas con la hiperglicemia (Sylla *et al.*, 2021). Así mismo se ha reportado apigenina, luteolina y derivados de diosmetina en hojas de chile habanero (*C. chinense*), las cuales inhibieron los radicales DPPH y ABTS (Herrera-Pool *et al.*, 2021).

Flavonoides de cítricos son antioxidantes, en especial las flavanonas (nobiletina, tangeretina), un reciente estudio apunta sus cualidades mediante una diversidad amplia de estudios *in vitro* e *in vivo*

(Wang *et al.*, 2021). Por otro lado Chen *et al.*, (2021) estudiaron cáscaras de 52 variedades de cítricos, identificando flavanonas como la naringenina, nairutina y neohesperidina, siendo las de mandarina las que mayor capacidad antioxidante presentaron, por lo que estos subproductos podrían llegar a ser una buena fuente de compuestos biológicamente activos.

Frutos como el plátano, jujube, higos, uvas, guayaba, granada y fresa, resaltan por su contenido de compuestos fenólicos totales, tal es el caso del jujube con 28 mg equivalentes de catequina por 100 g de fruto fresco, seguido de la guayaba con 11.85. En cuanto al contenido de flavonoides totales resalta de igual forma el jujube con 0.23 mg equivalentes de rutina por 100 g de fruto fresco, seguido del plátano con 0.13 y la fresa con 0.10. El fruto con mayor capacidad antioxidante fue la guayaba con 24.02 mmoles ET/ 100 g de fruto fresco, seguido de las uvas con 15.02, y el jujube con 14.98. En cuanto a la inhibición del radical DPPH, la guayaba inhibió el 198 %, seguido del jujube con 165.55 % (Ghazzawi *et al.*, 2021).

Las antocianinas son moléculas con capacidad antioxidante, capaces de coadyuvar en el tratamiento de enfermedades como la aterosclerosis, cáncer, diabetes, obesidad, entre otras (Garcia *et al.*, 2021). Estas son usadas como colorantes en alimentos (apigenidina, cianidina). Otros flavonoides como la quercetina, luteolina, han presentado fuerte capacidad antioxidante, esto debido a su estructura molecular resaltando que el anillo A -OCH₃, el anillo B- catecol y el anillo C3-OH son los que mayor actividad ejercen, esto en ensayos *in vitro* (FRAP, ABTS, DPPH) (Xiong *et al.*, 2021). Extractos de berries en especial Blueberries (*Vaccinium* spp), han manifestado ser un potencial nutracéutico y antiproliferativo, esto gracias a su actividad antioxidante (Jiang *et al.*, 2021; Maya-Cano *et al.*, 2021).

2.5 Química Verde

El concepto de química verde se define como la reducción y/o eliminación del uso de sustancias peligrosas en el diseño, manufactura y aplicación de productos químicos. El objetivo de esta subdisciplina de la química es alentar a los investigadores a considerar el impacto ambiental y en la salud de las reacciones que llevan a cabo, así mismo concientizar sobre los peligros al medio ambiente por el uso de productos peligrosos. Anastas *et al.* (1998), propusieron los 12 principios de la química verde los cuales se describen a continuación.

1. Prevención

Refiere al concepto de prevenir la producción de desechos químicos. Es mejor prevenir que limpiar o tratar los residuos después de ser generados. Es importante el diseño de procesos que sean capaces de prevenir la formación de desechos.

2. Economía atómica

Los métodos sintéticos deben ser diseñados para maximizar la incorporación de todos los materiales usados durante el proceso en el producto final. Este concepto refiere a las síntesis y reacciones químicas, donde se puede medir a través de calcular el rendimiento con la siguiente fórmula: % de economía atómica = (peso de los átomos usados / peso de todos los reactivos) X 100. Si el porcentaje asciende a 50 solo la mitad de los átomos son incorporados al producto final mientras que la otra mitad son desperdiciados o son productos no deseados.

3. Síntesis químicas menos peligrosas

El diseño de la síntesis de productos químicos debe generar sustancias que sean inocuas, o poco tóxicas tanto al ser humano como al medio ambiente siempre y cuando sea práctico y conveniente.

4. Diseño de productos químicos seguros

Los productos químicos deben ser diseñados para preservar la eficiencia del funcionamiento, pero reduciendo su toxicidad. Esto puede representar un enorme reto ya que se debe de mantener la misma funcionalidad y eficiencia pero reduciendo la toxicidad. Es por ello que este principio debe abordarse desde una perspectiva de toxicología y química para tratar de optimizar los recursos.

5. Solventes seguros

Este concepto se refiere a que el uso de disolventes y sustancias relacionadas como agentes de separación, deben ser fabricados de forma segura e inocua siempre y cuando sea posible. Debido a la energía gastada en todas las operaciones unitarias que conlleva el uso de disolventes, es necesario valorar su uso, y de ser posible que estos puedan ser reutilizados y que no impacten de forma negativa al medio ambiente y a la salud humana.

6. Diseño de eficiencia energética

Los requerimientos energéticos deben ser reconocidos por sus impactos ambientales y económicos por lo que deben ser minimizados. Los métodos de síntesis deben ser elaborados a una temperatura y presión cercanas al ambiente. En ocasiones las síntesis se elaboran de forma desmedida a temperaturas y presiones que repercuten en el medio ambiente esto por su fuerte consumo energético. Por lo que es necesario el diseño de síntesis sustentables.

7. Uso de biomásas renovables

Una materia prima o biomasa puede ser renovable, siempre y cuando sea técnica y económicamente factible. Este concepto es muy importante, ya que potencialmente se pueden emplear subproductos agrícolas para sintetizar disolventes, generar energía, biocombustibles, entre otros. Se estima que alrededor de 170 billones de toneladas de biomasa de plantas son producidas anualmente, de las cuales solo el 3.5 % son empleadas por el humano. Se estima que para poder generar una bioeconomía basada en estos recursos es necesario valorizar el 25 % de la producción anual (cerca de 40 billones de toneladas).

8. Reducir los derivatizantes

Los derivatizantes innecesarios deben ser minimizados en medida de lo posible, debido que su uso involucra otras operaciones las cuales requieren el uso de reactivos y pueden generar desperdicios. Este punto refiere a que se debe reducir el uso de grupos protectores en la síntesis o análisis de moléculas.

9. Catálisis

El uso de reactivos catalíticos provee superiores rendimientos que el uso de los reactivos estequiométricos. Este principio puede ser relacionado con el primero y el segundo (prevención y economía atómica), ya que el uso de catalizadores puede acelerar las condiciones de ciertas síntesis/reacción química, con esto se previene el desperdicio de energía y de átomos. Se sugiere el uso de enzimas como catalizadores en vez de reactivos.

10. Diseñado para ser degradado

Los productos químicos deben ser diseñados para que al final de su utilización puedan ser degradados en productos inocuos y biodegradables, cerrando así ciclos de economía circular.

11. Análisis en tiempo real de la prevención de contaminación

Este concepto se refiere a que es necesario el desarrollo de metodologías analíticas de monitoreo y control en tiempo real de la formación de sustancias peligrosas para evitar costos asociados en tomar muestras, purificar, derivatizar etc.

12. Química más segura para la prevención de accidentes

La selección de sustancias empleadas en procedimientos químicos debe ser elegida con base en la seguridad y la prevención de accidentes como derrames, explosiones y/o incendios.

2.6 Métodos de Extracción de Metabolitos Secundarios

Los métodos de extracción de fitoquímicos se basan en la capacidad de transferencia de masa del material vegetal al disolvente de extracción, esto con base en su tamaño de partícula, polaridad del disolvente y del compuesto, estado físico (fresco, deshidratado, molido o completo) del material vegetal, pureza de los disolventes, así como el tiempo y temperatura de extracción (Seidel, 2012). Un punto a considerar es el método por el cual se asiste al disolvente. En la última década las investigaciones en este ramo se han enfocado a optimizar las condiciones de proceso. Las más usadas y eficientes son la sonicación ya sea mediante baños ultrasónicos o sondas, microondas, altas presiones, enzimáticos, fermentación, etcétera. Cabe mencionar que si se trata de valorizar algún residuo o biomasa, es importante extraer los fitoquímicos con métodos congruentes a la sustentabilidad y la química verde.

2.6.1 Tradicionales

2.6.1.1 Maceración con disolventes orgánicos. El método se basa en la transferencia de masa del material vegetal hacia la disolución que puede ser cualquier tipo de disolvente (polaridades crecientes normalmente), en la cual se deja macerar 24 horas o más (dependiendo del método y metabolitos) (Figura 7). La proporción peso/volumen y la agitación son factores importantes para optimizar la extracción.

Se puede emplear temperatura para incrementar el rendimiento (dependerá de que tan termolábil o termo-resistente sean los compuestos de interés). La maceración es el método más usado a nivel laboratorio e industrial para obtener aceites esenciales u otros compuestos de interés. Cabe mencionar que el uso de disolventes orgánicos y clorados puede repercutir en la salud de los manipuladores así como del medio ambiente (Seidel, 2012). Este método si bien puede ser eficiente para la extracción de fitoquímicos, por su alto rendimiento, presenta una serie de desventajas, por ejemplo, los tiempos de extracción son mayores, (generando un mayor gasto energético), se emplean temperaturas mayores a 40 °C (degradación de compuestos). Por último, una vez

terminado el proceso de extracción, se debe separar el material vegetal del sobrenadante, para esto comúnmente se usan filtros de papel o centrifugación. Una vez obtenido el extracto, se concentran bajo presión reducida, normalmente con rotavapor, si bien este proceso sirve para retirar el disolvente, pueden quedar trazas del mismo, contaminando el producto final.

Para aplicaciones cosméticas, alimenticias, farmacéuticas y nutraceuticas, los bioactivos deben ser extraídos con tecnologías y disolventes inocuos, sin residuos de disolventes tóxicos como metanol, acetona, diclorometano, hexano, acetato de etilo y cloroformo, por mencionar algunos. Por lo que en años recientes el sector químico se ha enfocado a la investigación y desarrollo de nuevos solventes capaces de extraer cantidades importantes de bioactivos, minimizando el riesgo de contaminación tanto medioambiental como para el ser humano.



Figura 7. Maceración con disolventes orgánicos

2.6.1.2 Toxicidad e impacto ambiental. Es bien sabido que el uso de solventes orgánicos en particular los clorados ocasionan perjuicios para el medio ambiente y la salud humana. Actualmente la producción de solventes se estima en 20 millones de toneladas métricas, las cuales deben de ser sometidas a largos procesos de purificación y limpieza los cuales pueden llegar a ser altamente tóxicos (Clarke *et al.*, 2018; Pacheco-Fernández *et al.*, 2019).

Un ejemplo de esto es el hexano el cual se emplea ampliamente para la extracción de aceites, sin embargo es un producto tóxico (Häckl *et al.*, 2018). Se ha documentado la potencial toxicidad de disolventes orgánicos, principalmente los clorados como el diclorometano y cloroformo. Estos pueden ocasionar serios daños al organismo si son inhalados, ingeridos o administrados vía tópica.

Resalta el cloroformo, dietil eter, cloruro de metileno, acetonitrilo, tolueno por ser los más tóxicos en estudios *in vivo* (Kimura *et al.*, 1971).

El daño medioambiental de disolventes orgánicos se ha evaluado desde hace décadas, donde se ha observado que los disolventes clorados son los más contaminantes recomendando evitar su uso en procesos industriales, el metanol, isopropanol, tolueno y xileno podrían ser una opción menos dañina sin embargo no dejan de causar efectos negativos al medio ambiente (Hellweg *et al.*, 2004).

2.6.2 Emergentes

2.6.2.1 Disolventes Eutécticos Profundos (DES). En el 2003 el grupo del Dr. Andrew Abbott (Abbott *et al.*, 2003) postuló los primeros DES, los cuales se basaban en la mezcla de sales cuaternarias de amonio como el cloruro de colina, azúcares y/o ácidos orgánicos. Los DES son fáciles de sintetizar, se obtienen al mezclar y calentar aceptores de enlaces de hidrógenos (HBA) y donadores de enlaces de hidrógeno (HBD). Estos, por separado presentan características fisicoquímicas y puntos de fusión diferentes, sin embargo, al mezclarse en relaciones molares específicas estos modifican sus características dando lugar a mezclas eutécticas (Figura 8).

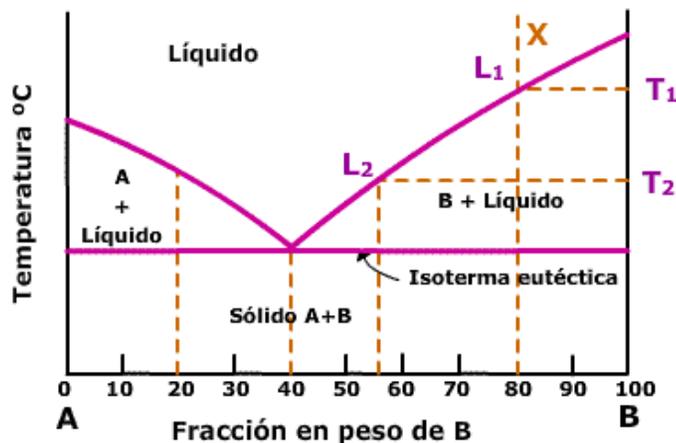


Figura 8. Diagrama de fases eutéctico

Los DES se clasifican en 5 tipos (Abbott *et al.*, 2004; Abbott *et al.*, 2003; Abranches *et al.*, 2022;

Schaeffer *et al.*, 2021).

1. Sal cuaternaria de amonio + cloruro metálico
2. Sal cuaternaria de amonio + cloruro metálico hidratado
3. Sal cuaternaria de amonio + donador de enlaces de hidrógeno
4. Cloruro metálico hidratado + donador de enlaces de hidrógeno
5. Aceptor de enlaces de hidrógeno + donador de enlaces de hidrógeno (terpenos o ácidos fenólicos)

Pueden estar formados de un amplio número de sales y otras moléculas los cuales se muestran en el Cuadro 5.

Las estructuras de los HBA y HBD son ácidos y bases de Lewis o Brønsted y pueden contener una variedad de especies aniónicas y catiónicas. El aceptor de protones mayormente usado es el cloruro de colina (ChCl) debido que es económico, biodegradable y su toxicidad es mínima, siendo un compuesto que cumple con algunos de los principios de la química verde y es comúnmente usado como aditivo en alimentos para aves (De Oliveira Vigier *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2012).

Cuadro 5. Donadores y aceptores de enlaces de hidrógenos usados para sintetizar DES

Tipo de compuesto	HBA	Tipo de compuesto	HBD
Ácidos orgánicos/carboxílicos	Cítrico	Ácidos orgánicos/carboxílicos y fenólicos	Málico
	Láctico		Tartárico
Sales cuaternarias de amonio	Málico	Aminoácidos	Cinámico
	Betaína		Cafeíco
	D/L-Prolina		Benzoico
	Cloruro de colina		Butírico
Terpenos	N,N-diethylethanol cloruro de amonio	Carbohidratos y polioles	Malónico
	DL- mentol		Acético
	Timol		Láurico
	Glicerol		Pirúvico
			L-prolina
	L-alanina		
	Glicina		
	L-histidina		
	L-treonina		
	L-lisina		
	L-arginina		
	Glucosa		
	Fructuosa		

	Sucrosa
	Glucosa
	Glicerol
	Lactosa
	Xilitol
	Sorbitol
	Manosa
	Maltosa
	Etilenglicol
	1-2-Propanediol
Alcoholes	1,4-butanodiol
	1,2-butanodiol
	1,6 Hexanediol
	2,3-butanodiol

(Benvenuti *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020)



Figura 9. Formación de los DES (Daivan *et al.*, 2013) donde los dos primeros viales muestran el HBA (ChCl) y el HBD (urea), mientras que los dos últimos muestran líquidos (DES) resultantes de la asociación de ambos compuestos.

2.6.2.1.1 Síntesis. La síntesis consiste en la mezcla del HBA y HBD en proporciones molares específicas esto dependiendo del punto eutéctico de cada compuesto y de su temperatura de fusión. Se suelen agregar ambos en un frasco cerrado con agitación constante y temperaturas de 50-80 °C, hasta la formación de una mezcla homogénea líquida (1-3 horas) (Figura 9).

En este proceso no ocurren reacciones químicas con formación de nuevos enlaces formales entre el HBA y el HBD, no se desprende ningún desecho, por lo que también tiene un valor 0 de factor E (masa del desecho total/ masa del producto), o un 100 % de economía atómica, cumpliendo con el segundo principio de la química verde, ya que todos los átomos que se depositaron en un

principio son los que contiene al final de la síntesis. Los DES Son altamente solubles en agua y comúnmente higroscópicos, esta cualidad permite la precipitación de compuestos de interés. En la figura 10 se muestran ejemplos de las interacciones supramoleculares entre el HBA y HBD (De Oliveira Vigier *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2012).

2.6.2.1.2 Propiedades fisicoquímicas. Las propiedades fisicoquímicas relevantes en el estudio de los DES son la viscosidad, densidad, conductividad, polaridad, miscibilidad en disolventes con diferente polaridad, temperatura de congelación y tensión superficial, entre las más relevantes. Estas propiedades se encuentran estrechamente relacionadas con la temperatura a la que se encuentre el sistema y pueden ayudar a dirigir sus potenciales usos industriales (De Oliveira Vigier *et al.*, 2019; Hansen *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2012). La supresión del punto de congelación de los DES se debe a las interacciones entre los HBA y HBD, esto se debe a que ambos forman una nueva fase, de características diferentes a las de ambos compuestos por separado.

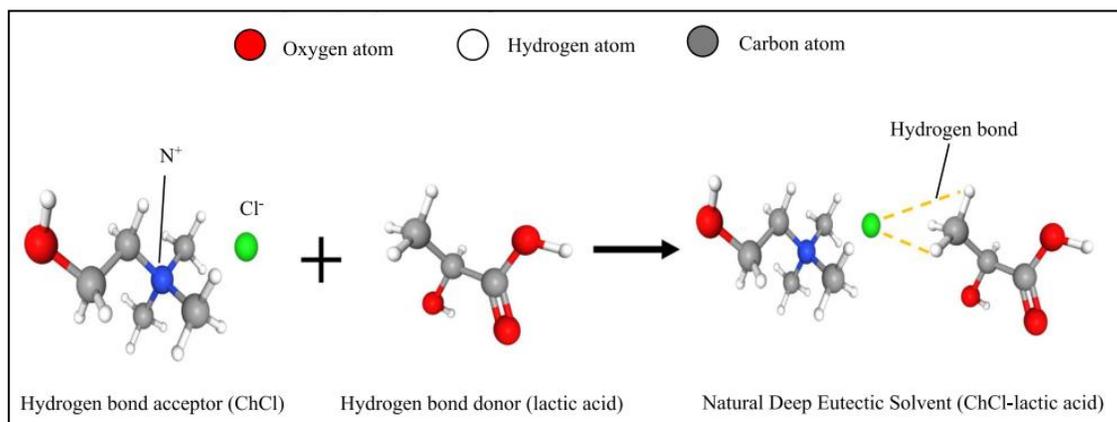


Figura 10. Interacciones supramoleculares entre el aceptor de enlaces de hidrógenos y el donador de enlaces de hidrógeno (Mohd Fuad *et al.*, 2021)

Existen algunas combinaciones de DES en las cuales se pueden comportar como líquidos a temperatura ambiente, como las combinaciones de ChCl (HBA) con glicerol, etilenglicol, butanediol, ácido láctico, levulínico, entre otros, sin embargo el *liquidus* de esos DES, dependerá de la proporción molar entre sus componentes (De Oliveira Vigier *et al.*, 2019; Hansen *et al.*, 2021;

Zhang *et al.*, 2012).

En cuanto a su densidad es una propiedad importante ya que delimita cuales aplicaciones industriales se pueden llevar a cabo, la mayoría de los DES presentan densidades de entre 1.0 a 1.35 g/cm³ a 25 °C, siendo ligeramente superiores a la densidad del agua. La densidad se debe principalmente a las características moleculares del arreglo espacial dictado por las interacciones entre los HBD y los HBA y a las variaciones de temperatura. Por ejemplo, los DES sintetizados con ácidos orgánicos suelen ser más densos por la cantidad de grupos ácidos presentes, en el caso de los dioles y alcoholes dependerá del tamaño de la cadena de carbonos. También se correlaciona con las proporciones molares y la fuerza y extensión de los iones presentes en el HBD (De Oliveira Vigier *et al.*, 2019; Hansen *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2012).

La viscosidad es un parámetro de importancia que debe ser estudiado en proyectos que involucren DES, ya que delimita sus aplicaciones. La viscosidad depende estrechamente de la temperatura y de la proporción de agua que esté presente en el DES. Para DES anhidros se han reportado valores mayores a 100 mPa.s. Los DES formados con dioles y alcoholes suelen presentar viscosidades menores a 100 mPa.s a temperaturas de entre 20 y 30 °C. Un ejemplo de esto, es que los DES formados de ChCl/etilenglicol 1:4 molar tienen una viscosidad de 19 mPa.s a 20 °C, esto sin añadir agua.

La viscosidad también se debe a la formación e interacción de los enlaces de hidrógeno intermoleculares; por ejemplo se ha observado que DES formados con ChCl/glicerol, donde a mayor proporción de glicerol menor será su viscosidad debido a la formación de enlaces de hidrógenos estables, por el contrario no se han observado cambios significativos entre la viscosidad en DES formados con etilenglicol o butanediol.

Otras fuerzas intermoleculares y electrostáticas que afectan a la viscosidad son las fuerzas de van der Waals, el tamaño y movimiento de los iones (De Oliveira Vigier *et al.*, 2019; Hansen *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2012). Normalmente en la literatura se puede observar diferencias entre los valores de viscosidad de los DES, debido a las metodologías usadas, así como el porcentaje de agua en el DES, método de síntesis y otros factores (temperatura, pureza de compuestos).

La conductividad iónica se correlaciona con la viscosidad y la densidad, ya que entre más densos y viscosos sean, menor será la capacidad de transferir energía entre los iones presentes. La mayoría de los DES presentan una conductividad de 1 mS/cm a temperatura ambiente. Sin embargo, los DES compuestos por dioles y alcoholes como el etilenglicol, butanediol, hexanediol,

glicerol, entre otros presentan conductividades iónicas mayores a 7.61 mS/cm (De Oliveira Vigier *et al.*, 2019; Hansen *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2012).

La polaridad es un aspecto de alta relevancia si se desea emplear el DES para extracción de fitoquímicos, debido a la afinidad de los metabolitos. En este caso se pueden emplear métodos solvatocrómicos para estimarla. Los DES con mayor polaridad son los conformados por alcoholes de cadena corta como el glicerol y etilenglicol y otros HBD con grupos funcionales polares y bajo peso molecular como la urea (De Oliveira Vigier *et al.*, 2019; Hansen *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2012).

En cuanto a la tensión superficial, esta depende estrechamente de las interacciones intermoleculares y de la fuerza de las mismas entre los HBD y HBA. Esto se debe a los enlaces de hidrógenos formados entre sí y de su intensidad, por ende, el HBD juega un papel importante en esta característica (De Oliveira Vigier *et al.*, 2019; Hansen *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2012).

2.6.2.1.3 Usos. Los DES cuentan con una amplia gama de usos industriales, tanto así que algunos autores los han reconocido como los solventes del siglo XXI (Paiva *et al.*, 2014). Algunos de los usos industriales enfocados a la energía, son la habilidad de solubilizar el CO₂ lo cual puede optimizar los procesos de separación, purificación, catálisis, fijación química del gas, entre otros. Por otro lado, gracias a la formación de enlaces tipo enlaces de hidrógeno, los DES pueden disolver óxido de metales (aluminio, cromo, cobre, níquel, zinc, entre otros) brindando una alternativa verde para su separación y reciclaje (Smith *et al.*, 2014). Así mismo gracias a esta cualidad se pueden usar como coadyuvantes de limpieza y pulido en la industria metalúrgica (Zhang *et al.*, 2012).

Se han usado también en la industria de los combustibles, esto gracias a su alta polaridad los DES pueden usarse para separar subproductos resultantes de la producción de biodiesel como lo es el glicerol. En la química orgánica e inorgánica se han usado como catalizadores de reacciones de naturaleza ácida y alcalina y para la síntesis de compuestos de interés. Otras aplicaciones de los DES son en el área de electroquímica, principalmente en la electrodeposición, así como en la elaboración de materiales, principalmente; nano partículas, materiales de carbono entre otros (Hansen *et al.*, 2021; Smith *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2012).

Un uso frecuente que en los últimos años ha sobresalido son sus aplicaciones en química analítica, en particular la extracción de analitos de mezclas complejas (plaguicidas, metales pesados e hidrocarburos poli aromáticos), la modificación de nano partículas de sílice, absorbentes para mejorar la extracción, diluyentes de muestras sólidas, solventes de elución en cromatografías de

columna y como fases móviles para cromatografías líquidas (Shishov *et al.*, 2017). Se han estudiado también su uso terapéuticos y farmacológicos, resaltando el incremento de la solubilización de medicamentos y nutraceuticos, reportando resultados prometedores gracias a su inocuidad, capacidad de solvatación, administración y absorción. Estos DES con propiedades terapéuticas se les denomina THEDES (Therapeutic Deep Eutectic Solvents) por sus siglas en inglés (Ijardar *et al.*, 2022; Paiva *et al.*, 2014).

En años recientes se ha indagado acerca de la eficiencia de los DES para procesar biomásas agrícolas, las cuales se componen de celulosa, hemicelulosa, lignina y polisacáridos, los cuales se podrían aprovechar para la producción de biocombustibles. Otros usos dados a los DES son en bioquímica para estabilizar biomoléculas y enzimas. En genómica se han usado para estabilizar ácidos nucleicos (Hansen *et al.*, 2021).

2.6.2.1.4 Evaluación ambiental y toxicidad de DES. Generalmente los DES y en especial los NaDES (disolventes eutécticos profundos naturales) se consideran no tóxicos y biodegradables, sin embargo, recientes investigaciones han identificado algunos aspectos interesantes sobre su posible toxicidad en modelos *in vivo*, lo que podría comprometer las aplicaciones biomédicas y biológicas. Grozdanova *et al.*, (2020) evaluaron la genotoxicidad y citotoxicidad de NaDES elaborados con cloruro de colina, ácido cítrico, glicerol, 1,2-propanediol y glucosa; usaron fibroblastos de ratón CCL-1 evaluados a dos tiempos de exposición 24 y 72 h. Identificaron mayor citotoxicidad en el NaDES hecho de ácido cítrico y 1,2 propanediol, mientras que en los otros se observó que a medida que el tiempo transcurrió la toxicidad decrecía, por lo que la toxicidad fue tiempo y dosis dependiente. Así mismo todos los NaDES evaluados presentaron moderada genotoxicidad excepto el NaDES de cloruro de colina y glicerol el cual presentó una mayor genotoxicidad en las mismas concentraciones evaluadas.

Macário *et al.* (2019) evaluaron algunas combinaciones de DES en dos líneas celulares de piel humana (queratinocitos HaCaT y melanocitos MNT-1). Resaltaron que el HBA juega un papel fundamental en cuanto a la toxicidad de los DES, comentan que el cloruro de colina produjo un ligero incremento en la viabilidad de las células antes mencionadas, mientras que el cloruro de tetrabutilamonio fue tóxico. Por otro lado, los HBD como el ácido butírico presentó toxicidad, sin embargo, el etilenglicol y urea ejercieron un aumento en la viabilidad celular. El ácido hexanoico incrementó la viabilidad solo en la línea HaCaT siendo tóxico en la MNT-1, mientras que el 1-propanol mostró resultados inversos al anterior. En cuanto a los DES formados con dichos HBA y

HBD, los elaborados con ChCl y etilenglicol y 1-propanol mostraron un incremento en ambas líneas celulares, mientras que los DES con ChCl y ácido hexanoico, butírico y urea solo mostraron un aumento en la HaCaT, sin mostrar efectos tóxicos en la MNT-1, excepto el ChCl/ácido butírico el cual mostro ligera toxicidad. Esto podría ser usado como referencia para futuros modelos y/o diseños de creación de biomateriales.

Otro estudio reveló la toxicidad de los NaDES en modelos *in vitro*. Mbous *et al.*, (2017) estudiaron la citotoxicidad de dos NaDES y un DES, formados por cloruro de colina y glucosa o fructosa, y cloruro de amonio de N,N-dimetiletanol y trietilenglicol, respectivamente. Primero evaluaron la citotoxicidad en células cancerosas HeLa S3, PC3, AGS, A375, MCF-7 y WRL-78, donde todos los NaDES evaluados presentaron toxicidad con una EC₅₀ (concentración media efectiva) de 98 a 616 mM, siendo la AGS la más susceptible. Así mismo el NaDES con fructosa fue el más citotóxico en comparación con la glucosa como HBD. Por otro lado, el NaDES con fructosa fue el más citotóxico contra las células antes mencionadas. Esto se pudo deber a la viscosidad, pH, y metabolismo de la fructuosa el cual produce productos de glicación avanzada, en contraste con la glucosa. Los autores analizaron la permeabilidad celular, destacando que el DES produjo una mayor destrucción de las células, seguido del NaDES con fructosa. Los compuestos por separado mostraron toxicidad contra AGS, siendo el más tóxico el trietilenglicol, seguido del cloruro de colina, cloruro de amonio de N,N-dimetiletanol, fructosa y glucosa. El DES por su parte mostró una mayor producción de ROS, en contraste con los NaDES. En cuanto al modelo *in vivo*, la DL₅₀ sorprendentemente fue menor para el NaDES con glucosa, seguido del NaDES con fructosa y el DES. Los autores mencionan que esto se puede deber a la viscosidad del NaDES ya que fue inyectado al ratón por lo que pudo haber bloqueado el flujo sanguíneo. En los análisis bioquímicos se observó que el órgano diana de los NaDES es el hígado ya que es el responsable de metabolizar la fructosa y la glucosa, en exceso se sabe que daña las células hepáticas (Mbous *et al.*, 2017).

Radošević *et al.* (2018) evaluaron la citotoxicidad de NaDES en células HeLa, HEK293T y MCF-7; los más citotóxicos fueron los elaborados con cloruro de colina (HBA) y ácido oxálico o urea (HBD's), mientras que el NaDES de betaína/ácido málico y prolina estimuló el crecimiento de las líneas celulares. Estos resultados pueden sugerir el uso de NaDES como agentes anticancerígenos. Hayyan *et al.* (2016), evaluaron algunos NaDES en líneas celulares de cáncer HeLa S3, CaOV3, MCF-7 y B16F10, identificando que el NaDES con cloruro de colina (HBA) y ácido malónico (HBD) tuvo una mayor citotoxicidad, en todas las líneas, esto debido a su viscosidad, pH y

naturaleza del ácido orgánico.

Se ha investigado en modelos murinos la toxicidad aguda de extractos ricos en ácidos fenólicos y NaDES con betaína y glicerol 1:2 molar, observando que después de la ingestión del NaDES las ratas mostraron pereza, falta de apetito y fatiga, esto debido al glicerol y su viscosidad, así mismo murieron dos ratas en los primeros 10 días de tratamiento. El consumo de alimento disminuyó por ende el peso, pero el consumo de agua aumento, debido a alteración osmolítica causada por el glicerol. También se observó un incremento en el colesterol y triglicéridos debido a la presencia de betaína. Se detectó hepatomegalia pero sin daño hepático, así como un aumento en el tamaño de riñones igualmente sin daño o cambio respecto al grupo control. Se observó un aumento de estrés oxidativo en el plasma esto debido al glicerol el cual provoca oxidación lipídica renal (Benlebna *et al.*, 2018).

Estudios de citotoxicidad de DES y NaDES se han llevado a cabo con la línea celular HEK-293, reportando que los HBA y HBD como la glucosamina, 1,4-butanediol, 1,3-butanediol, cloruro de colina y maltosa son ligeramente citotóxicos, los NaDES con cloruro de colina/ glucosamina y cloruro de colina/rafinosa fueron los más tóxicos, esto debido a las altas concentraciones de cloruro de colina 9:1 y 11:2, respectivamente. Por el contrario, los azúcares evaluados como el sorbitol fructosa, glucosa, galactosa, manosa, sucrosa, rafinosa y los alcoholes etilenglicol, 1,2-propanediol y glicerol no presentaron toxicidad. Así mismo los NaDES hechos con cloruro de colina y 1,2 propanediol, glicerol, sucrosa y fructosa fueron ligeramente citotóxicos (Ahmadi *et al.*, 2018).

Se ha estudiado la ecotoxicidad de los DES y de sus compuestos por separado determinando que no son tóxicos, para ambientes acuáticos. De los evaluados el etilenglicol fue el menos tóxico mientras que sales cuaternarias como el cloruro de tetrapropilamonio fue el más toxico (Macário *et al.*, 2018). Se ha evaluado la citotoxicidad, fitotoxicidad y la biodegradabilidad en agua de varios DES elaborados con cloruro de colina y glicerol o glucosa o ácido oxálico como HBD's, de los cuales este último presentó citotoxicidad contra células CCO y MCF-7. Al igual el DES elaborado con ácido oxálico presentó mayor incremento en la producción de malondialdehido y una disminución del contenido de clorofila en el modelo vegetal estudiado, al igual hubo un desbalance en las enzimas antioxidantes decreciendo la SOD, GPx, CAT e incrementando la APOX (ascorbato peroxidasa). Sin embargo, los NaDES con glicerol y glucosa presentaron resultados favorables en cuanto a la viabilidad celular y vegetal. Los tres NaDES resultaron ser biodegradables a los 14 días (Radošević *et al.*, 2015).

2.6.2.1.5 DES para extracción de metabolitos secundarios. La extracción de metabolitos secundarios de interés industrial y medicinal a partir de plantas, frutos, vegetales, biomasas, materiales lignocelulósicos, es una de las más recientes y útiles aplicaciones de los DES y NaDES. Esto se empezó a explorar desde que Daivan *et al.* (2013) y Dai *et al.* (2013), postularon a los NaDES los cuales se componen de metabolitos primarios mezclados con sales cuaternarias como HBA's, los cuales son capaces de solubilizar fitoquímicos aún más que el agua presente en la célula vegetal, por lo tanto, estos NaDES son una opción excelente de disolventes alternativos para extraerlos.

A la fecha una gran cantidad de artículos originales y de revisión se han publicado remarcando los trabajos sobre optimización de los parámetros de extracción de fitoquímicos de diversas fuentes naturales. Los NaDES y los DES al ser biodegradables, y cumplir con varios de los principios de la química verde se han usado para valorizar subproductos agrícolas, y biomasas con la finalidad de promover disolventes sustentables que sean congruentes con la generación de economías circulares (Alam *et al.*, 2021; Ali Redha, 2021; Balaraman *et al.*, 2021; Benvenuti *et al.*, 2019; Jablonský *et al.*, 2018; Ruesgas-Ramón *et al.*, 2017).

Una de las ventajas del uso de DES y NaDES para la extracción de fitoquímicos en particular de tipo fenólico es que la formación de enlaces de hidrógeno entre el HBA y el HBD evita la degradación e incrementa la extracción, estabilidad y solubilidad de los mismo.

En la Figura 11 se plasma un modelo propuesto por Lu *et al.* (2020) donde se observa la interacción de los DES con flavonoides. Uno de los HBD comúnmente usado para la extracción de flavonoides son los dioles y alcoholes, debido al gran número de grupos OH los cuales pueden interaccionar de manera eficiente con los flavonoides y/o ácidos fenólicos. Del mismo modo pueden interaccionar los grupos hidroxilo de los HBD con los grupos hidroxilo de los componentes de la pared celular como celulosa, hemicelulosa y pectina y así formar enlaces de hidrógeno. Sin embargo, los DES formados con ácidos orgánicos como HBD pueden dar lugar a iones de hidronio los cuales pueden hidrolizar a dichos componentes de la pared celular, por lo tanto, se pueden liberar al medio. Para facilitar la penetración del DES en la célula vegetal comúnmente se usan tecnologías emergentes como el ultrasonido, microondas, entre otros (Alam *et al.*, 2021; Balaraman *et al.*, 2021; Benvenuti *et al.*, 2019; Mišan *et al.*, 2020).

Las propiedades fisicoquímicas (viscosidad, densidad, polaridad, solubilidad y conductividad) de los DES influyen directamente en la extracción de los metabolitos. La viscosidad limita la

transferencia de masa entre el material vegetal y el disolvente, por lo que se puede ajustar con la adición de agua. Esto se debe a que el agua compite por la formación de enlaces de hidrógeno entre los componentes del DES disminuyendo la viscosidad, sin embargo, si esta sobrepasa el 50 % puede dañar la estructura supramolecular del DES, rompiendo por completo la red de enlaces de hidrógeno, convirtiendo la mezcla en una solución acuosa sobresaturada de los componentes del DES. Así mismo la proporción molar afecta la extracción de flavonoides. Se ha observado que la combinación de cloruro de colina y glicerol en proporción molar 1:2, respectivamente, mejora el rendimiento. Sin embargo, cuando se aumenta el glicerol a una proporción molar 1:5, respectivamente, ésta disminuye, ya que se produce una interferencia que debilita las interacciones entre el metabolito y el anión del cloruro de colina (Alam *et al.*, 2021; Balaraman *et al.*, 2021; Benvenuti *et al.*, 2019; Mišan *et al.*, 2020) .

Diversas investigaciones han evaluado mezclas de DES compuestos de cloruro de colina y ácidos orgánicos o dioles para la extracción de compuestos fenólicos. La mayoría de las extracciones se efectúan asistidas por baño de ultrasonido, sin embargo, los tiempos pueden ir desde 10 a 480 min, con temperaturas que oscilan entre 25 y 100 °C. Los HBD mayormente reportados para este fin son el etilenglicol, propanediol, butanediol y glicerol (Alam *et al.*, 2021; Balaraman *et al.*, 2021; Benvenuti *et al.*, 2019).

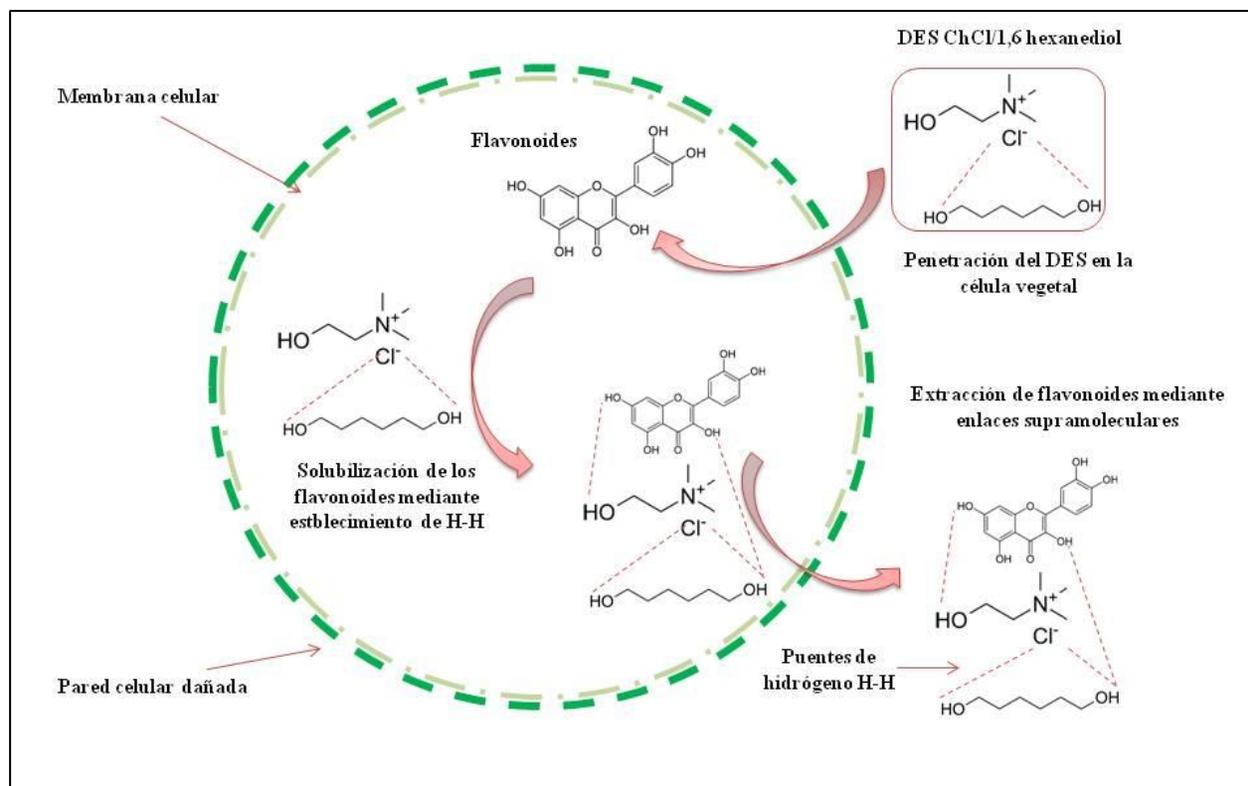


Figura 11. Modelo por el cual los DES son capaces de solubilizar fitoquímicos de células vegetales (Lu *et al.*, 2020)

2.7 Ultrasonido

El ultrasonido es una tecnología novedosa que cumple con algunos de los principios de la química verde, además de que es sustentable por minimizar los tiempos de extracción, por ende, existe un menor gasto energético, así mismo no genera residuos. Otra de las ventajas es que minimiza el consumo del disolvente y se puede aplicar para diferentes propósitos desde la extracción de metabolitos secundarios, aceites esenciales y otros compuestos de pureza grado alimenticio y farmacéutico (Chemat *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2021; Rao *et al.*, 2021).

El mecanismo por el cual las ondas ultrasónicas rompen la célula vegetal se ha estudiado mínimamente, sin embargo, se conoce que se encuentran involucrados al menos cuatro reacciones fisicoquímicas, el primero es la cavitación acústica, la cual produce una fuerte energía en el disolvente, que a su vez propicia la implosión de las burbujas formadas por la misma cavitación

dando como resultado micro remolinos los cuales dañan la célula, erosionándola y rompiéndola. Durante este fenómeno se producen otros cuatro los cuales son fragmentación, erosión, capilaridad y sonoporación (Chemat *et al.*, 2017; Ranjha *et al.*, 2021). En la Figura 12 se muestran los fenómenos implicados en la cavitación acústica propuesto por (Flores *et al.*, 2021).

La fragmentación ocurre por la notable reducción del tamaño de partícula del material vegetal, esto es debido a que las partículas colisionan por las ondas ultrasónicas, y por la generación de burbujas las cuales colapsan bruscamente provocando la fragmentación. Esto beneficia a la extracción ya que al minimizar el tamaño de partícula se incrementa la superficie de contacto con el disolvente provocando una mayor transferencia de masa del material vegetal al mismo (Chemat *et al.*, 2017). Un fenómeno ligado a la fragmentación es la erosión de la célula vegetal, la cual mediante imágenes obtenidas con microscopio electrónico de barrido por sus siglas en inglés SEM, se puede corroborar. Esto se debe a que las burbujas formadas por la cavitación pueden llegar a erosionar las estructuras de la planta incrementando la extracción del interior al exterior (Chemat *et al.*, 2017; Rao *et al.*, 2021).

El efecto de la sonocapilaridad se refiere a la velocidad y profundidad con la cual penetra el disolvente entre la estructura de la célula vegetal, esto se puede observar mediante cinéticas de extracción, donde se corrobora que la extracción se optimiza con ultrasonidos que con maceración. Esto se puede deber a la capacidad de retención de agua por el material vegetal sometido al ultrasonido; un ejemplo de esto es que la pulpa de manzana tratada puede retener hasta un 70 % más de agua que el tratamiento con maceración, lo que provoca una mayor difusión de los fitoquímicos de la célula al exterior. La sonoporación por su parte, es un fenómeno físico el cual se refiere a la creación de poros en la membrana celular causados por la cavitación acústica, ocasionando la difusión del interior al exterior, esto se puede deber a las perforaciones en la membrana celular (Chemat *et al.*, 2017; Flores *et al.*, 2021).

La fuerza de corte producida por el ultrasonido mejora las propiedades de extracción de fitoquímicos, además también ayuda al mezclado y emulsificación en ciertas aplicaciones alimenticias. En procesos a temperaturas por arriba de los 60 °C, y tiempos de extracción largos, se puede observar un efecto de destrucción y destexturización (Chemat *et al.*, 2017; Flores *et al.*, 2021).

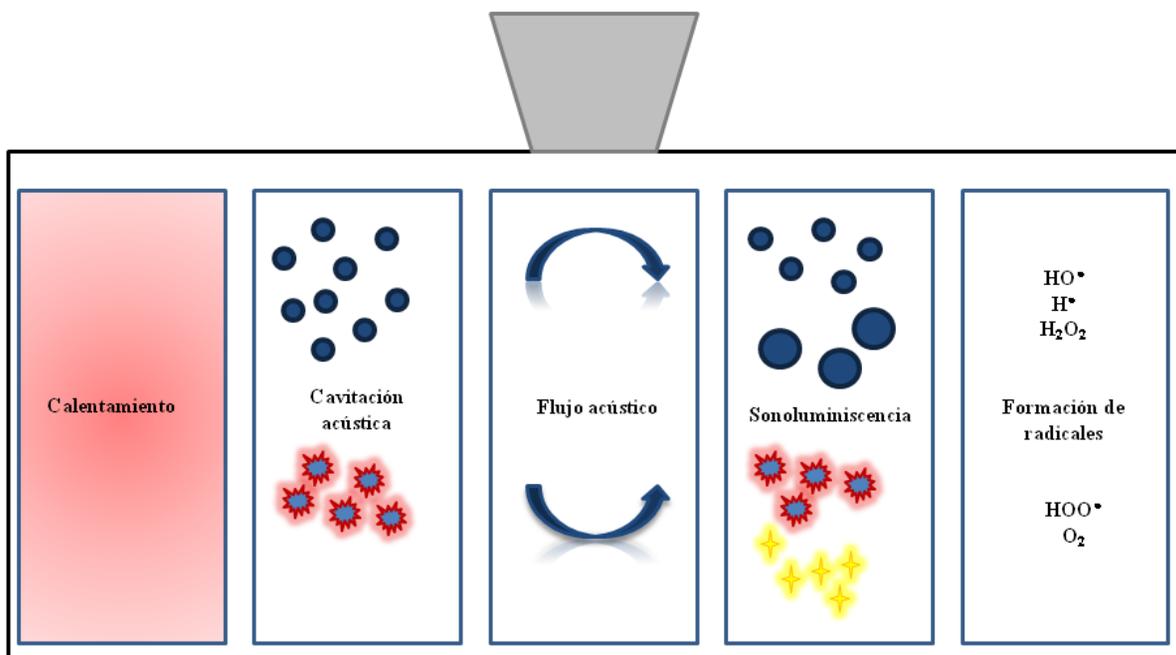


Figura 12. Fenómenos fisicoquímicos ocurridos durante la ultrasonificación (Flores *et al.*, 2021)

Por otro lado, la amplitud y la frecuencia son dos parámetros de importancia en la extracción por ultrasonidos. A mayor potencia se incrementa la fuerza de corte, y el rendimiento de extracción de metabolitos, sin embargo también se produce una deformación y ruptura total de la célula vegetal, genera una implosión más violenta, y un aumento considerable de la temperatura destruyendo los compuestos de interés (Rao *et al.*, 2021).

La frecuencia con la que las ondas son generadas normalmente es de 20 a 25 kHz, sin embargo, se ha observado que se puede ser selectivo con los fitoquímicos dependiendo las frecuencias usadas. A mayores frecuencias se produce una disminución en la intensidad con la que la cavitación ocurre, por lo que se necesitaría un mayor tiempo de extracción (Chemat *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2021). Con potencias altas también se pueden generar radicales libres debido a la formación y colapso de la cavitación acústica. Estos radicales pueden oxidar y reducir los compuestos presentes, también se ha observado que pueden ocurrir modificaciones químicas en los flavonoides como el incremento de su hidroxilación por lo que podrían incrementar su actividad antioxidante, contrarrestando los efectos de los radicales generados (Flores *et al.*, 2021; Gouda *et al.*, 2021).

El efecto de los pulsos se ha estudiado brevemente, resaltando que si se opera en modo pulsado se puede reducir la formación de burbujas, mejorando la intensidad con la cual estas colapsan y causan el daño a la célula vegetal lo que propicia una mayor extracción de fitoquímicos (Rao *et al.*, 2021).

Estos fenómenos de ondas acústicas mecánicas se propagan en el disolvente, mediante los ciclos de compresión y refracción, produciendo los fenómenos antes mencionados.

El ultrasonido puede cambiar los enlaces intermoleculares entre los fitoquímicos, un ejemplo de esto se observó con la camfotecina un monoterpene aislado de *Camptotheca acuminata* donde el ultrasonido transformó los enlaces disulfuro a enlaces tipo tiol, modificando la estructura molecular (Gouda *et al.*, 2021). El ultrasonido produce fenómenos sonoquímicos y sonoluminiscencia la cual consiste en la emisión de luz generada por la cavitación acústica, esta emisión puede generar reacciones químicas. Esto se genera debido a que la ruptura de las burbujas antes formadas se produce de forma violenta explosionando y/o colapsando dentro de la célula vegetal, esto a presiones por arriba de 1,000 atm y temperaturas por arriba de los 5000K, las cuales son las responsables de los cambios químicos (Rao *et al.*, 2021).

Es interesante la aplicación del ultrasonido en el pre tratamiento de biomasa lignocelulósicas ya que esta puede incrementar la accesibilidad de los disolventes a la compleja estructura de la lignina, celulosa y hemicelulosa. Diversas investigaciones han documentado la recuperación y extracción de lignina bajo tratamientos con ultrasonidos (Flores *et al.*, 2021).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad los modelos de producción agrícola intensivos originan miles de toneladas de desechos y subproductos, los cuales en ocasiones se eliminan a través de su traslado a cuerpos de agua y/o combustionan, lo que genera serios problemas de salud. En los vertederos propician la aparición y proliferación de fauna nociva, olor fétido, afectaciones paisajísticas, alteran las comunidades vegetales aledañas y si el ganado lo consume *ad libitum* puede generar desbalances metabólicos, además de una intoxicación si el material se encuentra contaminado de plaguicidas. Todo esto puede impactar en la economía del productor puesto que las regulaciones y sistemas de gestión de calidad, exigen un programa de administración de residuos, que si no se cumple, muchas de las ocasiones no podrán exportar sus productos. Aunado a esto, una vez terminada la cosecha, las plantas se someten a un tratamiento químico con desecantes-herbicidas, que aceleran el proceso de defoliación. Terminado dicho proceso, se cortan las plantas y se queman, liberando productos de descomposición y metabolitos de estos agroquímicos, que potencialmente pueden contaminar cientos de kilómetros a la redonda.

La valorización de estos residuos debe ser acorde a los principios de la química verde apegados a la sustentabilidad, por lo que los procesos y/o alternativas de transformación deben ser diseñados, optimizados y escalados a nivel industrial previa consideración de que las operaciones unitarias sean factibles en estos sentidos.

4. JUSTIFICACIÓN

La valorización de biomásas agrícolas es una tendencia en la investigación científica, ya que se busca optimizar estos recursos para transformarlos a otros con mayor valor agregado. La extracción de fitoquímicos de biomásas según la pirámide de valorización de residuos es la actividad que mayor valor agregado brinda, por lo que su factibilidad científica y tecnológica se ha intensificado en los últimos años.

El pimiento morrón es uno de los cultivos agrícolas con mayor producción en México, lo que lo hace atractivo para su investigación como fuente de fitoquímicos, además de que las cantidades de biomasa son superiores a otros cultivos. Dentro de su composición presenta fitoquímicos con actividad antioxidante los cuales han tomado auge debido a la llegada del Sars-CoV-2 y al incremento en problemas de salud asociados a patologías de síndrome metabólico, por lo que su demanda en el mercado incrementó considerablemente.

Las nuevas tecnologías de extracción de fitoquímicos permiten obtener mayores rendimientos con mayor pureza y en tiempos reducidos, además de ser biodegradables e inoocuos. Entre estas el uso de una nueva generación de disolventes llamados DES (disolventes eutécticos profundos) para la extracción de metabolitos resalta por ser más rentable, sustentable y eficiente en comparación con los disolventes orgánicos. Aunado al uso de disolventes sustentables, la utilización de ultrasonido acelera el proceso de obtención, reduciendo el tiempo y por ende los gastos energéticos, además de que es una tecnología potencialmente escalable.

El optimizar los parámetros de extracción de fitoquímicos permite reducir costos y tiempos de producción dando como resultado una mejora en los procesos actuales. Implementar modelos matemáticos para estudiar y predecir parámetros relevantes para la extracción de fitoquímicos es una de las estrategias más importantes para establecer su reproducibilidad, el potencial de escalamiento y utilidad en procesos industriales. En este caso, la optimización de la extracción de flavonoides de biomasa de pimiento morrón puede ayudar a dilucidar las posibles aplicaciones de valorización de este recurso; además de coadyuvar a minimizar el impacto ambiental generado por la producción agrícola de este fruto. Por dichas razones el presente estudio tiene una justificación de tipo científica y ambiental.

5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cuáles fitoquímicos y en que concentraciones estarán presentes en la biomasa (tallos y hojas) de pimiento morrón?
2. ¿Qué características fisicoquímicas y espectroscópicas presentaran los DES sintetizados?
3. ¿Cuál será el donador de enlaces de hidrógeno que extraiga mayor cantidad de flavonoides totales, luteolina 7-*O*-glicósido y quercetina 3-*O*-ramnósido?
4. ¿Cuáles serán las variables de proceso que optimicen la extracción de flavonoides totales, luteolina 7-*O*-glicósido y quercetina 3-*O*-ramnósido?
5. ¿Cuál será la capacidad antioxidante por los métodos ABTS, DPPH, FRAP y ORAC que presente el extracto optimizado de biomasa de pimiento morrón?

6. HIPÓTESIS

1. Los fitoquímicos presentes en la biomasa de pimiento morrón son flavonoides glicosilados, terpenoides, alcaloides y esteroides.
2. Los DES sintetizados presentan características fisicoquímicas y espectroscópicas similares a lo reportado en la literatura con la polaridad y viscosidad suficientes para servir como medio de extracción de flavonoides de biomasa de pimiento morrón.
3. El DES que extrae mayor cantidad de flavonoides totales, luteolina 7-*O*-glicósido y quercetina 3-*O*-ramnósido, es el formado por el donador de enlaces de hidrógeno 1,6-hexanediol en una proporción molar 1:1 combinado con ChCl como aceptor de enlaces de hidrógeno.
4. Las variables de proceso que optimizan la extracción de flavonoides totales, luteolina 7-*O*-glicósido y quercetina 3-*O*-ramnósido de biomasa de pimiento morrón son el tiempo y la potencia (amplitud) del ultrasonido.
5. La capacidad antioxidante del extracto optimizado por los métodos ABTS, DPPH, FRAP, ORAC se encuentra dentro del rango de 4-30 mmoles ET/100 g BS.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

Optimizar la extracción de flavonoides de biomasa de pimiento morrón (*Capsicum annuum* L), mediante Disolventes Eutécticos Profundos (DES), asistidos por ultrasonido.

7.2 Objetivos Específicos

1. Realizar el tamizaje fitoquímico de la biomasa de pimiento morrón.
2. Sintetizar los DES y evaluar sus características fisicoquímicas y espectroscópicas.
3. Evaluar los donadores de hidrógenos (HBD) que forman DES con ChCl en diferentes relaciones molares, en cuanto a la extracción de flavonoides totales, luteolina 3-*O*-glicósido y apigenina 7-*O*-glicósido.
4. Optimizar la extracción de flavonoides totales, luteolina 3-*O*-glicósido y apigenina 7-*O*-glicósido mediante metodología de superficie de respuesta y cuantificarlos mediante las condiciones óptimas.
5. Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto optimizado por los métodos ABTS, DPPH, FRAP y ORAC.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación fue de tipo experimental y descriptiva. Se llevó a cabo dentro de las instalaciones del CIAD Coordinación Culiacán, específicamente en los laboratorios de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos, Plaguicidas, Bioprocesos y la Planta Piloto.

8.1 Material de Estudio

Se colectó la biomasa (hojas y tallos) de chile pimiento morrón (*Capsicum annuum* L), tipo Blocky, variedad Thames F1, de Bejo Zaden® durante mayo de 2021. Fue sembrado a cielo abierto, en las coordenadas 24°34'39.9"N 107°31'45.6"W y 24°34'46.8"N 107°32'00.1"W. Específicamente se colectaron las plantas de la parcela número 40, tablas 3 y 4. Se colectaron 30 plantas completas las cuales presentaban estados de maduración del fruto avanzados-senescentes. El sitio de colecta pertenece al municipio de Culiacán, Sinaloa, México.

8.2 Acondicionamiento

Una vez realizada la colecta, se procedió a separar manualmente los órganos vegetativos (hojas y tallos). Después se procedió a la deshidratación en un horno marca Excalibur® modelo D900SHD, durante 12 horas a 60 °C. Una vez deshidratado, se molieron las hojas en un molino marca IKA®, modelo universal M20. Los tallos se molieron en un pulverizador marca Pulvex® modelo 300. Una vez molido las hojas y los tallos se conservaron por separado en bolsas de polipropileno a temperatura ambiente (20 °C-30 °C). Para todos los análisis posteriores se realizó una mezcla entre los tallos y hojas (75-25 % respectivamente), previamente se tamizaron por separado en un tamiz con una malla 40.

8.3 Identificación de Fitoquímicos de Biomasa de Pimiento Morrón (Etapa I)

8.3.1 Extracción de Fitoquímicos con Disolventes Orgánicos

Se extrajeron los fitoquímicos de la biomasa, mediante disolventes orgánicos (hexano, diclorometano y metanol). Los extractos se elaboraron pesando 300 g de biomasa y 1 L de los disolventes por separado. La extracción se realizó por maceración en un matraz Erlenmeyer, durante 24 h a 30 ± 5 °C y a 700 rpm (Seidel, 2005).

8.3.2 Tamizaje Fitoquímico

Para conocer los grupos de metabolitos secundarios presentes en la biomasa se llevó a cabo un tamizaje fitoquímico siguiendo los métodos de Harborne (1984), Houghton *et al.* (1998) y Jones *et al.* (2012). Se realizaron evaluaciones colorimétricas para los siguientes grupos de fitoquímicos flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas, terpenos, esteroides, glicósidos, esteroles, quinonas y cumarinas. Todas las pruebas se realizaron por triplicado en tubos de ensayo de 20 mL. En el Cuadro 6 se plasman los métodos efectuados.

Cuadro 6. Métodos para realizar el tamizaje fitoquímico

Fitoquímico	Prueba	Determinación	Resultado positivo
Flavonoides	Shinoda	A 2 mL del extracto, añadir 2 gotas de HCl concentrado, seguido de virutas de magnesio o zinc.	Para flavonas, flavonoles, derivados 2,3-dihidro y xantonas coloración naranja, rosa, rojo y/o violeta. Si se usó zinc, para flavanoles rojo intenso-violeta, flavanonas y flavonoles rosa-violeta.
	Ácido sulfúrico	A 2 mL del extracto añadir 2 gotas de H ₂ SO ₄ .	Para flavonas y flavonoles coloración amarilla.

Fitoquímico	Prueba	Determinación	Resultado positivo
	(H ₂ SO ₄)		Chalconas y auronas coloración rojo-azul. Flavanonas coloración naranja-rojo.
Taninos	Hidróxido de sodio al (NaOH)	A 2 mL del extracto añadir 2 gotas de NaOH al 20 %.	Presencia de flavonoides. coloración amarilla.
	Cloruro férrico (FeCl ₃)	A 2 mL del extracto añadir 2-3 gotas de FeCl ₃ al 5 %.	Presencia de taninos hidrolizables coloración azul-negro. Taninos condensados coloración verde-negro.
Saponinas	Gelatina-sal	A 2 mL del extracto añadir 2-3 gotas de una solución de gelatina al 5 % y NaCl al 1 %.	Precipitado color blanco indica presencia de taninos.
	Agitación	A 2 mL del extracto adicionar 20 mL de H ₂ O en ebullición. Agitar vigorosamente durante 10 min, dejar reposar 10 min. Variante: concentrar 10 mL del extracto y adicionar 20 mL de H ₂ O en ebullición. Agitar vigorosamente durante 10 min y dejar reposar otros 10 min.	Espuma densa y consistente indica la presencia de saponinas.
Cumarinas	Hidróxido de sodio (NaOH) al 10 %	A 2 mL del extracto, añadir 2 gotas.	Coloración amarilla indica presencia de cumarinas.
Quinonas	Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	A 2 mL del extracto añadir 2 gotas de H ₂ SO ₄ concentrado.	Coloración naranja-rojo presencia de quinonas.
Esteroles y terpenos	Liebermann-Burchard	Concentrar 10 mL del extracto, resuspender en 5 mL de cloroformo. Añadir 2 mL de anhídrido acético y colocar en baño de hielo hasta llegar a 0 °C. Añadir 1 mL de H ₂ SO ₄ concentrado.	Presencia de esteroles coloración azul-verde. Presencia de triterpenos coloración rojo-café.
	Salkowski	Concentrar 10 mL del extracto, resuspender en 5 mL de cloroformo y añadir 2 mL de H ₂ SO ₄ .	Presencia de esteroles coloración amarillo-roja en la capa de cloroformo, mientras que en el ácido se puede apreciar tonalidades verde-azul.
Glicósidos cardíacos y antraquinonas	Keller-Killiani	A 2 mL del extracto añadir 1 mL de ácido acético glacial, 1 mL de FeCl ₃ al 5 % y 1 mL de	Coloración verde-azul y café-rojo, resultado positivo para glicosidos cardiacos.

Fitoquímico	Prueba	Determinación	Resultado positivo
		H ₂ SO ₄ concentrado.	
	Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) Kedde	A 2 mL del extracto añadir 1 mL de H ₂ SO ₄ concentrado	Coloración rojo-café positivo para glicosidos cardíacos.
		Solución A: Dilución al 2 % de 4,5 ácido dinitrobenzoico en MeOH. Solución B: Dilución al 5.7 % de KOH en H ₂ O. Añadir una gota de cada solución a 0.2 mL del extracto.	Coloración azul-morado al cabo de 5 minutos. Presencia de glicosidos cardíacos.
	Baljet	Solución A: Disolver ácido pícrico en EtOH (1 g/100 mL). Solución B: Disolver 10 g de NaOH en 100 mL de H ₂ O. Combinar ambas soluciones 1:1. Añadir 2-3 gotas a 2 mg del extracto.	Coloración naranja-rojo presencia de glicosidos cardíacos.
	Bornträger	A 2 mL del extracto añadir 1 mL de H ₂ SO ₄ al 5 %, hervir y filtrar. Añadir 3 mL de cloroformo y reposar durante 5 min. Añadir 1.5 mL de hidróxido de amonio al 10 %.	Positivo para antraquinonas coloración rosa-rojo.
Alcaloides	Preparación de las muestras: Concentrar 30 mL del extracto, adicionar 5 mL de HCl y calentar a 45 °C durante 10 min. Enfriar y filtrar. El filtrado dividirlo en los tubos correspondientes a las pruebas.		
	Hager	Solución saturada de ácido pícrico. Añadir de 2 a 3 gotas.	Presencia de alcaloides precipitado amarillo.
	Mayer	Solución A: 1.36 g de HgCl ₂ en 60 mL de H ₂ O. Solución B: 5 g de KI en 10 mL de H ₂ O. Combinar ambas y aforar a 100 mL.	Precipitado blanco-amarillo positivo.
	Wagner	Diluir 1.27 g de I ₂ sublimado y 2 KI en 20 mL de H ₂ O, aforar a 100 mL.	Precipitado café.
	Dragendorff	Solución A: 1.7 g de Bi(NO ₃) ₃ y 20 g de ácido tartárico en 80 mL de H ₂ O. Solución B: 16 g de KI en 40 mL de H ₂ O. Mezclar en partes iguales y dejar reposar.	Precipitado café-naranja.

8.3.3 Identificación de Compuestos Orgánicos Volátiles Mediante GC/MS

Para identificar los compuestos orgánicos volátiles mediante GC/MS. Se usó un cromatógrafo de gases Agilent 7890B con detector de espectrometría de masas de trampa iónica (CG-IT-MS Agilent 240), columna VF-5 MS, 30m x 0.25mm x 0.25 μ m. Las muestras fueron inyectadas a puertos de inyección split/splitless de forma automática con ayuda de un automuestreador GC sampler 80 de Agilent. Las condiciones se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Rampa de temperatura del horno del cromatógrafo

Etapa	Temperatura °C	Velocidad (°C/min)	Duración (min)	Tiempo total (min)
Inicial	100	0	5	5
1	180	20	5	15
2	230	5	6	30.5
3	275	15	7	41.125
4	300	25		45

Temperatura del Inyector: 250 °C; Gas Cargador: Helio con un flujo de 1.0 μ l min⁻¹; Modo: Pulsed Splitless

Los espectros de masas fueron comparados con la biblioteca del equipo (NIST 2011b Mass Spectral Library usando la búsqueda NIST MS, o la probabilidad basada en el formato de búsqueda por coincidencia como parte de tecnologías Agilent estación de trabajo MS Software Version 7.0.1), aquellos compuestos con un porcentaje de similitud superior al 60 fueron considerados como presentes en los extractos. Cabe mencionar que se usaron extractos de metanol y acetonitrilo para su evaluación; no se pudieron evaluar los extractos obtenidos con DES debido que dentro de su composición se encuentra un 30 % de agua, la cual no es compatible con la metodología.

8.4 Síntesis de DES (Etapa II)

La síntesis de los DES se realizó siguiendo el método descrito por Santana *et al.*, (2019). La

formación de los DES consistió en la mezcla en proporciones molares específicas de HBA y HBD (Cuadro 8). Se pesaron las cantidades correspondientes para sintetizar las relaciones molares 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4 entre el HBA (ChCl) y entre los HBD respectivos. Se depositaron ambos en un frasco de vidrio cerrado y se sintetizaron mediante sonicación en un baño ultrasónico marca Cole Parmer® modelo EW-08895-07, con 240 VAC y 50 Hz de potencia, durante 30 min a 80 °C una vez transcurrido el tiempo se añadió 30 % de agua destilada, se agitaron vigorosamente y se sonicaron durante 15 min más.

Cuadro 8. Aceptores y donadores de enlaces de hidrógenos empleados en el estudio

Tipo de aceptor de enlaces de hidrógenos	Aceptor de enlaces de hidrógenos	Donador de enlaces de hidrógenos	Tipo de donador de enlaces de hidrógenos	Agua (%)	Molaridad
		Ácido levulínico			1:1
		Ácido levulínico			1:2
		Ácido levulínico			1:3
		Ácido levulínico	Ácido orgánico		1:4
		Ácido láctico			1:1
		Ácido láctico			1:2
		Ácido láctico			1:3
		Ácido láctico			1:4
		1,4-butanediol			1:1
Sal cuaternaria de amonio	Cloruro de colina (ChCl)	1,4-butanediol		30	1:2
		1,4-butanediol			1:3
		1,4-butanediol			1:4
		1,6-hexanediol			1:1
		1,6-hexanediol			1:2
		1,6-hexanediol			1:3
		1,6-hexanediol			1:4
		Glicerol	Dioles/alcoholes		1:1
		Glicerol			1:2
		Glicerol			1:3
		Glicerol			1:4
		Etilenglicol			1:1
		Etilenglicol			1:2
		Etilenglicol			1:3
		Etilenglicol			1:4

8.5 Evaluación Físicoquímica y Espectroscópica de los DES Sintetizados

8.5.1 pH

Se determinó el pH de los DES mediante un potenciómetro marca Hanna modelo HI 2211.

8.5.2 Densidad

La densidad se determinó a 20 °C siguiendo la fórmula universal de la densidad $\rho = m/v$. Se realizó en un matraz aforado (a peso constante). Los resultados se expresaron g/cm^3 (Che Zain *et al.*, 2021).

8.5.3 Viscosidad

La viscosidad se determinó a 20 °C en un viscosímetro Brookfield DV-II Plus, se usó el spindle número 2, evaluando a 100, 150 y 200 rpm. Todas las determinaciones se realizaron con un porcentaje de torque del equipo de entre 20 a 80 %. Solo se determinaron los DES hechos con ChCl/ácido levulínico 1:1 molar, ChCl/1,4 butanediol 1:1 molar, ChCl/glicerol 1:1, 1:4 molar y ChCl/1,6 hexanediol 1:1, 1:4 molar. Se expresó la viscosidad en mPa.s (Abbott *et al.*, 2004).

8.5.4 Conductividad Eléctrica

La conductividad eléctrica de los DES se evaluó mediante un conductímetro TDS&CD; las lecturas se realizaron a 20 °C. Se expresaron las lecturas como $\mu\text{S/cm}$ (Zannou y Koca, 2022).

8.5.5 Miscibilidad

La miscibilidad se realizó siguiendo el método descrito por Shafie *et al.*, (2019). Se mezclaron en un tubo de ensaye 2 mL de DES con 2 mL del solvente a evaluar: hexano, acetato de etilo, diclorometano, acetona, metanol, etanol y agua (por separado). Ambos se mantuvieron a 20 °C. Se agitó con vortex durante 30 seg y se observó la miscibilidad o separación de fases de ambos. Se reportó como M (miscible) y NM (no miscible).

8.5.6 Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

Se obtuvieron los espectros de infrarrojo mediante transformada de Fourier, con un equipo Perkin Elmer Spectrum Two USA. El método usado fue reflectancia total atenuada (ATR), se obtuvieron las señales de 4,000 a 600 cm^{-1} (Wang *et al.*, 2021).

8.5.7 Análisis Estadístico

Los resultados se contrastaron mediante una prueba ANOVA de dos factores (tipo de HBD y proporción molar), totalmente al azar con seis y cuatro niveles, respectivamente. Los análisis se realizaron por triplicado. Las medias se compararon mediante una prueba de Tukey al <0.05 de significancia, mediante el software Minitab 18®.

8.6 Extracción de Flavonoides Totales, Luteolina 7-*O*-glicósido y Quercetina 3-*O*-ramnósido para Seleccionar el HBD (Etapa III)

La extracción para la etapa preliminar consistió en evaluar las variables a estudiar durante la

optimización, las cuales fueron relación sólido líquido (55 mg/mL), tiempo (14 min), amplitud (60 %), pulsos (35 seg de trabajo) y temperatura (40 °C). Se sometieron las muestras a una extracción en un sonicador de sonda marca Sonics & Materials (USA) modelo Vibracell VC 505, 500 W de potencia y 20 kHz de frecuencia, se usó una sonda de 1/2 pulgada.

Seguido de la extracción, los extractos se centrifugaron a 10,000 rpm, durante 15 min y se recuperó el sobrenadante para las determinaciones subsecuentes. Se hicieron extractos control con EtOH al 80 %, MeOH al 80 % y agua.

8.6.1 Cuantificación de Flavonoides Totales

Se determinaron mediante el método descrito por Ghasemi *et al.*, (2009) el cual consistió en agregar en una microplaca de 96 pocillos, 10 µL de los extractos, seguido de 250 µL de agua destilada, 10 µL de AlCl₃ al 10 % y 10 µL de CH₃CO₂K 1M. Se dejó incubar durante 30 min y se leyó la absorbancia a 415 nm mediante un lector de microplacas Synergy HT (Biotek, Inc, EUA). Se usó como blanco EtOH al 80 % y se elaboró una curva estándar de quercetina de 0 a 1.0 mg/mL. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina por g de muestra seca.

8.6.2 Cuantificación de Luteolina 7-O-glicósido y Quercetina 3-O-ramnósido

Se adquirieron los estándares cromatográficos de Sigma-Aldrich/Merck (USA). Se disolvieron en metanol grado cromatográfico. Se prepararon soluciones stock de 1 mg/mL para luteolina 7-O-glicósido y 1.82 mg/mL de quercetina 3-O-ramnósido. Posteriormente se prepararon soluciones stock intermedias con fase móvil (A: formiato de amonio 5mM ajustado a pH 3 en agua y B: metanol y 0.1 % de ácido fórmico) ajustando la concentración a 50 ng/µL y 10.1920 ng/µL. Se preparó una dilución intermedia 2, ajustando las concentraciones a 5 ng/µL y 1.02 ng/µL para elaborar los puntos de la curva de calibración que correspondieron a N1 (50 ng/mL), N2 (100 ng/mL), N3 (250 ng/mL), N4 (500 ng/mL), N5 (2500 ng/mL) y N6 (5000 ng/mL) para luteolina 7-

O-glicósido. Para quercetina 3-*O*-ramnósido, las concentraciones fueron N1 (10.19 ng/mL), N2 (20.38 ng/mL), N3 (50.96 ng/mL), N4 (101.92 ng/mL), N5 (509.60 ng/mL) y N6 (1019.20 ng/mL). La cuantificación se realizó en un cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) Acquity serie H Waters, con una columna BEH C18 de 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm, inyectando un volumen de 5.0 μ L. Se usaron como fase móvil A) formiato de amonio 5mM ajustado a pH 3 y B) metanol acidificado con 0.1 % de formiato de amonio. Se ajustó el flujo a 0.35 mL/min y la separación cromatográfica fue por gradiente empezando con 83 y 17 %, para A y B, respectivamente. Al minuto 5.50 se cambió a 10 y 90 %, al minuto 7.50 10 y 90 %, al minuto 7.51 se modificaron a 83 y 17 % y al minuto 10 se mantuvo a 83 y 17 %, respectivamente.

La identificación se efectuó en un espectrómetro de masas XEVO-TQ-S Waters, usando la estación de trabajo MassLynx. Los iones fueron monitoreados usando el monitoreo de reacción múltiple para al menos dos transiciones (ion "padre" e ión "hija"). Se usó como técnica de fragmentación la ionización por electrospray (ESI), utilizando el modo positivo para la quercetina 3-*O*-ramnósido y el modo negativo para la luteolina 7-*O*-glicósido. Se monitorearon el ion precursor para quercetina 3-*O*-ramnósido 448.97 m/z y sus iones producto; 85.21 m/z y 303.24 m/z, ambos a 0.025 Dwell (s), 6 V del cono y eV de colisión 20 y 10, respectivamente. Mientras que para luteolina 7-*O*-glicósido el ion precursor fue 447 m/z y sus iones producto fueron 256 y 285 m/z, ambos con 0.025 Dwell (s), 42 V de cono, 40 de colisión (eV) y 25, respectivamente.

8.6.3 Análisis Estadístico

Los resultados se contrastaron mediante una prueba ANOVA de tres factores, con seis, uno y cuatro niveles, respectivamente. Los análisis se realizaron por triplicado. Las medias se compararon mediante una prueba de Tukey al <0.05 de significancia, mediante el software Minitab 18[®]. Los análisis de cuantificación por UPLC-ESI-MS/MS solo se efectuaron una vez por ende no se pudieron contrastar estadísticamente.

8.7 Optimización del Proceso de Extracción de Flavonoides Totales, Luteolina-7-*O*-glicósido y Quercetina 3-*O*-ramnósido (Etapa IV)

Se realizó el proceso de optimización de flavonoides totales, luteolina-7-*O*-glicósido y quercetina 3-*O*-ramnósido. Para esto se llevó a cabo un diseño central compuesto rotatable, mediante la metodología de superficie de respuesta, la cual se llevó a cabo en el software Minitab 18®.

Las variables de proceso fueron el tiempo (seg) y la potencia de ultrasonificación (Watts). Las variables fijas del proceso fueron la relación sólido líquido 50 mg/mL, el porcentaje de agua incluido en la síntesis de DES (30 %), el tipo de DES seleccionado (ChCl/1,6-Hexanediol 1:1 molar) y la temperatura 50 °C. Las variables de respuesta a optimizar fueron los dos flavonoides glicosilados antes mencionados y los flavonoides totales. Los resultados se expresaron como µg/g de BS y flavonoides totales expresados como mg equivalentes de quercetina /g de BS. En el cuadro 9 se plasman las variables a estudiar con sus respectivos niveles.

Cuadro 9. Diseño central compuesto rotatable con variables codificadas y naturales

Orden de corrida	Tipo de punto	Tiempo (seg)	Potencia (%)
1	1	-1.00000 (15)	-1.00000 (35)
2	1	1.00000 (65)	-1.00000 (35)
3	1	-1.00000 (15)	1.00000 (85)
4	1	1.00000 (65)	1.00000 (85)
5	-1	-1.41421 (4)	0.00000 (60)
6	-1	1.41421 (75)	0.00000 (60)
7	-1	0.00000 (40)	-1.41421 (24)
8	-1	0.00000 (40)	1.41421 (95)
9	0	0.00000 (40)	0.00000 (60)
10	0	0.00000 (40)	0.00000 (60)
11	0	0.00000 (40)	0.00000 (60)
12	0	0.00000 (40)	0.00000 (60)
13	0	0.00000 (40)	0.00000 (60)

Una vez que se realizaron las 13 evaluaciones, los datos se ingresaron al programa Minitab 18 para optimizar-maximizar las variables y obtener las condiciones óptimas de proceso. Se replicó el experimento bajo esas condiciones tres veces, y los datos se contrastaron con los predictivos. Para

comparar los resultados del extracto optimizado con DES y con extractos hidroetanólicos, se realizó un análisis ANOVA y una comparación de medias mediante la prueba de Tukey al <0.05 de significancia.

8.8 Evaluación Antioxidante *in vitro* del Extracto Pptimizado (Etapa V)

Se evaluó la capacidad antioxidante del extracto optimizado y del extracto hidroetanólico 80 %, a manera de comparación. Para esto se emplearon métodos basados en la transferencia de electrones y protones

8.8.1 ABTS

Se preparó una solución stock de ABTS 7.4 mM y una solución stock de persulfato de potasio 2.6 mM, ambas se mezclaron en volúmenes iguales y se dejaron en reposo, protegidas de la luz, a temperatura ambiente durante 16 h. De esta mezcla se elaboró la solución de trabajo la cual consistió en diluir con EtOH absoluto para obtener una absorbancia de 0.7-1.0 a 734 nm. Se preparó una solución stock de Trolox 1mM, con la cual se elaboró una curva de calibración de 0.1 a 1.0 mM equivalentes de Trolox. Para el ensayo se depositaron 10 μ L del blanco, curva de calibración y muestra en una microplaca de 96 pocillos, seguido se añadieron 190 μ L del radical ABTS, se dejó reaccionar durante 2 h a 20 °C, cubierto de la luz. Una vez transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro (Thaipong *et al.*, 2006).

8.8.2 DPPH

Se preparó una solución de DPPH 100 μ M y una solución stock de Trolox 1mM. Se preparó una curva de calibración de 0.1 a 1.0 mM de Trolox. Para el ensayo se depositaron 10 μ L del blanco,

curva de calibración y muestra en una microplaca de 96 pocillos, seguido se añadieron 190 μL del radical DPPH, se dejó reaccionar durante 30 min a 20 $^{\circ}\text{C}$, cubierto de la luz. Una vez transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Karadag *et al.*, 2009).

8.8.3 ORAC

Se preparó un buffer de fosfatos 75 mM ajustado a pH 7.4, una solución de fluoresceína 22.5 mg/mL en buffer de fosfatos (solución stock), de la cual se tomaron 100 μL y se aforó a 10 mL con el buffer de fosfatos (solución intermedia). De esta última solución se tomaron 400 μL y se aforaron a 25 mL con buffer de fosfatos (solución de trabajo). Se preparó una solución de AAPH 2.6 mg/mL con buffer de fosfatos y una curva de calibración de Trolox 400 μM . En una microplaca de fondo oscuro se depositaron 230 μL de agua destilada en las filas y columnas externas esto para tratar de mantener los pocillos de adentro a una temperatura estable. Posteriormente se depositaron 25 μL de blanco, curva de calibración y muestra. Previamente se depositaron en el equipo la solución de trabajo de fluoresceína y de AAPH para ser dispensados automáticamente. Se colocó la placa dentro del lector de microplacas a una temperatura de 37 $^{\circ}\text{C}$ y se procedió a realizar el experimento el equipo dispensó de 150 μL fluoresceína y de AAPH 50 μL y tomó lecturas durante 70 min con intervalos de 60 seg con una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 580 nm (Huang *et al.*, 2002).

8.8.4 FRAP

Se preparó un buffer de acetato 400 mM acidificado con ácido acético glacial. Se preparó una solución de TPTZ 30 mM, una solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 60 mM, una solución stock de Trolox 1mM para elaborar una curva de calibración de 0.1 a 1.0 mM. El reactivo FRAP se elaboró previo al experimento, mezclando 10 mL de buffer de acetato, 1 mL de la solución de TPTZ 30 mM y 1 mL de la solución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 60 mM, se agitó con vortex y se procedió a realizar el ensayo. Se

tomaron 30 μL del blanco, curva de calibración y muestra y se depositaron en una placa de 96 pocillos, posteriormente se les adicionó 110 μL del reactivo FRAP. Se dejó reaccionar durante 4 min a 20 °C, con ausencia de luz. Una vez transcurrido el tiempo se leyó a una absorbancia de 593 nm (Ghasemzadeh *et al.*, 2012).

8.8.5 Análisis Estadístico

Los resultados se contrastaron mediante un ANOVA de un factor con dos niveles. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Las medias se compararon mediante prueba de Tukey al <0.05 de significancia.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Identificación de Fitoquímicos de Biomasa de Pimiento Morrón (Etapa I)

9.1.1 Tamizaje Fitoquímico

Comúnmente el tamizaje fitoquímico o marcha fitoquímica es un conjunto de técnicas colorimétricas preliminares las cuales sirven para orientar el curso de la investigación fitoquímica. Estos resultados preliminares ayudan a conocer la naturaleza química de los componentes en plantas medicinales o productos vegetales además son económicos y fáciles de realizar, por lo que su uso data desde varias décadas atrás.

En el Cuadro 10, se aprecian los resultados del tamizaje fitoquímico, donde se puede observar la abundancia de compuestos fenólicos como flavonoides y taninos, esteroides, antraquinonas, cumarinas, quinonas, saponinas, y presencia de alcaloides, principalmente en el extracto metanólico, debido a la polaridad de los compuestos y del disolvente. Por lo que extractos de tipo polar como etanólicos, metanólicos, acuosos podrían ser de mayor utilidad que los apolares, esto por la abundancia de metabolitos identificados. A nuestro conocimiento este es el primer trabajo donde se muestra el tamizaje fitoquímico de biomasa agrícola de pimiento morrón no comestible (combinación de hojas y tallos).

Una revisión elaborada por Carvalho Lemos *et al.* (2019), menciona la presencia de flavonoides glicosilados en hojas y tallos de chiles, en particular estos últimos resaltan por su presencia en frutos de chiles siendo la luteolina y apigenina los más concurrentes. Hojas de chiles de origen coreano de variedad no especificada arrojaron cantidades significativas de diferentes glicósidos de luteolina y quercetina (Cho *et al.*, 2020), concordando con lo arrojado por el tamizaje fitoquímico. Por otro lado, estudios realizados en hojas de chile habanero originario de México arrojaron una gran diversidad de flavonoides glicosilados principalmente derivados de la luteolina y apigenina (Herrera-Pool *et al.*, 2021). Hojas de chiles bell pepper variedad Mazurka originario de Holanda, presentaron flavonoides principalmente el graveobiosido A, cinarósido, apin y apigetrina (Genzel *et al.*, 2021).

Respecto a la alta presencia de terpenos, era de esperarse puesto que estos metabolitos son los más abundantes en la naturaleza, además de que por el supuesto estrés al que estaban sometidas las plantas, se esperaba un incremento de estos. Sin embargo, el extracto que más abundancia presentó fue el hexánico por la afinidad de terpenos con su polaridad (hidrofóbicos) (Boncan *et al.*, 2020). Prokopenko *et al.*, (2013), identificaron algunos compuestos lipofílicos de hojas y tallos de *C. annuum* (variedad no especificada, origen ruso), donde resaltó la presencia de ácidos grasos como el palmítico y linoleico, hidrocarbonados como el neofitadieno, untriacontano, escualeno y fitoesteroles como el tocoferol, stigmasterol y campesterol.

Algunas otras investigaciones han efectuado el tamizaje en otras especies/variedades de *Capsicum*. Prabakaran *et al.*, (2017) identificaron mediante HPTLC flavonoides (quercetina) en fruto de pimiento morrón, esto en extractos orgánicos como hexano, cloroformo, acetato de etilo y etanol. También identificaron algunos tetraterpenos como el licopeno. Así mismo Tankeo *et al.* (2014), identificaron alcaloides, antraquinonas, saponinas, esteroides, taninos y triterpenos de frutos de *C. annuum* variedad no especificada. Igualmente (Noumedem *et al.*, 2013), analizaron frutos de *C. frutescens*, identificando presencia de alcaloides, fenoles, terpenos, flavonoides y antraquinonas. Otros compuestos de relevancia bioactiva son las saponinas y alcaloides los cuales se encuentran presentes en el extracto metanólico de la biomasa de pimiento morrón. De Lucca *et al.* (2002) y de Lucca *et al.* (2006), demostraron la actividad fungicida de saponinas esteroidales presentes en frutos de chile cayenne (*C. frutescens*). Un par de años más tarde su publicó la actividad contra *Microsporum* y *trichophyton* de la saponina CAY-1 aislada de este mismo chile (Stergiopoulou *et al.*, 2008).

En semillas de chile *C. annuum* var *acuminatum* se identificaron las saponinas de tipo furanostanol denominadas capsicósido E, F y G, las cuales presentaron actividad antifúngica e inhibidora de levaduras. Esto, debido a la presencia de oligosacáridos unidos a la aglicona de la saponina, además del grupo metilo del radical 3 y el grupo hidroxilo del carbono C2 (Iorizzi *et al.*, 2002). Se ha identificado la saponina capsicósido G de semillas de chile *C. annuum* la cual tuvo un efecto supresor de adipogenesis *in vitro* (células 3T3-L1), por lo que podría tener potencial para tratar la obesidad (Sung *et al.*, 2016). Tamizajes fitoquímicos de hojas de *C. frutescens* mostraron presencia de saponinas, taninos, alcaloides, glicósidos y esteroides en extractos metanólicos, concordando con lo mostrado en el cuadro 9 (Vinayaka *et al.*, 2010).

Cuadro 10. Tamizaje fitoquímico de biomasa de pimiento morrón

Metabolitos	Ensayo	Extractos		
		Hexano	DCM	Metanol
Taninos	FeCl ₃	-	-	+++
	Gelatina-NaCl	-	-	+++
Flavonoides	Shinoda	-	-	+++
	FeCl ₃	-	-	+++
	H ₂ SO ₄	-	-	+++
	NaOH	-	-	+++
Saponinas	Agitación	-	-	+++
Terpenos y esteroides	Liebermann-Buchard	+++	+++	+++
	Salkowski	+++	+++	+++
Esteroides	H ₂ SO ₄	+++	+++	+++
Glicosidos (cardiacos, antraquinonas)	Borntrager's	-	-	-
	Keller killiani	+	+	+++
	H ₂ SO ₄	+	+	+++
Alcaloides	Wagner	-	-	+
	Mayer	-	-	+
	Dragendorff	-	-	+
Cumarinas	NaOH	-	-	+++
Quinonas	NaOH	-	-	+++
	H ₂ SO ₄	+	+++	+++

(Negativo -; Dudoso (+/-); Positivo (+); Abundante (+++))

En cuanto a la presencia de alcaloides, es bien sabido que la capsaicina y sus derivados solo se encuentran presentes en especies del género *Capsicum*, sin embargo, se limita su presencia en especies picantes (la capsaicina es el compuesto responsable de su pungencia). Aunque según el tamizaje fitoquímico, en las tres técnicas evaluadas el resultado fue positivo con presencia de alcaloides. Algunas otras investigaciones han mostrado un contenido de capsaicinoides en otros órganos vegetativos de Chile no solo en la placenta, semillas y vesículas, sino en tallos y hojas. Por ejemplo, se han cuantificado capsaicina y dihidrocapsaicina en tallos y hojas de Chile Padrón de origen español, reportando hasta 27.28 µg/g de dihidrocapsaicina en las hojas, mientras que de capsaicina el contenido mayor reportado fue igualmente en hojas con 19.99 µg/g (Estrada *et al.*, 2002). Sin embargo, comunicaciones personales no publicadas demostraron que la biomasa no contiene capsaicina o dihidrocapsaicina, probablemente contenga mínimas cantidades de homocapsaicina, debido a esto la evaluación colorimétrica pudo resultar positiva.

9.1.2 Identificación de Compuestos Orgánicos Volátiles Mediante GC/MS

Con la finalidad de indagar acerca de los metabolitos presentes en la biomasa de pimiento morrón se llevó a cabo un análisis de compuestos volátiles esto mediante cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Se evaluaron dos tipos de extracto de acetonitrilo y metanol, en el Cuadro 11 se plasman los compuestos identificados. Cabe mencionar que los porcentajes de similitud entre mayores sean mayor probabilidad de que efectivamente sea el compuesto en cuestión. Sin embargo para corroborar dicha información es necesario contar con los estándares cromatográficos. Sin embargo, este barrido de compuestos brinda un primer acercamiento cualitativo a los metabolitos que potencialmente pueden estar presentes en la biomasa de pimiento morrón.

El acetonitrilo es un disolvente de polaridad media capaz de solubilizar metabolitos apolares y polares. Como se muestra en el Cuadro 10, los compuestos identificados pertenecen al grupo de aldehídos, cetonas, alcoholes, terpenos, carotenoides, esteroides y ácidos grasos, por mencionar algunos. De estos, resaltan por sus aplicaciones biológicas el ácido oleico, eicosanoico, acetato de serverogenina, 3,4 dicloroatropina, atropina, O-bromoatropina, rhodopin, escualeno, tocoferol y beta sitoesterol, sin embargo, el porcentaje de similitud de dichos compuestos es menor al 50 %.

Por otro lado, en el extracto metanólico, el cual es un solvente polar de tipo prótico, se identificaron compuestos de interés farmacológico, como el fitol, O-bromoatropina, 3,4-dicloroatropina, fluoroatropina, rhodopin, ácidos grasos como el hexadecanoico, octadecanoico, esteroides como el escualeno, beta sitoesterol, gama sitoesterol, campesterol, stigmasterol, beta amirina, vitaminas liposolubles como la gama tocoferol, beta tocoferol, y triterpenos como el lupeol.

Cuadro 11. Compuestos orgánicos volátiles presentes en la biomasa de pimiento morrón

Extracto	Compuestos	TR	PM	% Similitud
Acetonitrilo	8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol, 8-metil-,endo-	8.48	141	89.41
	2-metoxi-4-vinilfenol	9.47	150	60.70
	Fenol, 2,6-dimetoxi	9.80	154	50.69
	1-(3,6,6-trimetil-1,6,7,7-tetrahidrocliclopenta[c]piran-1-yl)etanona	10.148	206	49.76
	Fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil)-	10.99	206	28.36

	2(4H)-Benzofuranona, 5,6,7,7a-tetrahidro-4,4,7a-trimetil-, (R)	11.35	180	50.13
	3-tert-butil-4-hidroxianisol	11.52	180	53.21
	10-Metil-8-tetradecen-1-ol acetato	12.66	268	29.58
	2-hexadecanol	26.75	242	20.67
	1-2-[3-(2-Acetiloxirano-2-yl)-1,1-dimetilpropil]cicloprop-2-eniletanona	12.91	236	66.54
	2-Naftalenol, 4-etil-3-etil-3-etilideno-1,2,3,4-tetrahidro-1,1,4- trimetil-	13.46	244	60.52
	4-((1E)-3-Hidroxi-1-propenil)-2-metoxifenol	13.76	180	65.59
	Oxirano-hexadecilo-	15.34	268	16.57
	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	16.13	296	31.31
	Fitol	21.270	296	52.29
	I-Norvalina, N-(2-metoxietoxicarbonil)-, eptil ester	21.67	317	15.82
	Metil 8,11,14,17-eicosatetraenoato	21.8	318	29.61
	Ácido oleíco	24.93	282	29.43
	Ácido eicosanoico	24.95	312	20.53
	Serverogenina acetato	25.217	544	30.77
	Ácido eicosanoico ester de metilo	25.49	326	51.45
	2H-Piran-2-1, tetrahidro-6-nonil-	25.891	226	52.22
	Trifenil fosfato	26.90	326	42.14
	3,4-dicloroatropina	27.17	357	11.75
	Atropina	27.17	357	5.72
	O-bromoatropina	27.18	367	38.97
	Rodofina	32.13	554	18.79
	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	34.92	296	28.94
	Escualeno	35.34	410	23.50
	Colest-2-eno[2,3-b]indol,1'-acetil-6'-metoxi-	37.32	531	63.99
	γ-tocopherol	38.991	416	73.21
	3,8,12-Tri-O-acetoxi-7-desoxingnol-7-1	39.78	490	58.78
	Campesterol	42.40	400	43.52
	β-sitoesterol	43.581	414	46.41
Metanólico	9,12,15-ácido octadecatrienoico, metil ester (Z,Z,Z)	21.05	292	21.48
	Fitol	21.24	296	32.10
	Ácido heptadecanoico, 16-metil-, metil ester	21.62	298	53.32
	O-bromoatropina	27.17	367	17.53
	3,4-dicloroatropina	27.23	357	35.73
	Fluoroatroprina	27.25	307	11.74
	3,9-Epoxipregn-16-en-20-1, 3-metoxi-7,11,18-triacetoxi-	27.27	518	46.30
	Rodofina	27.32	554	30.32
	Glicerol 1-palmitato	29.74	330	39.49
	Ácido hexadecanoico, 2-hidroxi-1-(hidroximetil)etil ester	29.83	330	55.93
	Ácido octadecanoico, 2,3-dihidropripel ester	34.30	358	31.02
	Escualeno	35.31	410	26.41
	γ-tocoferol	38.96	416	61.72

β -tocoferol	38.71	416	26.85
β - sitosterol acetate	39.62	456	39.62
β -sitosterol	43.54	414	48.38
γ -sitosterol	43.57	414	52.94
26-Nor-5-cholesten-3-beta-ol-25-one	40.22	386	24.44
Campesterol	42.35	400	36.19
Stigmasterol	42.72	412	73.82
β -amirina	44.15	426	14.19
Stigmasterol-7-en-3-ol, (3 β , 5 α , 24S)	44.40	414	54.56
9,19-ciclolanost-24-en-3-ol, acetato	44.71	468	25.44
Lupeol	44.89	426	18.99
D-B-Friedo-B':A'neogammacer-5-en-3-ol, (3 β)-	45.08	426	60.42

TR (Tiempo de retención); PM (peso molecular).

Pocas investigaciones se han enfocado en el estudio de metabolitos de biomásas de chiles, sin embargo, resaltan algunas donde se identificaron esteroides como el campesterol, stigmasterol y beta sitoesterol, y ácidos grasos como el mirístico, palmítoleico, palmítico, margárico, esteárico y araquidónico en semillas de bell pepper (Gurnani *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2013). En hojas y frutos se han identificado diferentes tipos de carotenoides (frutos), diacil gliceroides, amidas de ácidos grasos esteroides y esteroides (hojas) (Barrajón-Catalán *et al.*, 2020). Frutos de 5 variedades de chiles de origen europeo presentaron una gran diversidad de metabolitos apolares, como carotenoides, esteroides, ácidos grasos, terpenos, vitaminas liposolubles, cerebrósidos, capsaicinoides; cabe mencionar que los autores emplearon LC por lo que lograron identificar y cuantificar un mayor número de compuestos (Bijttebier *et al.*, 2014).

Nuestra investigación concuerda con lo reportado por Prokopenko *et al.*, (2013) donde identificaron en hojas y tallos de chile de origen ucraniano (variedad no especificada), ácidos grasos como el mirístico, palmítico, esteárico, oleico y linoleico, así como compuestos hidrocarbonados como el escualeno, alcoholes como el fitol y fitoesteroides como el tocoferol, campesterol, gama sitoesterol y stigmasterol.

En cuanto al contenido de esteroides presentes en la biomasa de pimiento morrón, esto se debe a que estos compuestos cumplen una funcionalidad importante en las células vegetales. Son compuestos que integran la membrana celular, además de que contribuyen al mantenimiento e integridad de la misma, ayudan a su fluidez y a la permeabilidad, y por ende coadyuvan a la resistencia al estrés que las plantas pueden sufrir. También los esteroides participan en la formación de balsas lipídicas las cuales establecen la polaridad celular, participan en la señalización y en la interacción con

patógenos, por lo que están involucrados con el desarrollo y crecimiento desde la germinación de la semilla, fenotipado, senescencia, floración y rendimiento de semillas en cultivos comerciales (Du *et al.*, 2022).

En la presente investigación como se trata de una biomasa agrícola la cual fue sometida a estrés hídrico, falta de nutrimentos y radiación UV, se ha reportado que bajo estas condiciones se produce una sobre expresión de esteroides los cuales coadyuvan a la supervivencia de las plantas en particular el stigmasterol, campesterol y beta sitoesterol (Du *et al.*, 2022). También los esteroides pueden servir de sustrato para la biosíntesis de otros metabolitos como los alcaloides y saponinas, los cuales se encuentran presentes en la biomasa de pimiento morrón (Piironen *et al.*, 2000).

De manera parecida, los ácidos grasos son fundamentales para el mantenimiento de la membrana celular, ya que bajo estrés estos compuestos actúan reparando la fluidez de la membrana, también modulan la expresión de genes de defensa (Upchurch, 2008). Por otro lado, es bien sabido que los lípidos son los componentes mayoritarios de las membranas celulares, siendo los ácidos grasos los que se encuentran en mayor proporción; estos participan en la modulación del metabolismo de las células. Los ácidos grasos se sintetizan en los cloroplastos, uniéndose al grupo hidroxilo del glicerol (Kim, 2020).

9.2 Evaluación Físicoquímica y Espectroscópica de los DES Sintetizados (Etapa II)

Se sintetizaron los DES siguiendo el método de Santana *et al.*, (2019), el cual consistió en someter los componentes del DES a ondas ultrasónicas, hasta formación de una mezcla homogénea. Este método además de ser eficaz en cuanto a la formación de los enlaces de hidrógeno entre los HBA y HBD, es rápido en comparación con los métodos convencionales como calentamiento en horno o baño, por lo que el gasto energético es menor. No se han identificado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la densidad y viscosidad de los DES entre la síntesis por calentamiento-agitación, ultrasonicación y por microondas (Santana *et al.*, 2019). A continuación se muestran los resultados de los análisis físicoquímicos efectuados a los DES, estas características influyen directamente en la capacidad de extracción de fitoquímicos por lo que es de relevancia su evaluación (Mohd Fuad *et al.*, 2021).

9.2.1 pH

En la Figura 13 se muestra la gráfica con los pH de los DES evaluados en el presente estudio. Como era de esperarse los DES elaborados con ácidos carboxílicos presentaron un pH ácido <2 , en particular los DES con ácido láctico debido a la naturaleza del mismo. Los DES elaborados con dioles fueron muy similares entre sí, sin embargo, según la prueba de Tukey <0.05 se observaron diferencias estadísticamente significativas; los DES basados en ChCl como HBA y con 1,4 butanediol (1:1, 1:4 molar respectivamente), 1,6 hexanediol (1:4, y 1:3) molar presentaron diferencias significativas, mientras que los elaborados con glicerol y etilenglicol compartieron medias (<0.05).

La acidez de los DES juega un papel importante en la extracción de fenoles ligados. Se ha observado que DES con pH bajos hidrolizan los enlaces presentes entre el fitoquímico y el polímero al que se encuentre unido, esto debido a la acidez lo que provoca un rompimiento de enlaces, a menudo vía hidrólisis. Por otro lado la acidez ayuda a la extracción de compuestos glicosilados y ácidos fenólicos como el ácido rosmarínico, paeonol, siringaresinol, eriodictol, ácido gálico, vanílico, ferúlico y *p* cumárico (Santos *et al.*, 2021). Algunos flavonoides son afines a disolventes con pH ácidos como la isorametina y quercitrina, mientras que taninos y ácidos fenólicos se encuentran con mayor proporción en DES con pH básicos o neutros (Bentley *et al.*, 2020).

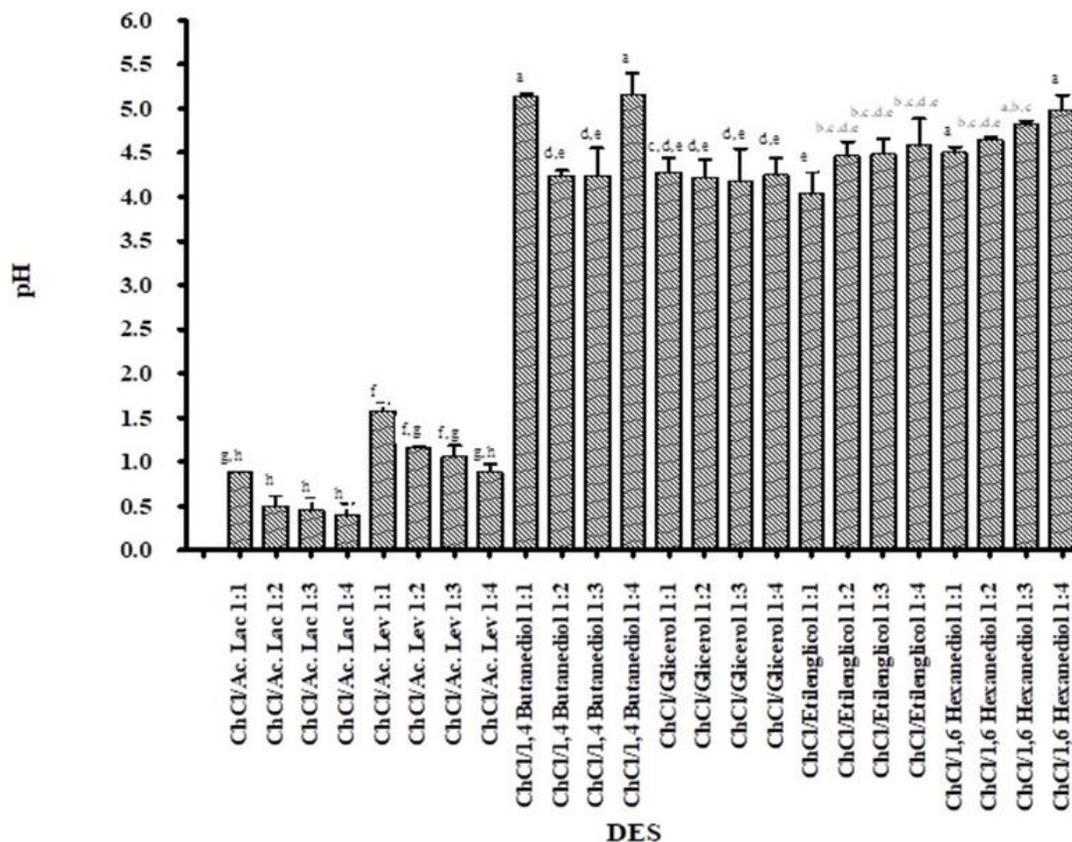


Figura 13. pH de los DES evaluados a 20 °C. Letras diferentes muestran significancia estadística ($P < 0.05$), según la prueba de Tukey. Los resultados muestran la media \pm DE de tres réplicas ($n=3$).

Nuestros resultados concuerdan con lo obtenido por Huang *et al.* (2022), donde los DES elaborados con polioles presentaron un pH de entre 5 y 6. De igual forma Macchioni *et al.*, (2021) mencionan que DES elaborados con ácido láctico y ChCl presentan un pH ácido < 2 . También concuerdan con lo mencionado por Zannou y Koca (2022), quienes reportaron un pH de 0.76 en un DES formulado con ChCl/ácido láctico 1:2 molar con 20 % de agua; en los elaborados con glicerol y 1,4 butanediol 1:2 molar obtuvo 5.36 pH, coincidiendo con nuestros resultados. Es importante mencionar que las mediciones de pH realizadas en el presente estudio fueron posibles gracias a la adición de agua (30 % peso/peso). De otro modo, la vía para realizar mediciones de pH es por métodos solvatocrómicos con moléculas orgánicas sonda (Pandey y Pandey, 2014; Dwamena y Raynie, 2020).

Xu *et al.* (2019), mencionan que el pH de los DES puede afectar las interacciones electrostáticas y la formación de enlaces de hidrógeno entre los flavonoides y el disolvente, por ende afecta la capacidad de extracción de los mismos. Esto es debido a que los flavonoides en su estructura tienen

grupos hidroxilo y fenoles con una acidez débil, es por ello que para su extracción al menos con la rutina se ha observado que DES alcalinos pueden extraer mayores cantidades. En nuestros resultados el 1,6 hexanediol al ser un poliol presentó un pH neutro-básico por lo que indica que los flavonoides glicosilados tienen una polaridad similar. Sin embargo Xu *et al.* (2019), observaron que no existe una correlación significativa entre el pH de los DES y la extracción de flavonoides polimetoxilados y glicosilados de cáscara de cítricos.

9.2.2 Densidad

Las densidades de los DES sintetizados se muestran en la Figura 14. Se puede observar que todos los DES presentaron densidades por debajo de 1.2 g/cm^3 , los DES con mayor densidad fueron los formulados con glicerol, seguido de ácido láctico, ácido levulínico, etilenglicol, 1,4 butanediol y 1,6 hexanediol. Cabe mencionar que todas las proporciones molares de este último compartieron medias, al igual que los formulados con etilenglicol, 1,4 butanediol, mientras que los formulados con ácido láctico y glicerol presentaron diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, los resultados son muy similares esto probablemente se debió al contenido de agua añadido (30 %) (Wang *et al.*, 2020).

Nuestros resultados son similares a lo reportado por Daivan *et al.*, (2013), donde las densidades de los DES elaborados con una gran diversidad de HBA y HBD oscilaron entre $1.0\text{-}1.2 \text{ g/cm}^3$. Al igual DES hechos con polioles las densidades variaron conforme su contenido de agua de entre 1.54 a 1.24 g/cm^3 (Huang *et al.*, 2022). Jablonsky *et al.* (2020), mencionan que los DES elaborados con ChCl, ácido láctico y dioles con un reducido % de agua (<10 %), presentan densidades ligeramente por arriba de la densidad del agua, observando que a medida que la temperatura de evaluación se incrementa, la densidad decrece. Sin embargo sus resultados a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ son muy similares a los mostrados en este trabajo (Figura 16). También Che Zain *et al.* (2021) formularon algunas mezclas de DES con dioles y ácido láctico los cuales mostraron densidades de 1.05 a 1.30 g/cm^3 lo cual corrobora nuestros resultados.

La densidad se encuentra inversamente relacionada con la conductividad ya que entre más denso sea el DES menor movimiento de los iones presentará y por ende afectará su conductividad. Sin

embargo con la adición de agua esto se puede mejorar considerablemente, ya que incrementarán los enlaces de hidrógeno disminuyendo la tensión superficial del DES, por consiguiente mejorará la atracción entre el DES con los metabolitos, ya que se facilita la formación de enlaces de hidrógeno y con ello la solvatación de los fitoquímicos (por parte de los componentes del DES en estado líquido) (Huang *et al.*, 2022).

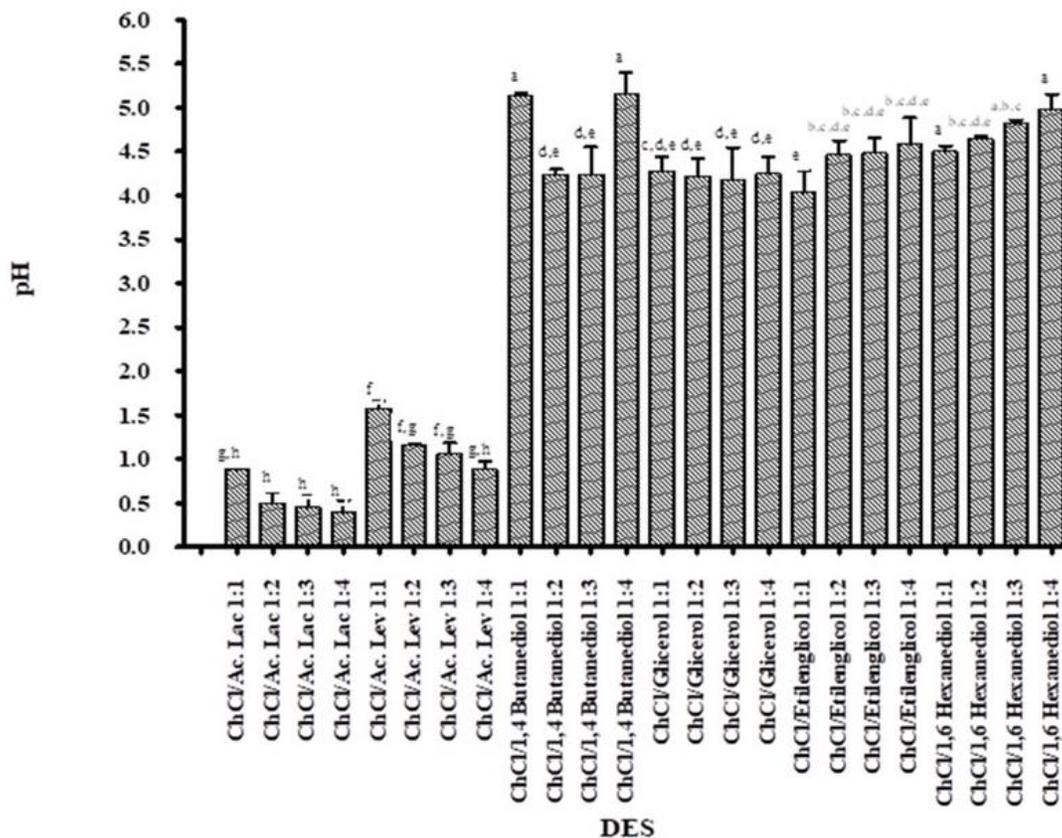


Figura 14. Densidad de los DES evaluados a 20 °C. Letras diferentes muestran significancia estadística ($P < 0.05$), según la prueba de Tukey. Los resultados muestran la media \pm DE de tres réplicas ($n=3$).

Los resultados mostrados por Zhao *et al.* (2015), concuerdan con los nuestros ya que las densidades variaron entre 1.0 y 1.2 esto de DES formulados con ChCl y etilenglicol, glicerol, 1,4 butanediol, y ácido levulínico. Bener *et al.* (2022), sintetizaron DES con 1,4 butanediol, glicerol y ácido láctico oscilaron donde las densidades fueron entre 1.0-1.2 g/cm^3 , nuestros resultados fueron similares en los HBD respectivos.

9.2.3 Viscosidad

La viscosidad está estrechamente relacionada con la densidad, la conductividad eléctrica y la temperatura a la cual los DES son evaluados. En el Cuadro 12 se presentan los resultados de las viscosidades. Cabe mencionar que solo se evaluaron cuatro HBD, en dos relaciones molares.

La viscosidad se evaluó a 20 °C y se puede observar que los DES con menor viscosidad fueron los formulados con ácido levulínico 1:1 molar, seguido de 1,4 Butanediol 1:1 molar. Así mismo, se observó que los DES formulados con glicerol presentaron un comportamiento creciente al aumentar la molaridad mostrando 86.33 mPa.s en el DES 1:4 molar, mientras que el DES 1:1 molar presentó 72.36 mPa.s; los DES elaborados con 1,6 hexanediol presentaron el mismo comportamiento creciente proporcional a la relación molar del HBD.

Cuadro 12. Viscosidad en mega pascales (mPa.s) de los DES evaluados a 20 °C

DES	mPa.s (Promedios y desviación estándar*)
ChCl/ Glicerol 1:1	72.36 ± 0.37d
ChCl/ Glicerol 1:4	86.33 ± 0.35b
ChCl/ 1,4 Butanediol 1:1	69.2 ± 0.2e
ChCl/ Ácido Levulínico 1:1	61.33 ± 0.15f
ChCl/ 1,6 Hexanediol 1:1	84.16 ± 0.20c
ChCl/ 1,6 Hexanediol 1:4	89.63 ± 0.25a

Densidad de los DES evaluados a 20 °C. Letras diferentes muestran significancia estadística ($P < 0.05$), según la prueba de Tukey. Los resultados muestran la media \pm DE de tres réplicas ($n=3$).

La viscosidad en los DES se debe a la interacción colectiva y fuerte de enlaces de hidrógeno entre el HBA y el HBD, además de las fuerzas de van der Waals presentes. La presencia de grupos hidroxilo propician la formación de más enlaces de hidrógeno adicionales, incrementando las fuerzas de atracción entre las moléculas por lo que hace al DES más viscoso, característica que le permite estabilizar compuestos fenólicos, previniendo su degradación (Moni Bottu *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2015). En el presente estudio la adición del 30 % de agua al DES provocó que la viscosidad se redujera considerablemente, sin embargo no fue lo suficiente para provocar una ruptura o daño en los enlaces supramoleculares. De hecho diversos autores mencionan que una concentración de 30 % de agua añadida es la óptima para la extracción de fitoquímicos (Choudhary

et al., 2021).

Dai *et al.*, (2013) menciona que uno de los inconvenientes en el uso de DES es su viscosidad, sin embargo, con la adición de agua esta se puede modificar a conveniencia. Si se desea obtener fitoquímicos de naturaleza polar se debe trabajar con DES con porcentajes de agua altos, lo que mejoraría su extracción. Nuestros resultados son similares a lo presentado por Fu *et al.*, (2021) donde evaluaron la viscosidad de ChCl/1,4 butanediol 1:2 molar (120.20 mPa.s), ChCl/ácido láctico 1:1 molar (113 mPa.s), ChCl/etilenglicol 1:2 molar (101.20 mPa.s) y ChCl/glicerol 1:2 molar (115.80 mPa.s).

Nuestros resultados concuerdan también con lo obtenido por Huang *et al.* (2022), donde obtuvieron viscosidades de 105 mPa.s en DES elaborados con polioles 1:1 molar y 35 % de agua. Así mismo concuerda con lo señalado por Jablonsky *et al.* (2020) quienes señalaron que DES elaborados con ChCl, ácido láctico y diferentes dioles con la adición de agua (<10 %), presentaron viscosidades de entre 14 a 30 mPa.s, sin embargo ellos evaluaron a 60 °C lo que provocó un descenso adicional de la viscosidad. Che Zain *et al.* (2021) mostraron DES con viscosidades de entre 7.92 a 13.1 mPa.s, esto como resultado de DES con ChCl como HBA y dioles, azúcares y ácido láctico como HBD en proporciones molares 1:4 y 1:3 con altos % de agua (> 30 %).

9.2.4 Conductividad Eléctrica

La conductividad eléctrica (CE) depende de la viscosidad que presente el DES, mientras menor sea los iones tendrán mayor capacidad de movimiento y viceversa; así mismo influye por ende la temperatura y la densidad. Los DES suelen presentar valores menores a 2 mS/cm. Como se observa en la Figura 15, la mayoría de los DES formulados presentaron valores por debajo de 2 mS/cm. De forma atípica los DES con 1,4 butanediol 1:3 y 1:4 molar, 1,6 hexanediol 1:3 y 1:4 molar presentaron conductividades de casi 10 mS/cm.

Se ha observado que la CE incrementa con la adición de agua al DES. DES hechos con ChCl/1,2 propilenglicol 1:1 molar sin agua presentó una CE de 7.16 S/m, aumentando su CE a medida que él % de agua incrementaba /con el 40 % de agua su CE fue de 30.50, sin embargo, se observó que la mejor extracción de crocinas fue con el 35 % de agua a una CE de 25.60 S/m).

Jablonsky *et al.* (2020) prepararon 24 combinaciones de HBDS con ChCl, evaluando su CE y su relación con la densidad y extracción de flavonoides de corteza de abetos. Mostraron valores de CE muy similares a lo reportadas en el presente estudio, variando de 1.59 a 3.45 mS/cm, destacando que la mayoría de los HBD fueron dioles como el 1,4 butanediol, 1,3 butanediol, 1,3 propanediol, 1,5 pentanediol, todos los DES contenían ChCl y ácido láctico en diferentes relaciones molares.

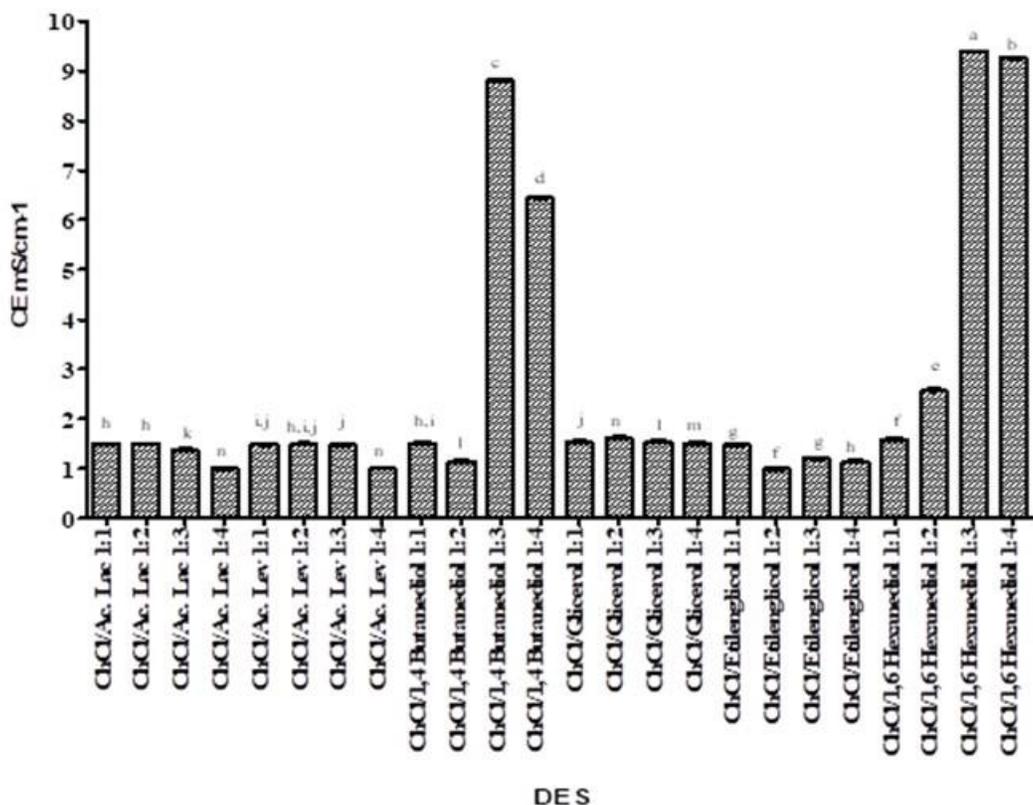


Figura 15. Conductividad eléctrica de los DES evaluados. Densidad de los DES evaluados a 20 °C. Letras diferentes muestran significancia estadística ($P < 0.05$), según la prueba de Tukey. Los resultados muestran la media \pm DE de tres réplicas ($n=3$).

Zannou y Koca, (2022) reportó CE similares a lo reportado en el presente estudio, esto en el DES sintetizado con ácido láctico 1:2 molar, sin embargo, en los DES con butanediol y glicerol difiere mínimamente (0.77 y 0.69 mS/cm). Los autores mencionan que la CE expresa que tan resistente es el movimiento de los electrones entre las moléculas, por ende, reflejan propiedades electrolíticas. Esta propiedad depende en gran medida del HBA usado en este caso el ChCl tiene una alta CE en comparación con el uso de ácidos orgánicos como HBA. Mencionan que los HBD alcoholes o

polialcoholes presentan mayor CE, seguido de los preparados con ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos.

Zhao *et al.* (2015), estudiaron la CE de DES similares a los formulados en el presente estudio (ChCl/glicerol o etilenglicol o 1,4 butanediol o ácido levulínico), de los cuales solo el etilenglicol superó la CE con 9.7 mS/cm, mientras que en nuestro estudio el 1,4 butanediol y el 1,6 hexanediol fueron los que presentaron CE similares, esto puede ser debido a la viscosidad y densidad que presentaron. Cabe mencionar que la temperatura de medición influye considerablemente incrementando de forma lineal conforme su incremento. Los autores mencionan que la relación entre la conductividad y la temperatura se debe a que al incrementar la temperatura, la frecuencia de colisión entre las moléculas aumenta por lo que las fuerzas intermoleculares se debilitan y por ende incrementa la conductividad. Así mismo la viscosidad repercute con la conductividad. Los DES con menor viscosidad tienen una mayor conductividad iónica, lo cual se puede explicar mediante la regla de Walden. Por otro lado, a menor cantidad de grupos hidroxilo se producen menos enlaces de hidrógeno, por consiguiente una mayor movilidad iónica y conductividad iónica (Zhao *et al.*, 2015).

9.2.5 Miscibilidad

En los Cuadros 13 y 14 se plasman las miscibilidades de los DES elaborados. Esta es una medida indirecta que sugiere la polaridad de los mismos. Se observó que los DES sintetizados con dioles como era de esperarse no fueron miscibles con disolventes apolares (hexano, diclorometano y acetato de etilo), esto en ninguna proporción molar. Sin embargo, los DES con ácidos carboxílicos como el láctico y levulínico fueron miscibles con el diclorometano en la proporción molar 1:4. El DES con ácido levulínico 1:4 molar, fue miscible también con acetato de etilo. Resultados similares se observaron con acetona, aunque los DES elaborados con 1,4 butanediol y 1,6 hexanediol en la molaridad 1:3 y 1:4 también fueron miscibles en esta. En cuanto a los disolventes de polaridad alta como el etanol, metanol y agua, todos fueron miscibles con los DES sintetizados en todas sus proporciones molares. El agua embebida en los DES juega un papel importante y contribuyó a su miscibilidad.

Cuadro 13. Miscibilidad de los DES evaluados en solventes orgánicos

Solvente	DES												
	ChCl/Ac. Láctico				ChCl/Ac. Levulínico				ChCl/1,4 Butanediol				
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:1	1:2	1:3	1:4	1:1	1:2	1:3	1:4	
Hx	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
DCM	nm	nm	nm	m	nm	nm	nm	m	nm	nm	nm	nm	nm
AcOEt	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	m	nm	nm	nm	nm	nm
ACE	nm	nm	nm	m	nm	nm	nm	m	nm	nm	m	m	m
MeOH	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
EtOH	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
H ₂ O	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m

Hx (hexano); DCM (diclorometano); AcOEt (acetato de etilo); ACE (acetona); MeOH (metanol), EtOH (etanol); H₂O (agua). nm= no miscible; m= miscible

Cuadro 14. Miscibilidad de los DES evaluados en solventes orgánicos

Solvente	DES												
	ChCl/Glicerol				ChCl/Etilenglicol				ChCl/1,6 Hexanediol				
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:1	1:2	1:3	1:4	1:1	1:2	1:3	1:4	
Hx	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
DCM	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
AcOEt	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
ACE	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	m	m	m
MeOH	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
EtOH	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
H ₂ O	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m

Hx (hexano); DCM (diclorometano); AcOEt (acetato de etilo); ACE (acetona); MeOH (metanol), EtOH (etanol); H₂O (agua). nm= no miscible; m= miscible

Shafie *et al.* (2019) mencionan que la medición de la miscibilidad de los DES permite evaluar la habilidad de los DES para solubilizar un soluto. Además de los cationes y aniones presentes en el cloruro de colina, existen especies no iónicas las cuales también ayudan a disolverse en amplios rangos de disolventes. Nuestros resultados sugieren que la polaridad de los DES estudiados es media-alta por ende es afín a la extracción de analitos con esta polaridad como por ejemplo flavonoides glicosilados.

9.2.6 Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

Se determinó la estructura y los grupos funcionales de los DES mediante FTIR-ATR. En los espectros se puede observar la intensidad de las señales, el tipo de bandas (grupos funcionales) y los números de onda correspondientes a las diferentes bandas mostradas. En cada uno de los espectros se muestra también el del ChCl para visualizar las nuevas interacciones H-H que forman los DES en combinación con el HBA y HBD seleccionado. En este sentido, las vibraciones arrojadas por el ChCl, van desde la señal 3200 a 623 cm^{-1} , los primeros dos picos representan al grupo hidroxilo (estiramiento) a 3200 cm^{-1} y al grupo alcano a 3000 cm^{-1} (C-H estiramiento) en la sal de amonio cuaternaria. Los picos que se observan en las señales de 1300 a 1000 representan los estiramientos C-N en la amina, una flexión C-H en el grupo alcano y un estiramiento C-O en el alcohol primario. Las últimas vibraciones que van desde 800 a 500 cm^{-1} indican la presencia del ion del cloruro.

En la Figura 16 se muestra el espectro de infrarrojo del DES sintetizado con ácido láctico en dos molaridades 1:1 y 1:4, se aprecia la conformación de grupos OH en las señal 3000 a 3500 debido a la interacción entre el nitrógeno en el grupo amino y el hidrógeno del grupo carboxilo del ácido láctico, el grupo carboxilo del ácido láctico se aprecia en la señal 1500 a 2000, se muestran estiramientos y flexiones de la señal 500 a 1500 los cuales corresponden al grupo carbonilo (C-O), O-H (flexión) y C-H (estiramiento).

En la Figura 17 se muestra el espectro de FTIR del ChCl/ácido levulínico 1:1 y 1:4 molar, se aprecia la conformación de grupos OH entre el catión del cloruro de colina y los hidrógenos del ácido levulínico (3400 cm^{-1}), el ácido levulínico presentó presencia de cetonas alifáticas 1100-1720 cm^{-1} , mientras que las bandas de 1720-1701 mostraron el grupo carbonilo. Las señales 1745-1710 y 1300-1000 refieren a un éster o una cetona. Se puede visualizar un cambio en la intensidad de la señal del grupo carbonilo entre la proporción molar 1:1 y 1:4, siendo mayor la de 1:1.

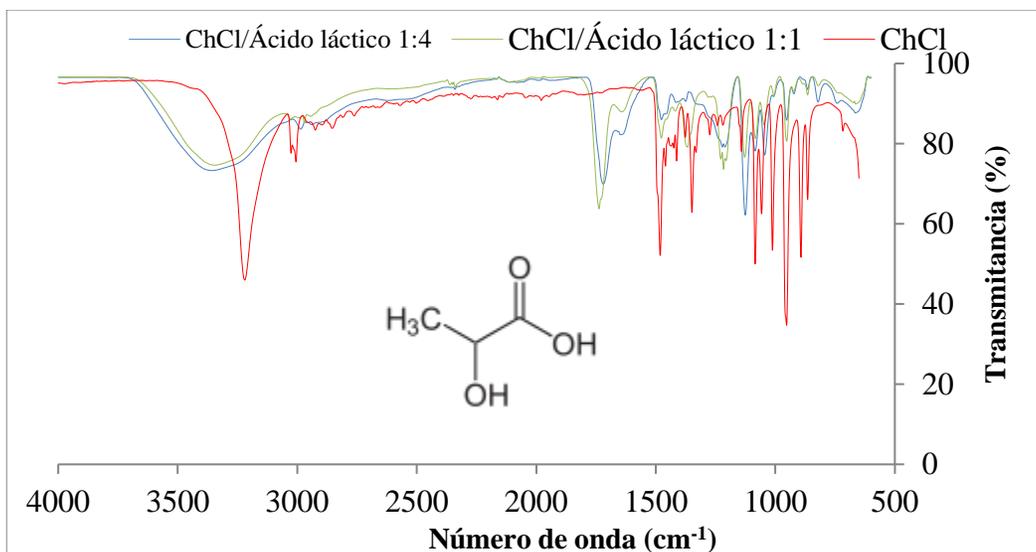


Figura 16. Espectro de infrarrojo del DES ChCl/ácido láctico 1:1 y 1:4 molar

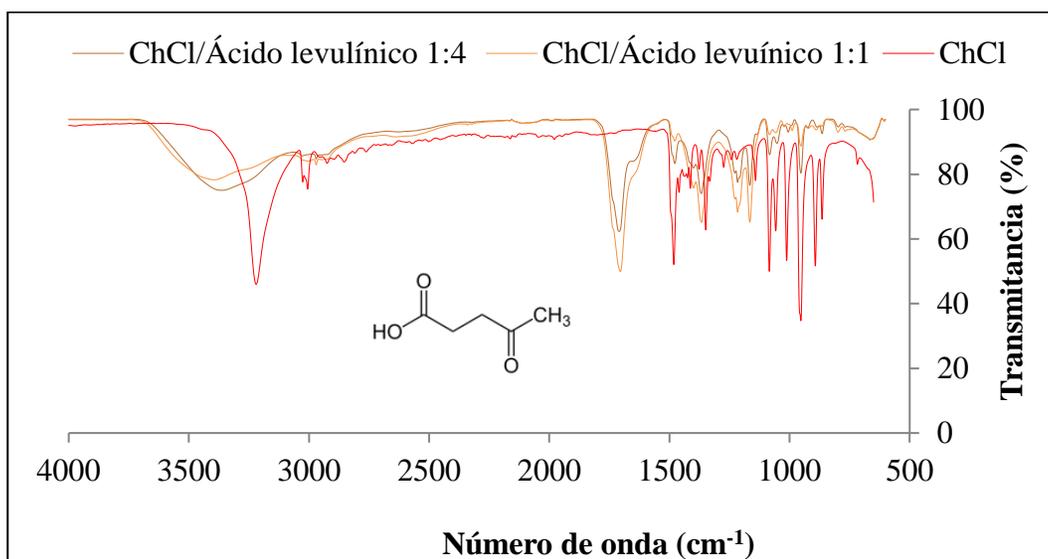


Figura 17. Espectro de infrarrojo del DES ChCl/ácido levulínico 1:1 y 1:4 molar

En la Figura 18 se muestra el espectro de infrarrojo del DES sintetizado con 1,4 butanediol, 1:1 y 1:4 molar, ambos son muy similares en cuanto a la intensidad, estiramientos y flexiones de las bandas, se aprecia mayor estiramiento en la señal 1700 en 1:1 molar (CH_2). Se visualiza la formación del grupo OH en ambos DES con una intensidad mayor (3200-3500), se observa un estiramiento entre la banda 2800 y 3000 correspondiente al grupo C-H. Estos resultados son similares a lo reportado por Che Zain *et al.*, (2021).

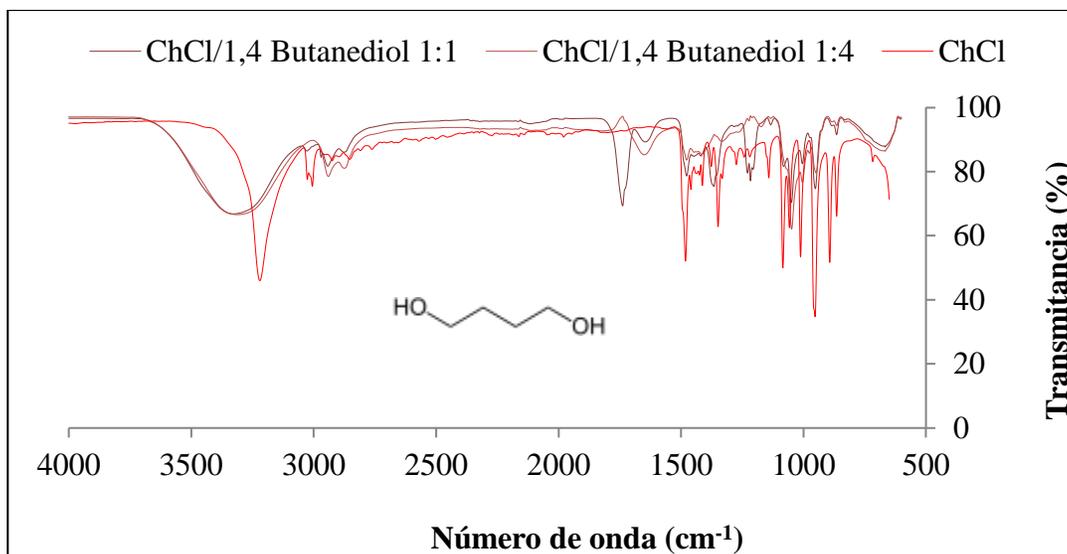


Figura 18. Espectro de infrarrojo del DES ChCl/1,4 butanediol 1:1 y 1:4 molar

En la Figura 19 se muestra el espectro del DES elaborado con etilenglicol, de igual forma como en los demás espectros de dioles, se puede observar la formación del grupo OH con mayor intensidad, debido a la interacción entre ambos HBA y HBD y a la adición del 30 % de agua, la cual facilita la formación de los enlaces de hidrógeno. Por otro lado, los estiramientos de las bandas 2800-3000 muestran la presencia de un grupo CH_2 (estiramiento C-H). Como en todos los espectros, la presencia de Cl se muestra en las señales de 600 a 400 cm^{-1} . Se observaron estiramientos en 1110, 1035 y 862 cm^{-1} correspondientes a C-O, C-C-O y C-C-O, respectivamente.

En la Figura 20 se muestra el espectro de ChCl/glicerol donde se puede observar la formación del grupo OH en las bandas características (3000-3500). Las bandas de entre 2900-2800 son características del estiramiento de C-H, se observó una conformación similar entre ambos DES, siendo los estiramientos de las bandas más representativos, C-H a 2965 cm^{-1} , C-O, al 2080, N-H a 1750 cm^{-1} , una flexión de la vibración H a 1455, estiramiento C-C a 1057 y algunas otras flexiones N-C-C a 956. Los resultados son similares a lo reportado por Che Zain *et al.* (2021).

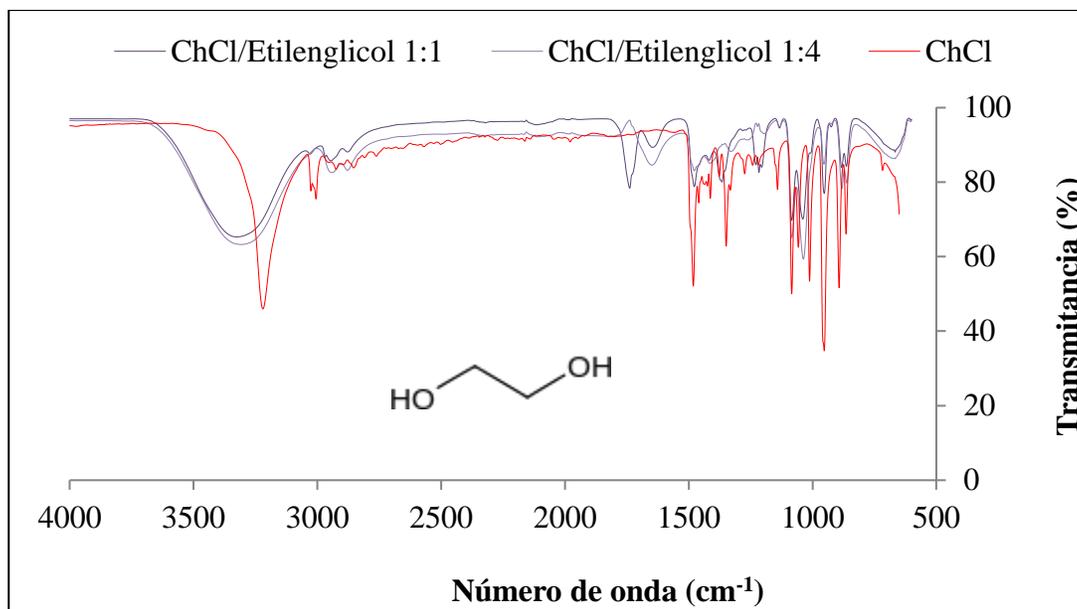


Figura 19. Espectro de infrarrojo del DES ChCl/Etilenglicol 1:1 y 1:4 molar

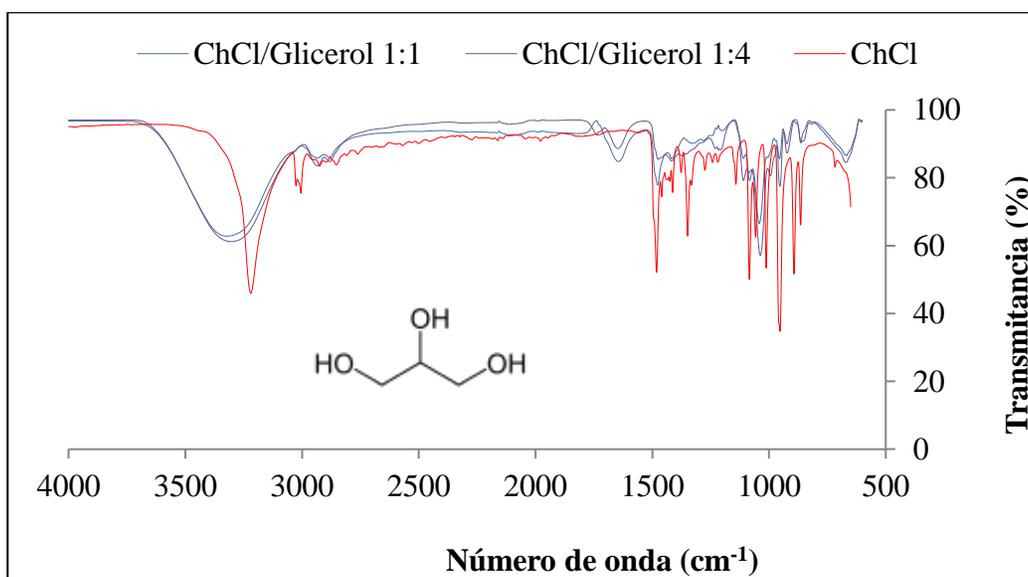


Figura 20. Espectro de infrarrojo del DES ChCl/glicerol 1:1 y 1:4 molar

En la Figura 21 se muestra el espectro de FTIR del DES diseñado con 1,6 hexanediol y se puede observar la formación de grupos OH en las señales 3500-3300, estiramientos característicos de CH₃ y CH₂ se observan en las señales 3000-2800. Así mismo, en la región 1270-950 se visualizan estiramientos característicos del alcohol C-O, C-O-C y C-O-H. Esto concuerda con lo reportado por Ma *et al.* (2017).

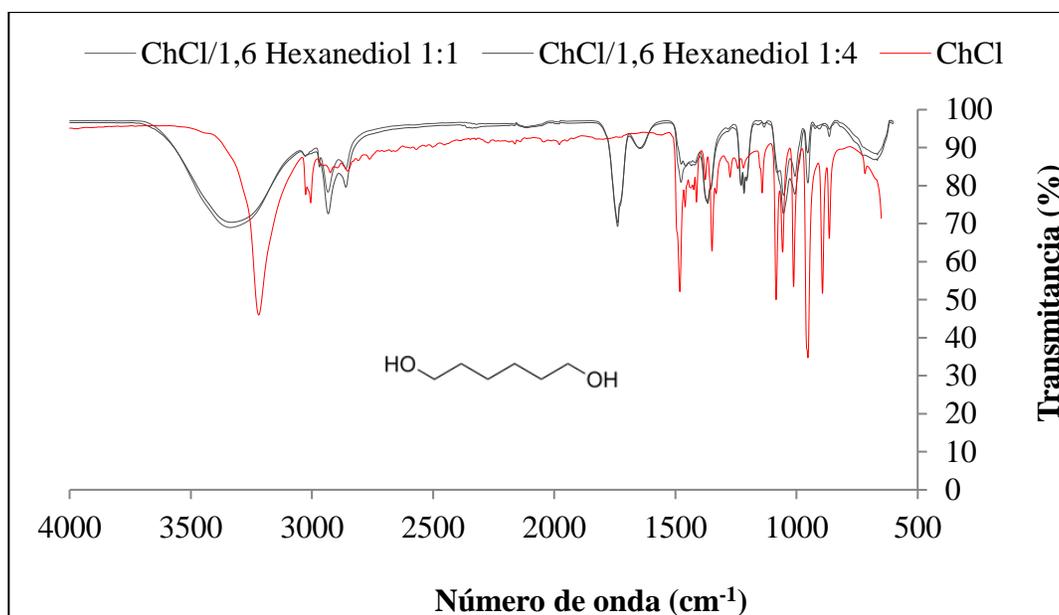


Figura 21. Espectro de infrarrojo del DES ChCl/1,6 hexanediol 1:1 y 1:4 molar

Es importante dilucidar la formación y presencia de enlaces de hidrógeno en los DES ya que la interacción de estos con los compuestos fenólicos son los responsables de su capacidad de extracción (Bonacci *et al.*, 2020). Dai *et al.*, (2013) menciona la interacción de enlaces de hidrógeno entre el DES y los compuestos fenólicos, sin embargo, otros grupos funcionales como los hidroxilo, carboxilo y aminos también interaccionan en la formación de enlaces de hidrógeno. Los cambios de los estiramientos y flexiones de los grupos funcionales así como de sus señales (número de onda, cm^{-1}), se refiere a cambios vibracionales en los enlaces de hidrógeno los cuales pueden significar su creación y establecimiento entre el HBA y el HBD (Ling *et al.*, 2020).

9.3 Extracción de Flavonoides Totales, Luteolina 7-*O*-glicósido y Quercetina 3-*O*-ramnósido para Seleccionar el HBD (Etapa III)

A manera de poder seleccionar un donador de enlaces de hidrógeno y la relación molar que presente mayor rendimiento en la extracción de flavonoides totales y luteolina 7-*O*-glicósido y quercetina 3-*O*-ramnósido se llevaron a cabo las cuantificaciones correspondientes las cuales se plasman a continuación.

9.3.1 Cuantificación de Flavonoides Totales

La extracción de flavonoides totales mediante DES se muestra en la Figura 22. Se aprecian los rendimientos en extracción de flavonoides equivalentes de quercetina en 100 g BS. El análisis de diferencia de medias arrojó que estadísticamente ningún DES fue similar entre sí salvo aquellos que compartían el mismo HBD. Se observó que el ácido láctico en los cuatro DES diseñados fue el que menor rendimiento tuvo, con casi 300 mg EQ/100 g, decreciendo conforme la proporción molar aumentaba. Por su parte, el ácido levulínico aumentó los rendimientos de extracción hasta en un 50 % más que los antes mencionados llegando a obtener 650 mg EQ/100 g, de igual forma el comportamiento fue similar, por lo que se recomienda trabajar con molaridades 1:1.

Con respecto a los dioles estudiados como HBD, el 1,4 butanediol mostró diferencias de medias significativas siendo el DES en la proporción 1:3 el que mejores resultados obtuvo, disminuyendo en la DES 1:4; en cuanto al glicerol el comportamiento fue similar a los antes mencionados teniendo un mejor resultado con proporciones molares bajas 1:1 y 1:2, las cuales no presentaron diferencia estadísticamente significativa. El etilenglicol resultó tener un comportamiento variado la mejor proporción molar fue 1:4, seguido de la 1:1 y 1:3 (< 0.05).

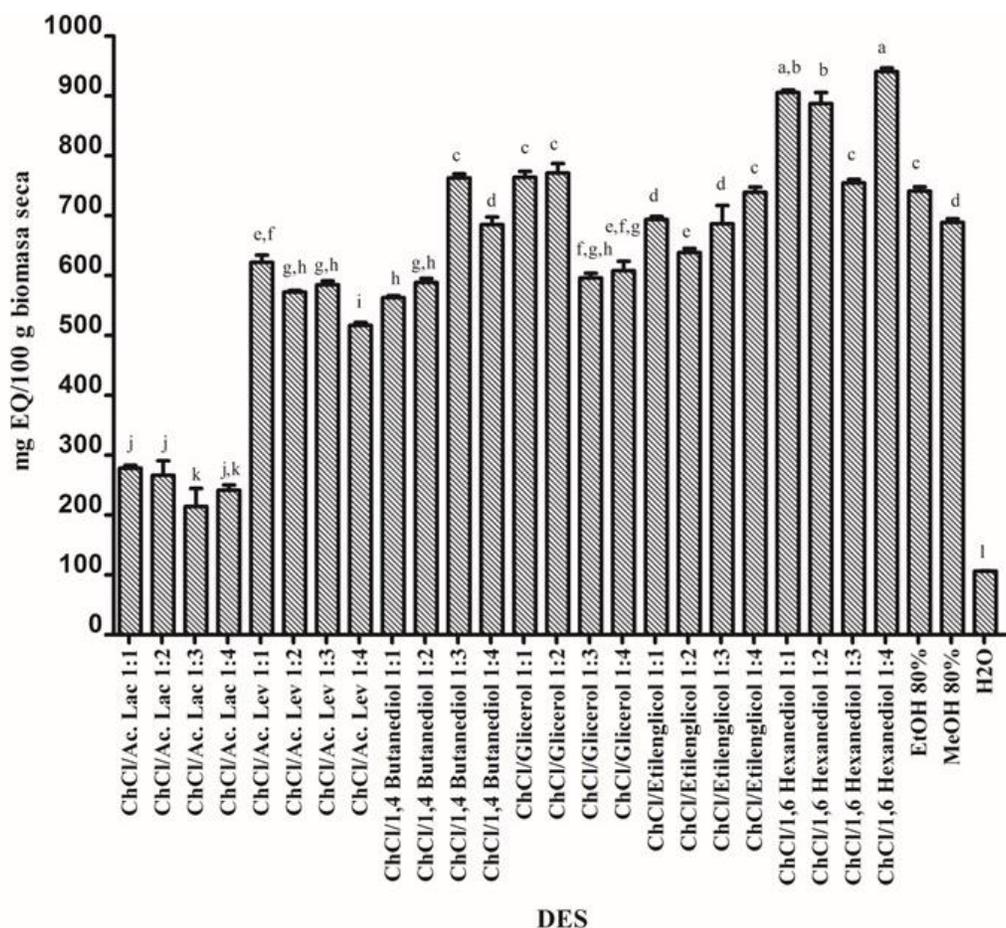


Figura 22. Extracción de flavonoides totales mediante DES y disolventes orgánicos. Letras diferentes muestran significancia estadística ($P < 0.05$), según la prueba de Tukey. Los resultados muestran la media \pm DE de tres réplicas ($n=3$).

El comportamiento del 1,6 hexanediol fue similar a los antes mencionados, siendo la mejor combinación 1:4, seguido de 1:1, 1:2 y 1:3, cabe mencionar que se usó la combinación 1:1 por economía ya que es más rentable usar menor cantidad de HBD, así mismo no hubo diferencia estadísticamente significativa entre el 1:4. El rendimiento de extracción fue superior a todos los DES con 900 mg EQ/ 100 g BS, estos resultados son prometedores ya que se logró extraer casi el 1 % de flavonoides.

Por otro lado, se usaron disolventes convencionales para comparar el rendimiento obtenido con los DES, siendo el EtOH 80 % el mejor de los disolventes extrayendo aproximadamente 700 mg EQ/100 g BS, seguido del MeOH 80 % y el agua que fue el disolvente con menor capacidad de extracción. La extracción hidroetanólica fue un 23 % menos efectiva que el DES seleccionado (ChCl/1,6 hexanediol 1:1 molar).

La capacidad de extracción de flavonoides por parte del 1,6 hexanediol probablemente se deba a su capacidad para solubilizar lignina, recordemos que la biomasa está compuesta en su mayor parte por tallo (75 %) el cual se compone de polímeros resilientes principalmente (lignina, celulosa y hemicelulosa) (Sosa *et al.*, 2020).

Nuestros resultados difieren de lo obtenido por Choudhary *et al.*, (2021), en cuyo trabajo, extrajeron flavonoides de hojas de *Ocimum sanctum*, *Terminalia bellerica* y *Terminalia chebula*. El DES con mayor capacidad de extracción fue ChCl/ácido málico 1:2 molar y 30 % de agua, obteniendo hasta 388.34 mg EQ/g de peso seco esto de *Terminalia chebula*. Los autores señalan que la capacidad de extracción se debe a la polaridad y a la capacidad de solubilización de los DES sobre los compuestos. Cabe mencionar que según nuestros resultados, los DES sintetizados con polialcoholes fueron los más eficientes, contrastando con aquellos compuestos de ácidos orgánicos. Sin embargo, esto se puede deber no solo a la polaridad de los DES sino a sus características fisicoquímicas (viscosidad, pH, densidad, conductividad entre otros), también si el HBD cuenta con suficientes donadores de protones puede evitar que los flavonoides interaccionen con los aniones del cloruro de colina y por ende su solubilidad se vería afectada

La distancia con los iones del cloruro de colina (HBA) y el donador de protones (HBD) en la estructura supramolecular del DES en estado líquido, es un factor importante en la extracción de flavonoides (Choudhary *et al.*, 2021). Lo anterior se relaciona con lo comentado por Dabetić *et al.* (2020), quienes mencionan que los DES sintetizados con ácidos orgánicos son de mayor polaridad, por ende es mayor su capacidad de extracción. Sus resultados mostraron un menor contenido de compuestos fenólicos totales de biomasa de uva en los DES con pH neutro como el ChCl/glucosa 1:1 molar. Mientras que el DES con ChCl/ácido cítrico 2:1 molar fue el que mayor extracción de flavonoides presentó.

Usando como variable de respuesta el contenido de fenoles totales, Fu *et al.*, (2021) realizaron una evaluación con 16 DES, observando que el DES con ChCl/ácido málico 1.5/1 molar fue el que mayor capacidad de extracción presentó. Una característica importante fue que los DES que tuvieron mayor viscosidad fueron los que menos extrajeron compuestos fenólicos. Por otro lado, la ultrasonicación es un factor de relevancia ya que observaron que la capacidad de extracción se incrementó hasta un 130 % con respecto a la extracción con agitación-calentamiento. La extracción de flavonoides totales aumentó un 140 %, mientras que en la extracción de proantocianidinas totales aumentó un 55 % y en la de taninos hasta un 160 %, por lo que concluyeron que la

sonicación es una herramienta fundamental para la extracción de dichos compuestos, esto debido a que la sonicación promueve la ruptura total de la célula vegetal, liberando los fitoquímicos al disolvente. La célula vegetal al estar expuesta por la cavitación acústica, comienza un fenómeno de sonoporación el cual daña la vacuola y la célula por completo, permitiendo que el disolvente en este caso DES entre y solubilice los metabolitos contenidos (Karunanithi y Venkatachalam, 2019). En otro estudio Fu *et al.* (2022), observaron la afinidad de los DES con compuestos fenólicos, destacando que el DES sintetizado con ChCl/ácido málico 1:1 molar tuvo la capacidad de extraer grandes concentraciones de ácidos fenólicos y flavonoides, mientras que los DES compuestos de dioles como el glicerol y butanediol tuvieron mayor afinidad con ácidos fenólicos, catequinas y proacnidinas.

El fenómeno ligado a la alta extracción de fenólicos con ácidos orgánicos se ha observado en experimentos con ChCl/ácido oxálico dihidratado 1:1 molar con 25 % de agua, aplicado a residuos de cáscara de nuez de castaña, según Husanu *et al.* (2020). Ellos explican que es debido a la depolimerización parcial de la lignina, esto mediante la desestabilización de los enlaces intermoleculares como enlaces de hidrógeno y plegamientos tipo π entre los anillos aromáticos de la lignina. Es por ello que para extraer fitoquímicos de residuos lignocelulósicos es mejor el uso de DES ácidos. También observaron que los colores de los fitoquímicos se relaciona con su capacidad y selectividad de extracción de los DES. Por ejemplo DES con ácidos orgánicos extraen flavonoides con un espectro de color púrpura-rojo, DES con azúcares extraen compuestos color naranja y DES con polioles flavonoides color amarillento (Husanu *et al.*, 2020).

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Jablonsky *et al.* (2020), ya que ellos observaron un mayor rendimiento en la extracción de compuestos fenólicos totales con la mezcla de ChCl/ácido láctico/1,3 butanediol/agua 1:4:1:1 y 1:5:1:1 molar. Jurić *et al.* (2021) extrajeron un mayor contenido de flavonoides totales, con rendimientos superiores hasta en un 80 % con DES con ChCl/glicerol 1:1 molar con 30 % de agua, comparado con DES elaborados con azúcares y con ácidos orgánicos. Sus resultados, al igual que los nuestros, se pueden correlacionar con la polaridad, pH y composición molar del DES utilizado. Ellos mencionan un aspecto muy relevante y lógico tratando de explicar el por qué los DES con ácidos orgánicos presentaron una menor extracción, lo atribuyen a su acidez y polaridad. Sin embargo, se apoyan en el concepto de que sustancias similares con propiedades químicas similares disuelven a otras de la misma naturaleza; los alcoholes y dioles pueden tener una polaridad similar a los solutos presentes en el extracto

(quercetina, luteolina y sus glicósidos).

Oliveira *et al.* (2021) lograron la extracción de flavonoides totales de diferentes partes de *Curcuma longa*, observando que incluso los DES hidrofóbicos compuestos por mentol y ácido láctico o ácido acético son capaces de extraer grandes cantidades. Sin embargo, el mejor DES fue ChCl/ácido láctico 1:2 molar con 20 mg EQ/g. Las mejores condiciones de extracción fueron 45 °C y 3 h de maceración.

Nuestros resultados son inferiores a lo reportado por Zannou *et al.* (2022), los autores extrajeron 17.57 mg equivalentes de epicatequina por g de *Rhus coriaria* esto con ChCl/ácido láctico 1:2 y 20 % de agua. En contraste con ellos el ácido láctico fue el peor HBD evaluado, esto se debe a que los metabolitos presentes en la biomasa son de polaridad media-baja por lo que los DES más polares no son capaces de extraer los compuestos de interés, además de que los compuestos predominantes en *Rhus coriaria* son antocianinas las cuales son afines a disolventes ácidos (Zannou *et al.*, 2022).

Zannou y Koca (2022), mencionan que los DES con mayor capacidad de extracción de flavonoides totales de blackberry son los compuestos por alcoholes como HBD, esto gracias a la formación de redes de enlaces de hidrógeno entre el DES y los flavonoides, lo que difiere a lo antes reportado por varios autores. Sin embargo, concuerda con nuestros resultados donde el 1,6 hexanediol al ser un poli alcohol de carácter básico, tuvo mayor capacidad de extracción.

Wang *et al.*, (2017) estudiaron la extracción de catequinas y kaempferol, observando que los DES con 1,4 butanediol como HBD y ChCl como HBA, fue el más eficiente. Esto concuerda con nuestros resultados donde el butanediol fue uno de los mejores HBD para extraer flavonoides totales y glicosilados, debido a la baja polaridad que presenta ya que se observó que a medida que el porcentaje de agua incrementaba, el contenido de kaempferol disminuía. Así mismo los HBD de ácidos orgánicos presentaron menores rendimientos.

Un reporte de interés es el publicado por Sillero *et al.* (2021), los cuales extrajeron flavonoides de corteza de pino *Larix decidua* un material completamente lignificado, lo cual puede ayudar a comprender el fenómeno de extracción con DES sobre estos recursos naturales altamente resilientes. La mejor combinación fue la sintetizada con ChCl/1,4 butanediol 1:2 molar con el 25 % de agua (383 mg equivalentes de catequina por g), una cantidad alta por el tipo de material. Según los análisis de polaridad efectuados mencionan que, entre parámetros solvatacrómicos, el parámetro α es debido al HBD, el π engloba tanto el HBA como el HBD y β es debido al HBA por el ión cloruro. El ChCl/1,4 butanediol obtuvo valores mayores al agua en los valores β y π , los

cuales posiblemente sean responsables de la capacidad de extracción, sin embargo, también se puede deber al impedimento estérico formado en el DES.

En el presente estudio no se realizó el ensayo de Folin-Ciocalteu para la medición de compuestos fenólicos totales (capacidad reductora total), ya que los elementos contenidos en el reactivo de Folin-Ciocalteu no son compatibles con las sales y HBD de los DES, al igual por el carácter ácido de algunos DES ocurre una reacción indeseada precipitando el reactivo, obstruyendo claramente su lectura (Bener *et al.*, 2022; Percevault *et al.*, 2021).

9.3.2 Cuantificación de Luteolina 7-*O*-glicósido y Quercetina 3-*O*-ramnósido

En las Figuras 23 y 25, se muestra la cuantificación de quercetina 3-*O*-ramnósido y luteolina 7-*O*-glicósido, respectivamente. Diversas investigaciones señalan que el contenido de flavonoides en frutos, hojas y tallos de algunas especies del género *Capsicum* se encuentran *C*- u *O*-glicosilados, de los cuales resaltan por su presencia y cantidad la quercetina, luteolina y apigenina unidas a hexosas, ramnosas, pentósidos, y/o algún otro glucósido (Antonio *et al.*, 2018; Carvalho Lemos *et al.*, 2019; Hernández-Pérez *et al.*, 2020; Wahyuni *et al.*, 2013). Es por ello que se seleccionó como moléculas de interés luteolina 7-*O*-glicósido y quercetina 3-*O*-ramnósido (Figura 24), además por su interés en la industria farmacéutica por su potente actividad antioxidante (Li *et al.*, 2016; Rehfeldt *et al.*, 2022; Tang *et al.*, 2019; Zou *et al.*, 2018).

En este sentido se cuantificó el contenido de quercetina 3-*O*-ramnósido, donde se observó que los DES sintetizados con 1,6 hexanediol fueron los que mayor capacidad de extracción presentaron siendo el DES ChCl/1,6 hexanediol 1:1 molar el que mejor respuesta tuvo, con casi 8 µg/g de BS, seguido de la relación molar 1:4. Por otro lado, para los HBD glicerol y etilenglicol solo la proporción molar 1:1 presentó capacidad de extracción, mientras que las molaridades 1:2, 1:3 y 1:4 no se detectó concentración de los flavonoides en cuestión. Además, en los DES usando 1,4 butanediol se observó el mismo comportamiento donde la proporción molar 1:1 fue la que mayor rendimiento obtuvo (>3 µg/g), encontrando que a medida que la molaridad incrementaba decrecía el rendimiento; solo en la relación molar 1:4 se registró un ligero aumento.

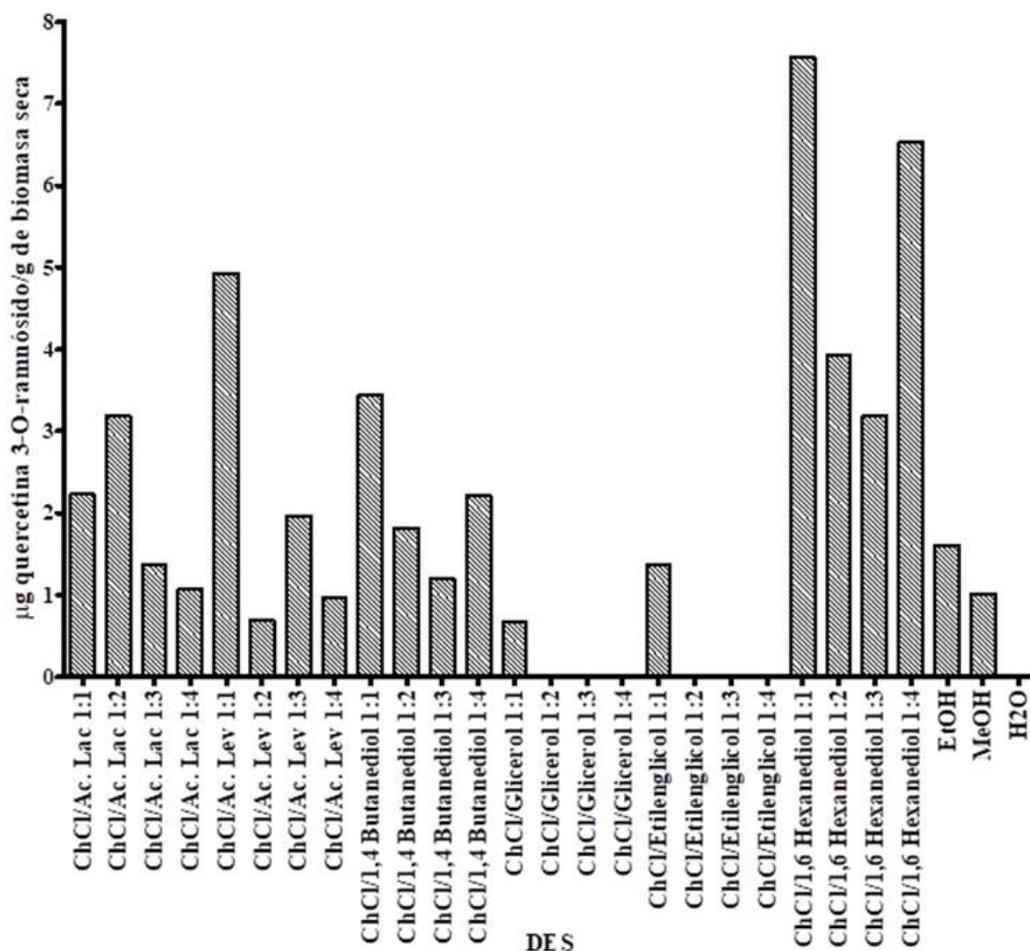


Figura 23. Extracción de quercetina 3-O-ramnósido mediante DES y disolventes orgánicos

Por parte de los ácidos carboxílicos el ácido levulínico fue el que mejor extracción presentó. La relación molar 1:1 fue superior a las demás, así mismo solo estuvo por debajo que el 1,6 hexanediol 1:1 molar, el comportamiento de este HBD difirió de los otros, ya que se observó que en la relación molar 1:2 disminuyó, en la 1:3 aumentó y en la 1:4 disminuyó nuevamente. Con respecto al ácido láctico el mejor DES fue el 1:2 molar, resultando que a medida que aumentaba la proporción molar decrecía el contenido de quercetina 3-O-ramnósido.

Nuestros resultados concuerdan con lo obtenido por Fu *et al.* (2022), ellos obtuvieron flavonoides (quercetina, naringenina, catequina, pinocembrina y crisina) de cáscara de *Carya cathayensis*, mediante ChCl/ácido málico 1:1 molar, lo que demuestra el potencial de los ácidos orgánicos en la extracción de flavonoides.

Se ha observado la alta solubilidad de la quercetina-3-O-rutinósido (rutina), en DES hechos con

ChCl/glicerol 1:1 molar con el 20 % de agua, siendo superior a los DES elaborados con azúcares, aminoácidos y metanol. Estos resultados difieren a lo reportado en el estudio efectuado ya que los DES hechos con glicerol no presentaron altos rendimientos de extracción de quercetina-3-*O*-ramnósido, esto probablemente debido a la viscosidad y solubilidad de la ramnosa en el glicerol (Huang *et al.*, 2017).

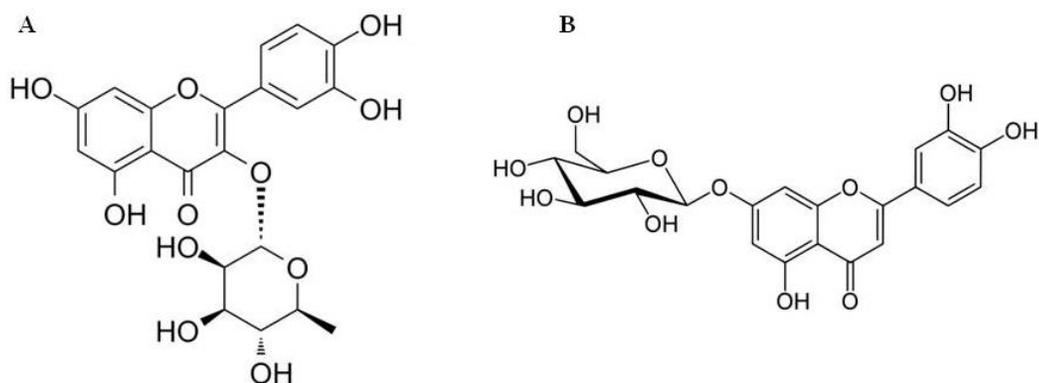


Figura 24. Estructura molecular de la A) quercetina-3-*O*-ramnósido y B) luteolina 7-*O*-glicósido

En cuanto a la extracción de luteolina 7-*O*-glicósido, el HBD 1,6 hexanediol fue el que mejor capacidad de extracción presentó esto en la relación molar 1:4 y 1:1. Los HBD glicerol y etilenglicol de igual forma la relación molar con mayor extracción fue la 1:1, decreciendo conforme la molaridad incrementaba. El 1,4 butanediol se comportó de forma similar al 1,6- hexanediol, las relaciones molares con mayor extracción fueron la 1:1 y 1:4. Los ácidos carboxílicos en particular el levulínico tuvo una mayor extracción que el láctico. El ChCl/ácido láctico 1:1 molar fue la mejor relación molar, observando que la 1:4 no presentó extracción. Se observó que a medida que la molaridad incrementaba disminuyó la extracción.

Esto concuerda con lo reportado por Torres-Vega *et al.* (2021), quienes mencionan que la mejor extracción de luteolina 7-*O*-glicósido es con ChCl/1,2 propanediol 1:3 molar esto en hojas de *B. globosa*. Se observa en la figura 26 que la mayoría de los DES con alcoholes como HBD presentaron extracción del metabolito.

Los disolventes EtOH, MeOH y agua fueron usados como referencia. Se observó que en la quercetina-3-*O*-ramnósido el mejor disolvente fue el EtOH, seguido del MeOH y agua, caso contrario en la luteolina 7-*O*-glicósido el MeOH y el agua fueron los mejores disolventes, el EtOH

no presentó extracción. Cabe mencionar que todos los HBD estudiados tuvieron en al menos una relación molar, mayor capacidad de extracción que estos disolventes. Por los resultados antes mencionados, se seleccionó el DES ChCl/1,6 hexanediol 1:1 molar para optimizar la extracción de flavonoides glicosilados de biomasa de pimiento morrón.

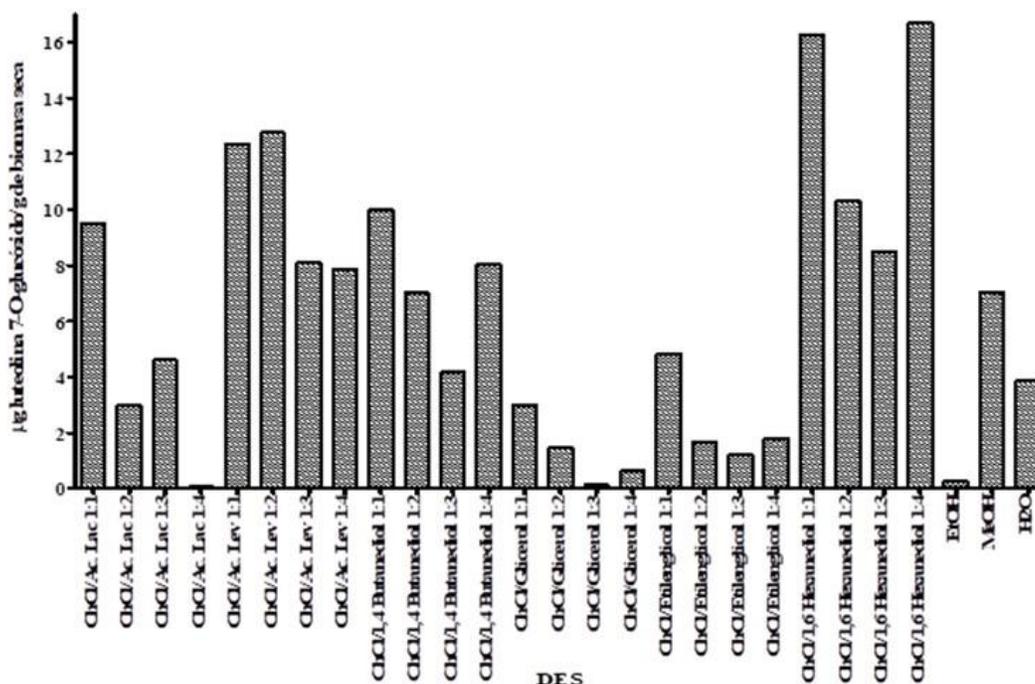


Figura 25 Extracción de luteolina 7-O-glucósido mediante DES y disolventes orgánicos

Mansinhos *et al.* (2021), reportaron una mayor extracción de luteolina-7-O-glicósido de hojas de *Lavandula pedunculata* mediante DES de ChCl/ácido láctico 1:1 molar y 30 % de agua, con rendimientos de hasta 91.15 µg/g de extracto. Esto difiere de nuestros resultados ya que los autores expresan el contenido en g de extracto. Para obtener resultados orientados a la aplicación tecnológica de la biomasa, se expresaron como µg/g de BS.

La capacidad de extracción entre diversos DES y disolventes convencionales se debe a que los DES tienen la capacidad de formar enlaces de hidrógenos entre sí y entre los flavonoides, estos enlaces propician que el metabolito tenga una mayor capacidad de solubilización en el medio, como muestra de esto la catequina es más soluble en ChCl/ácido málico 1.5:1 molar que el agua y el etanol al 50 %. Otro factor que contribuye a este efecto es la interacción que pueden tener los

compuestos con el DES, la cual es superior en los DES que en el agua o etanol, esto es debido a la viscosidad y tensión superficial los cuales promueven la difusión e incremento de la transferencia de masa (Masinhos *et al.*, 2021).

Un fenómeno interesante es el cálculo de cuantos enlaces de hidrógeno puede formar la catequina con el DES antes mencionado, que se estima en 763.06, mientras que con el etanol 602.12 y con el agua 410.05. El ácido málico aporta un 18.87 % de enlaces de hidrógeno, el catión de la colina aporta un 50.62 %, el anión del cloruro aporta un 8.35 % y el agua del medio aporta un 22.16 %. Mientras que el etanol forma 301.39 enlaces de hidrógeno y el agua solo 300. Así mismo la vida media de estos enlaces es superior en el DES, por ende, los compuestos son estables durante más tiempo. Con respecto a las interacciones no covalentes, resalta que el anión del cloruro en el DES puede servir para enlazar los átomos de hidrógeno de los grupos hidroxilo en la catequina y otros hidrógenos del mismo disolvente (Fu *et al.*, 2022).

Che Zain *et al.* (2021), extrajeron flavonoides de hojas de palma (*Elaeis guineensis*), los mejores rendimientos los obtuvieron con el uso de DES basados en ChCl como HBA y 1,2-propanediol, 1,4-butanediol y glicerol 1:4, 1:4 y 1:3 molar, con un 33, 38 y 29 % de agua respectivamente. Obtuvieron hasta 22 mg EQ/g de flavonoides totales, 20 mg/g de luteolina y 130 mg/g de apigenina, siendo superiores a lo reportado en la biomasa de pimiento morrón.

Los resultados de flavonoides totales (espectrofotométrico) y los obtenidos por UPLC, difieren en cuanto a los DES con mayor capacidad de extracción, esto se puede explicar con lo mencionado por (Jurić *et al.*, 2021). Al igual que nosotros, sus resultados difieren entre ambas metodologías, esto se puede deber a que los primeros son menos sensibles y que la absorbancia total refiere al total de compuestos que emiten a una longitud de onda particular. Por otro lado, la variación de pH entre los DES puede interferir en la medición espectrofotométrica sobrestimando su valoración.

Pandey *et al.* (2014), tras amplias pruebas solvatacrómicas, espectroscópicas y fluorescentes mencionan la polaridad de algunos DES llamados etalina, glicina, relina y malina los cuales se componen de cloruro de colina y 1,2-etanediol, glicerol, urea y ácido malónico, respectivamente. Según sus resultados los DES con regiones dipolares son etalina y glicina por la presencia de alcohol. Sin embargo, el DES más dipolar fue la malina. Esto puede explicar el comportamiento en la extracción de flavonoides glicosilados con DES sintetizados con dioles o ácidos. Xu *et al.*, (2019) corroboraron lo antes mencionado, observaron que flavonoides polimetoxilados son más afines a DES sintetizados con ChCl y ácido levulínico el cual presentó una polaridad baja. Alrugaibah *et al.* (2021), extrajeron flavonoides (quercetina y miricetina) de semillas y cáscaras de

uva, los mayores rendimientos fueron con DES ácidos compuestos por ChCl/ácido levulínico y etilenglicol 1:1:2 molar, las mejores condiciones fueron usando ultrasonido durante 35 min (baño ultrasónico). Esto se asemeja a lo reportado en la Figura 24.

9.4 Optimización del Proceso de Extracción de Flavonoides Totales, Luteolina-7-*O*-glicósido y Quercetina 3-*O*-ramnósido (Etapa IV)

9.4.1 Flavonoides Totales

El DES seleccionado para llevar a cabo la optimización fue el compuesto por ChCl y 1,6 hexanediol en proporción molar 1:1. Para optimizar la extracción de flavonoides totales, luteolina y quercetina glicosiladas, se usó un diseño central compuesto rotatable de dos factores. En el Cuadro 15 se muestra el análisis de varianza de la variable de respuesta flavonoides totales. La significancia del modelo se basó en el valor F y en el valor p, de igual forma el porcentaje de contribución ayuda a entender los valores presentados.

El modelo mostró ser significativo (F 95.20, p <0.000), contribuyendo de manera importante a la explicación del mismo (98.55 %). Como se esperaba el modelo lineal no fue significativo (p 0.801), por ende tampoco los factores (tiempo seg, y potencia %). El modelo cuadrático fue significativo como se muestra en el Cuadro 15, ambos factores contribuyeron de manera importante al mismo. Al igual la interacción de ambos fue significativa. Cabe mencionar que no hubo falta de ajuste, por lo que la R² fue de 98.55 % y la R² ajustada 97.52 %.

La ecuación de regresión que explica el modelo es la siguiente flavonoides totales = -3.812 + 0.1871 *T* + 0.2915 *P* - 0.002701 *T*² - 0.002565 *P*² + 0.000452 *T***P*. **Donde:** T= tiempo en segundos; P= potencia en %.

Cuadro 15. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable de respuesta flavonoides totales

Fuente	GL	SCs	Contribución (%)	SC ajustados	SCM ajustados	Valor F	Valor p
Modelo	5	33.7210	98.55%	33.7210	6.7442	95.20	0.000
Lineal	2	0.0325	0.09%	0.0325	0.0162	0.23	0.801
Tiempo (seg)	1	0.0170	0.05%	0.0170	0.0170	0.24	0.639
Potencia (%)	1	0.0155	0.05%	0.0155	0.0155	0.22	0.654
Cuadrado	2	33.3693	97.52%	33.3693	16.6846	235.53	0.000
Tiempo*Tiempo	1	15.4854	45.26%	19.8303	19.8303	279.94	0.000
Potencia*Potencia	1	17.8839	52.27%	17.8839	17.8839	252.46	0.000
Interacción de 2 factores	1	0.3192	0.93%	0.3192	0.3192	4.51	0.071
Tiempo*Potencia	1	0.3192	0.93%	0.3192	0.3192	4.51	0.071
Error	7	0.4959	1.45%	0.4959	0.0708		
Falta de ajuste	3	0.3715	1.09%	0.3715	0.1238	3.98	0.108
Error puro	4	0.1244	0.36%	0.1244	0.0311		
Total	12	34.2168	100.00%				

GL (grados de libertad); SCs (Suma de cuadrados secuenciales); SC (Suma de cuadrados ajustados); SCM ajustados (Suma de cuadrados medios ajustados)

En la Figura 26 se puede observar la gráfica de contornos de flavonoides totales, resalta la zona óptima en el centro de los rangos de las dos variables de proceso (potencia y tiempo), donde se aprecia que con potencias de entre 50-70 % y tiempos de 30-50 seg son los mejores para extraer flavonoides totales de biomasa de pimiento morrón. En la Figura 26 se muestra la gráfica de superficie de flavonoides totales, se puede observar su curvatura, reflejando que el modelo es cuadrático, así mismo se pueden apreciar las condiciones que maximizan la extracción de flavonoides totales.

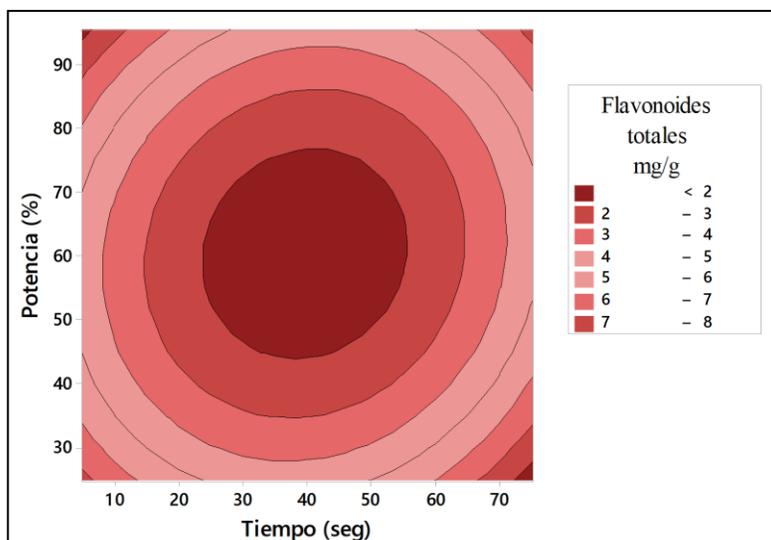


Figura 26. Gráfica de contorno de flavonoides totales, donde se observa la región donde se optimiza la extracción acorde a la potencia y al tiempo de extracción.

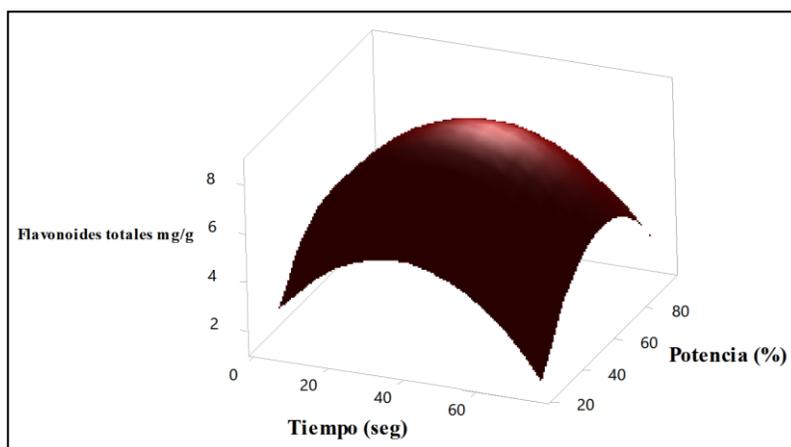


Figura 27. Gráfica de superficie de respuesta para flavonoides totales

9.4.2 Luteolina 7-*O*-glicósido

El análisis de varianza para la variable de respuesta luteolina 7-*O*-glicósido se muestra en el Cuadro 16. Se observa que el modelo general fue significativo con un valor $p < 0.05$ y una contribución del 96.74 %. El modelo lineal resultó ser significativo siendo la potencia el factor que aporta a este resultado ($p < 0.05$). En las Figuras 28 y 29, se muestran las gráficas de contornos y de superficie.

Cuadro 16. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable de respuesta luteolina 7-*O*-glicósido

Fuente	GL	SCs	Contribución (%)	SC ajustados	SCM ajustados	Valor F	Valor p
Modelo	5	18.6826	96.74%	18.6826	3.73652	41.52	0.000
Lineal	2	5.3844	27.88%	5.3844	2.69218	29.91	0.000
Tiempo (seg)	1	0.0075	0.04%	0.0075	0.00745	0.08	0.782
Potencia (%)	1	5.3769	27.84%	5.3769	5.37691	59.74	0.000
Cuadrado	2	4.9862	25.82%	4.9862	2.49311	27.70	0.000
Tiempo*Tiempo	1	3.2436	16.80%	3.8330	3.83296	42.59	0.000
Potencia*Potencia	1	1.7426	9.02%	1.7426	1.74265	19.36	0.003
Interacción de 2 factores	1	8.3120	43.04%	8.3120	8.31203	92.35	0.000
Tiempo*Potencia	1	8.3120	43.04%	8.3120	8.31203	92.35	0.000
Error	7	0.6300	3.26%	0.6300	0.09000		
Falta de ajuste	3	0.2941	1.52%	0.2941	0.09803	1.17	0.426
Error puro	4	0.3359	1.74%	0.3359	0.08398		
Total	12	19.3126	100%				

GL (grados de libertad); SCs (Suma de cuadrados secuenciales); SC (Suma de cuadrados ajustados); SCM ajustados (Suma de cuadrados medios ajustados)

El modelo cuadrático también fue significativo los dos factores contribuyeron al mismo con valores F y p adecuados. La interacción de ambos factores (tiempo y potencia), fueron significativos ya que ambos factores resultaron ser de importancia para la extracción de este metabolito. La falta de ajuste no fue significativa (Cuadro 18), por lo que se obtuvo una R^2 96.74 % y R^2 ajustada 94.41 %. El modelo matemático arrojó la siguiente ecuación de regresión luteolina 7-*O*-glucósido = 27.095 - 0.2346 *T* - 0.2211 *P* + 0.001188 *T*² + 0.000801 *P*² + 0.002306 *T*P*. **Donde:** T= tiempo en segundos; P= potencia en %

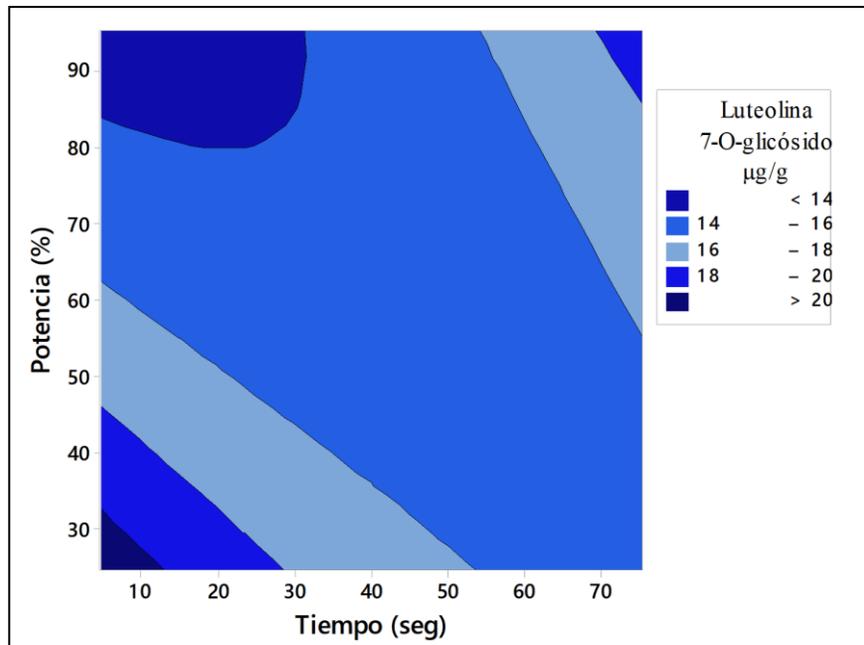


Figura 28. Gráfica de contorno de luteolina 7-*O*-glucósido, donde se observa la región donde se optimiza la extracción acorde a la potencia y al tiempo de extracción.

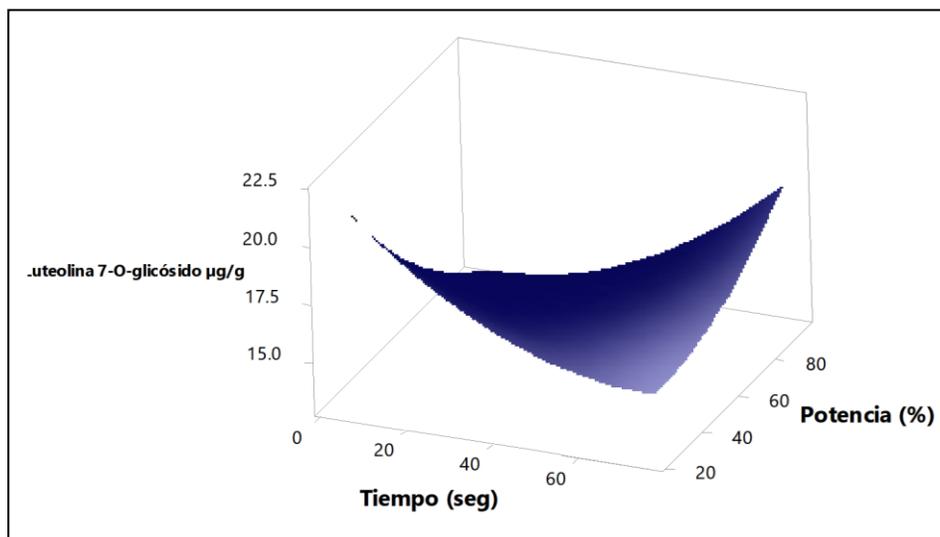


Figura 29. Gráfica de superficie de respuesta para luteolina 7-*O*-glucósido

9.4.3 Quercetina 3-*O*-ramnósido

En el Cuadro 17, se muestra el análisis de varianza de la quercetina 3-*O*-ramnósido.

Cuadro 17. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable de respuesta quercetina 3-*O*-ramnósido

Fuente	GL	SCs	Contribución (%)	SC ajustados	SCM ajustados	Valor F	Valor p
Modelo	5	29.9113	95.72%	29.9113	5.9823	31.29	0.000
Lineal	2	0.8965	2.87%	0.8965	0.4482	2.34	0.166
Tiempo (seg)	1	0.8284	2.65%	0.8284	0.8284	4.33	0.076
Potencia (%)	1	0.0681	0.22%	0.0681	0.0681	0.36	0.570
Cuadrado	2	26.5647	85.01%	26.5647	13.2823	69.47	0.000
Tiempo*Tiempo	1	3.6422	11.66%	6.3335	6.3335	33.12	0.001
Potencia*Potencia	1	22.9225	73.35%	22.9225	22.9225	119.88	0.000
Interacción de 2 factores	1	2.4502	7.84%	2.4502	2.4502	12.81	0.009
Tiempo*Potencia	1	2.4502	7.84%	2.4502	2.4502	12.81	0.009
Error	7	1.3385	4.28%	1.3385	0.1912		
Falta de ajuste	3	1.1440	3.66%	1.1440	0.3813	7.85	0.038
Error puro	4	0.1944	0.62%	0.1944	0.0486		
Total	12	31.2498	100.00%				

GL (grados de libertad); SCs (Suma de cuadrados secuenciales); SC (Suma de cuadrados ajustados); SCM ajustados (Suma de cuadrados medios ajustados)

El modelo general resultó ser significativo con un valor $p < 0.05$ y una contribución del 95.72 %, el modelo lineal no fue significativo, sin embargo, el modelo cuadrático fue significativo al igual que los dos factores evaluados, la interacción de ambos también fue significativo. El modelo no presentó falta de ajuste, por lo que arrojó una R^2 de 95.72 %, y R^2 ajustada de 92.66 %.

El modelo arrojó la siguiente ecuación de regresión Quercetina 3-*O*-ramnósido = $-1.58 + 0.2101 T + 0.3949 P - 0.001901 T^2 - 0.001527 P^2 - 0.001252 T*P$. Donde: T = tiempo en segundos; P = potencia en %. A continuación se muestran las gráficas de contorno y de superficie (Figura 30 y 31 respectivamente).

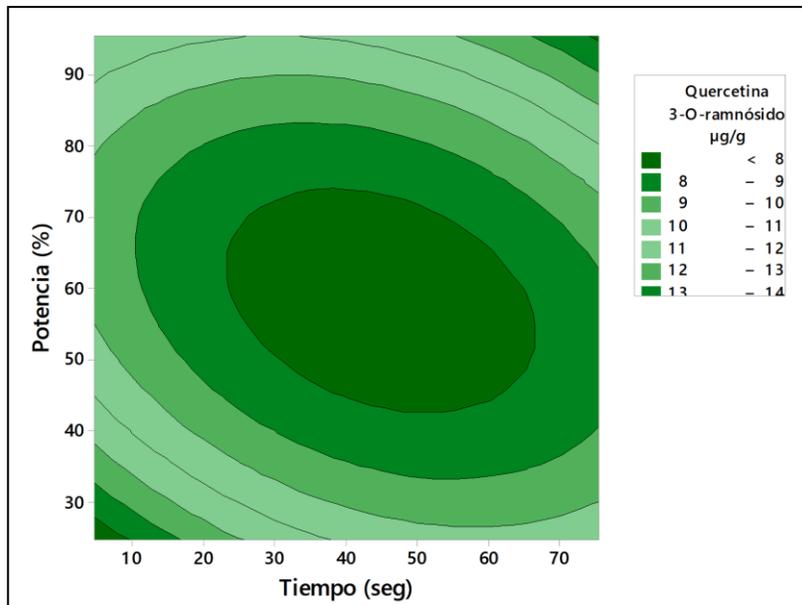


Figura 30. Gráfica de contorno de quercetina 3-*O*-ramnósido, donde se observa la región donde se optimiza la extracción acorde a la potencia y al tiempo de extracción.

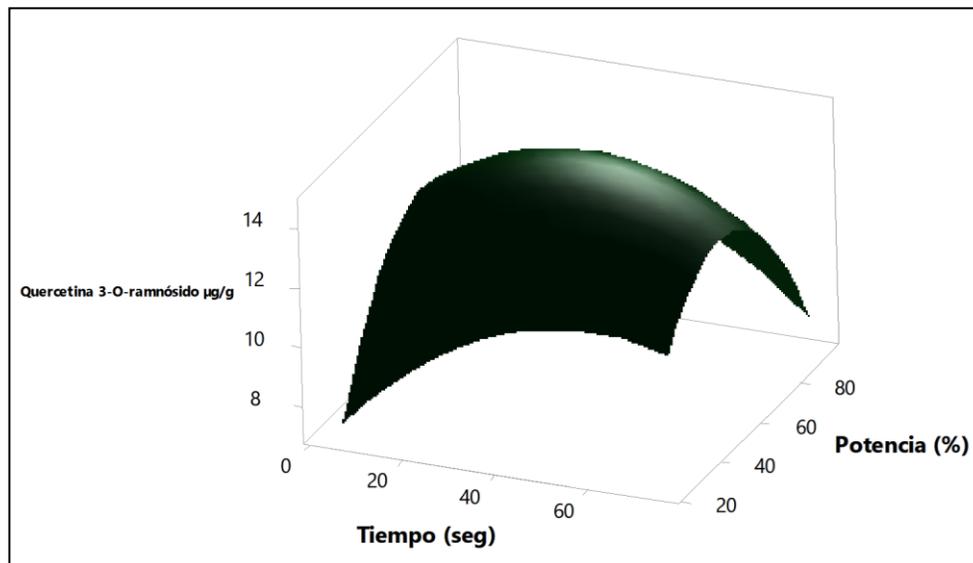


Figura 31. Gráfica de superficie de respuesta para quercetina 3-*O*-ramnósido

Se aprecia la región óptima en los puntos centrales, alrededor de 20 a 60 seg y 50 a 70 % de potencia. Esto lo refleja la gráfica de superficie, se puede observar la curvatura del comportamiento de extracción estudiando ambos factores. En el Cuadro 18 se muestran los resultados experimentales de las 13 corridas del diseño central compuesto rotatable.

Cuadro 18. Resultados experimentales de flavonoides totales, quercetina 3-*O*-ramnósido, luteolina 7-*O*-glucósido de las 13 corridas del diseño central compuesto rotatable

Corrida	Punto	Tiempo (seg)	Potencia (%)	Flavonoides totales mg EQ/g de BS	Quercetina 3- <i>O</i> -ramnósido µg/g de BS	Luteolina 7- <i>O</i> -glucósido µg/g de BS
1	1	-1.0 (15)	-1.0 (35)	5.85	10.89	18.06
2	1	1.0 (65)	-1.0(35)	5.03	12.67	15.20
3	1	-1.0 (15)	1.0 (85)	5.56	12.02	13.55
4	1	1.0 (65)	1.0 (85)	5.87	10.67	16.45
5	-1	-1.41 (4)	0.0 (60)	5.09	12.25	16.53
6	-1	1.41 (75)	0.0 (60)	5.19	13.75	16.33
7	-1	0.0 (40)	-1.41 (24)	5.38	11.23	17.11
8	-1	0.0 (40)	1.41 (95)	5.24	11.32	14.78
9	0	0.0 (40)	0.0 (60)	8.71	14.56	14.25
10	0	0.0 (40)	0.0 (60)	8.83	14.29	14.93
11	0	0.0 (40)	0.0 (60)	8.80	14.88	14.93
12	0	0.0 (40)	0.0 (60)	8.74	14.72	14.90
13	0	0.0 (40)	0.0 (60)	8.39	14.66	14.79

EQ (equivalentes de quercetina)

Nuestros resultados son similares a lo reportado por Ahmad *et al.* (2021), quienes extrajeron ácido glicirricó de raíces de regaliz, mediante sonda ultrasónica. Ellos observaron que la temperatura con mayor rendimiento fue 40 °C, 50 % de amplitud, 30 seg de trabajo (pulsos), y un tiempo de 3 min; estos factores en conjunto proporcionan un mayor rendimiento de extracción. La temperatura ayuda a romper los enlaces intermoleculares de los compuestos en la vacuola celular, la amplitud rompe las células mediante la cavitación acústica, mientras que el tiempo entre menor sea la factibilidad económica es mejor. Además de que se evita la degradación de los metabolitos a causa de la generación de radicales libres por el proceso ultrasónico (Ahmad *et al.*, 2021).

Se ha observado que tiempos de extracción de 120 seg son los óptimos para la extracción de crocinas de *Gardenia jasminoides*, esto asistido de ultrasonido con potencia de 400 W, siendo la mejor, ya que potencias superiores pueden degradar el compuesto. La relación sólido-líquido más eficiente fue 40 mL/g de peso seco. La temperatura ideal fue 35 °C ya que estos compuestos son termolábiles. Cabe mencionar que los autores efectuaron dicha extracción con ChCl/1,2 propilenglicol 1:2 molar, mientras que en el presente trabajo se usó ChCl/ 1,6 hexanediol 1:1 molar. El ultrasonido según imágenes SEM ocasionó una erosión y daño a la pared celular, permitiendo la penetración del solvente a la célula vegetal (Huang *et al.*, 2022).

9.4.4 Optimización

Se realizó un análisis de superposición de contornos de las tres variables de respuesta, para obtener una optimización adecuada del modelo y de las variables, esto quiere decir que las tres variables se superponen para obtener los datos optimizados. En la Figura 32 se muestra la gráfica de superposición de contornos. Las condiciones que maximizan la extracción de los tres factores estudiados fueron 35.30 segundos de extracción y 74.89 % de potencia de sonicación. En el Cuadro 19 se muestran los resultados experimentales obtenidos bajo las condiciones arrojadas por el modelo predictivo. Cabe mencionar que las tres variables estuvieron dentro de los rangos de variabilidad (IC 95).

Cuadro 19. Valores experimentales obtenidos siguiendo las condiciones óptimas arrojadas por el modelo matemático

Extracto	Flavonoides totales (mg EQ/g BS)	Quercetina 3-O- ramnósido (µg/g BS)	Luteolina 7-O- glicósido (µg/g BS)
DES (ChCl/1,6 hexanediol 1:1 molar)	10.31 ± 0.16a	14.54 ± 0.49a	14.14 ± 0.16a
EtOH 80%	9.66 ± 0.39a	5.05 ± 0.54b	6.95 ± 0.50b

Letras diferentes muestran significancia estadística ($P < 0.05$), según la prueba de Tukey. Los resultados muestran la media ± DE de tres réplicas ($n=3$).

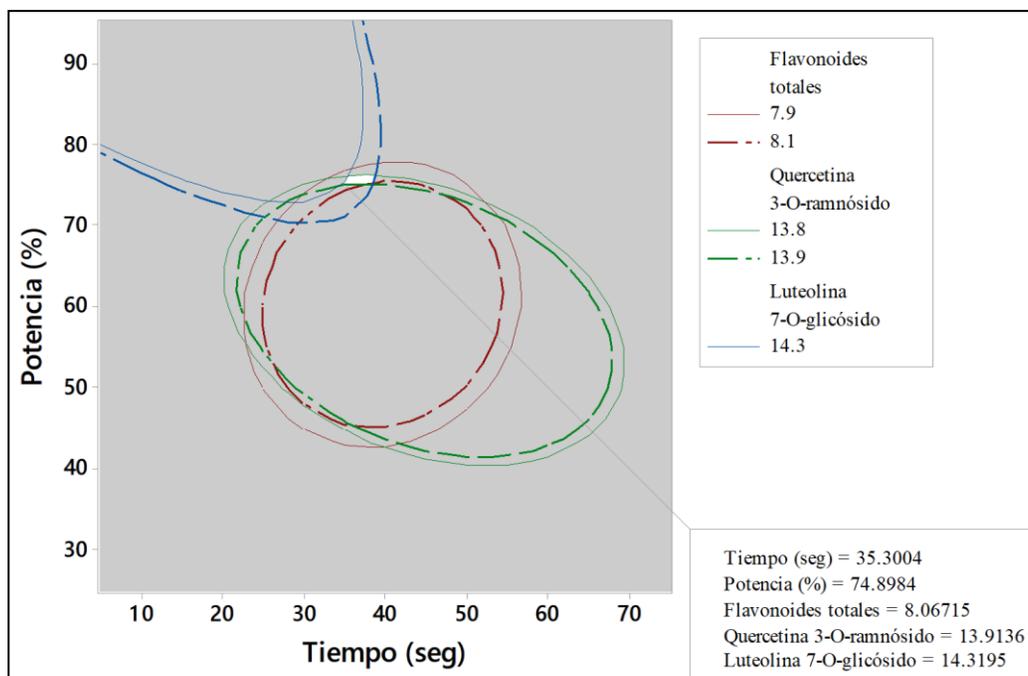


Figura 32. Gráfica de contornos superpuestas de las tres variables para optimizar la extracción de flavonoides totales, quercetina 3-*O*-ramnósido y luteolina 7-*O*-glicósido

En reportes previos de literatura, se reporta la optimización de la extracción de quercetina, isorametina y kaempferol de brócoli y cebolla; los autores fijaron el método de extracción (ultrasonido) por ser el que mejor rendimiento tiene en contraste con la maceración y microondas. Las condiciones óptimas de recuperación fueron 35 minutos, 20 °C y relación sólido líquido 1 g/30 mL de DES (betaína/D-manitol 1:1 molar) (Dai *et al.*, 2019). Fu *et al.* (2021), observaron que el tiempo donde la extracción de compuestos fenólicos totales de cáscara de *Carya cthayensis*, fue 14 min, sin embargo, menciona que esto puede dañar la pared celular pudiendo limitar la transferencia de masa, además de que tiempos largos pueden generar una mayor presión, mayor temperatura y generación de radicales libres. La temperatura con mejores rendimientos fue 70 °C, aunque a tiempos elevados esta temperatura puede destruir los compuestos fenólicos. La potencia de ultrasonicación estudiada fue de 60 a 600 W, observaron que la mejor fue 400 W, debido que si se incrementa puede generar fenómenos sonoquímicos y fuerzas de corte mayores que pueden dañar los fitoquímicos. Según el diseño Box-Behnken las condiciones óptimas para obtener compuestos fenólicos totales fueron 15 min, 40 mL/g de DES y material vegetal, 80 °C de temperatura y 460 W de potencia, que en conjunto extrajeron un total de 61.31 mg equivalentes de ácido gálico/g de peso seco. Concluyen que la sonicación es una herramienta fundamental en la

extracción de bioactivos, debido a los fenómenos fisicoquímicos ocasionados por la cavitación acústica, además de que por la baja presión de vapor del DES mejora la cavitación y por ende la eficiencia (Fu *et al.*, 2021). Nuestros resultados concuerdan con lo antes mencionado.

Sukor *et al.*, (2021) extrajo ácido tánico de cáscara de cebolla por medio de ChCl/urea 1:1 asistido de ultrasonido de sonda, los autores identificaron las condiciones óptimas de extracción las cuales fueron relación sólido líquido 1:10 y un ciclo de trabajo de 10 %, esto se debe a que la sonda que ellos usaron fue de 700 W una potencia fuerte que potencialmente puede destruir los flavonoides. Convirtiendo el % de amplitud a W en el presente estudio se trabajó con 374.45 W, siendo superiores a lo reportado por los autores antes mencionados. Esto se debe a la composición del material usado ya que la cáscara de cebolla contiene en su mayoría fibras insolubles, celulosa, hemicelulosa y polisacáridos (Reddy y Rhim, 2018).

An *et al.* (2021), optimizaron mediante un diseño Box-Behnken la extracción de ácido elágico de cáscara de nuez. El DES con mayor rendimiento fue el ChCl/1,2 propanol 1:1 molar con 30 % de agua, y las condiciones óptimas fueron 70 min de extracción, 199.22 W de potencia del ultrasonido y una relación sólido-líquido de 39.78 mg/mL, obtuvieron 4.35 mg/g del compuesto.

Bajkacz *et al.* (2018) optimizaron simultáneamente la extracción de 8 flavonoides agliconas (rutina, naringenina, hesperidina, neohesperidina, quercetina, kaempferol, naringina y crisina), para ello usaron un diseño central compuesto rotatable de tres factores (temperatura, tiempo y velocidad de agitación), el DES seleccionado fue el compuesto por acetilcolina y ácido láctico 2:1 molar con 30 % de agua. Mencionan que la temperatura y el tiempo fueron significativos sin embargo la interacción entre las variables no lo fue. Las condiciones óptimas fueron 45 min de extracción, 60 °C y una velocidad de agitación de 1400 rpm.

Bajkacz *et al.*, (2020) optimizó la extracción de cuatro catequinas (epigallocatequina, galato de epigallocatequina, galato de galocatequina y galato epigallocatequina), mediante un diseño central compuesto rotatable de tres factores (tiempo, temperatura y relación sólido líquido). Las condiciones óptimas fueron 50 min de extracción, 50 °C y relación sólido líquido 1:10. La R^2 del modelo fue 0.8721 observando un modelo cuadrático. El DES con mejores resultados fue ácido málico/reactivo de Girard 2:1 molar con 30 % de agua.

Bertolo *et al.* (2021) optimizaron la extracción de flavonoides totales de residuos de granada, para ello utilizaron un modelo central compuesto rotatable de cuatro factores, los cuales arrojaron las siguientes condiciones relación sólido-líquido 1 g/20 g de DES (ChCl/ácido láctico), 35 % de ácido

láctico y 75 % de ChCl (peso/peso), 25 min de extracción a 45 °C. Todas las variables fueron significativas con una R^2 de 0.7998. Sin embargo, el modelo presentó falta de ajuste por lo que no se pudo predecir el modelo matemático; los autores mencionan que a pesar de esto se consiguieron las mejores condiciones del proceso.

Bi *et al.* (2013), optimizaron la extracción de miricetina y amentoflavona con DES hechos con alcoholes como HBD; sus resultados difieren de los nuestros ya que el mejor DES evaluado fue el elaborado con ChCl/1,4 butanediol 1:2 molar. Cabe mencionar que también evaluaron el 1,6 hexanediol siendo el que menores resultados arrojó. Esto supone que estos flavonoides tienen una polaridad diferente a la de la quercetina y luteolina glicosiladas resultado de su glicosilación. También se puede deber a que la competición por el anión cloruro entre los flavonoides y el HBD es alta, además de que si el espacio entre las moléculas del HBD es grande puede envolver al anión cloruro permitiendo que solo una molécula más se una. Y por otro lado el exceso de redes de enlaces de hidrógeno producido por el HBD (alcohol), puede producir un impedimento estérico evitando las interacciones entre los flavonoides y el anión cloruro (Bi *et al.*, 2013).

Yoo *et al.* (2018), extrajeron ácidos fenólicos y flavonoides de granos de café; sus resultados concuerdan con los nuestros ya que la mejor combinación de DES fue con ChCl/1,6 hexanediol 1:7 molar y 32.5 % de agua. Las mejores condiciones de proceso fueron 60 °C durante 10 min asistido de ultrasonido. Fu *et al.* (2021), optimizaron la extracción de antocianinas de puré de blueberry. Las condiciones óptimas fueron 3.2 min, 325 W de potencia de ultrasonido, 71 °C y 60 mL/g relación líquido-sólido; esto concuerda con nuestros resultados ya que la potencia y tiempo de extracción fueron muy similares.

Ivanović *et al.* (2021), obtuvieron mayores rendimientos en la extracción de flavonoides glicosilados y agliconas con ChCl/ácido láctico 1:4 molar, sin embargo se observó una mayor afinidad de extracción de flavonoides glicosilados con HBD dioles que con ácidos. Se optimizaron las condiciones de extracción con baño ultrasónico resultando en 85 min y 38 % de agua en el DES. Jeong *et al.* (2017), optimizaron la extracción de flavonas C-glicosiladas de *Cymbidium kanran*, sus resultados concuerdan con los nuestros ya que el mejor DES para su extracción fue el ChCl/dipropilenglicol 1:4 molar, seguido de ChCl/1,6 hexanediol 1:4 molar. Las condiciones óptimas fueron 26 % de agua y 86 min de extracción asistida de ultrasonido (baño). Los autores comentan que los DES sintetizados con polioles pueden aumentar su capacidad de extracción conforme el número de grupos hidroxilo del HBD disminuye. Mientras que en el caso de los dioles

su rendimiento incrementa conforme el largo de la cadena de carbonos (Jeong *et al.*, 2017). Probablemente por dichas razones el 1,6 hexanediol presentó una mayor capacidad de extracción en el presente estudio.

Se ha optimizado la extracción de fenoles totales de *A. cinnamomea* donde el DES seleccionado fue ChCl/ácido malónico 1:1 molar, y las variables de proceso óptimas fueron relación sólido/líquido 40 g/mL, 20 % de agua, 55 °C y 70 min asistido de ultrasonido de baño. El tiempo requerido aumentó considerablemente usando baño con ultrasonido, en cambio con sondas ultrasónicas los tiempos pueden ser de segundos (Chu *et al.*, 2022).

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Cui *et al.* (2015), ya que el DES con mayor capacidad de extracción de genistina, genisteina y apigenina de raíces de frijol tipo guandú, fue el sintetizado con ChCl/1,6 hexanediol 1:7 molar con 30 % de agua. Las condiciones óptimas según el diseño Box-Behnken fueron 600 W de potencia de microondas, relación sólido-líquido 1 g/14 mL, 80 °C y 11 min. Probablemente la polaridad de dichos metabolitos es similar a los estudiados en la presente investigación. Cui *et al.* (2018), optimizaron la extracción de rutina, quercetina-3-*O*-glucósido, quercetina, kaempferol e isoramnetina. Para este caso, el mejor DES fue ChCl/1,4 butanediol 1:3 molar, las condiciones óptimas fueron 1 g/21 mL relación sólido-líquido, 64 °C y 17 min asistido de microondas, obteniendo rendimientos de 8.972, 1.821, 9.104, 0.445 y 0.493 mg/g, respectivamente.

Luo *et al.* (2020), optimizaron las condiciones de extracción de catequinas de té verde, usando ChCl/glicerol; nuestros resultados concuerdan en la optimización ya que la potencia del ultrasonido óptima fue 461.5 W, 21 min de extracción y 1/36 g/mL. Sin embargo, no especifican la temperatura de proceso, difiriendo en los minutos evaluados. Shang *et al.* (2018) optimizaron la extracción de kaempferol y quercetina glicuronizados y glicosilados de hojas de *C. paliurus*. El mejor DES fue ChCl/1,4 butanediol 1:5 molar y los valores óptimos de extracción fueron 30 % de agua, 30 min de extracción, 60 °C y una relación sólido-líquido de 20 mg/mL. Nuestros resultados concuerdan con los descritos previamente ya que se fijó la temperatura en 50 °C.

Plaza *et al.* (2021), optimizaron la extracción de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de cáscara de mangostán, con una extracción optimizada con 18.8 % de agua, 60 % de amplitud y 15 min de extracción. El DES mejor evaluado fue ChCl/ácido láctico 1:2 molar. La amplitud usada fue similar a la mostrada en el presente estudio; cabe mencionar que los W de potencia ejercida son superiores a los usados por los autores.

9.5 Evaluación Antioxidante *in vitro* del Extracto Optimizado (Etapa V)

En el Cuadro 20 se plasmó la actividad antioxidante del extracto optimizado obtenido con DES y con EtOH al 80 %. Se puede observar la baja capacidad para donar electrones (ABTS, DPPH y reducir el ión férrico (FRAP). Sin embargo, la capacidad para donar átomos de hidrógeno fue prometedora (ORAC), como se observa el extracto obtenido con DES fue superior a lo obtenido con EtOH al 80 %.

Cuadro 20. Actividad antioxidante *in vitro* del extracto optimizado

Extracto	Ensayo			
	ABTS (mmol ET/100 g BS)	DPPH (mmol ET/100 g BS)	FRAP (mmol ET/100 g BS)	ORAC (mmol ET/100 g BS)
DES (ChCl/1,6 hexanediol 1:1 molar)	16.67 ± 4.48b	1.64 ± 0.02a	6.18 ± 0.54a	38.66 ± 4.16a
EtOH 80 %	19.75 ± 1.81a	1.79 ± 0.12a	4.19 ± 0.40b	15.86 ± 1.641b

Letras diferentes muestran significancia estadística ($P < 0.05$), según la prueba de Tukey. Los resultados muestran la media ± DE de tres réplicas (n=3).

Nuestros resultados difieren de lo reportado por Santos *et al.* (2021), los cuales extrajeron flavonoides y ácidos fenólicos de cascarilla de diferentes variedades de arroz, los DES usados fueron ChCl/ácido láctico 1:10 molar, ellos obtuvieron una IC_{50} de 180 $\mu\text{g/mL}$ de extracto esto en la inhibición del radical DPPH, esto pudo ser debido a la variedad de fitoquímicos en los extractos. Flavonoides de biomasa de manzana extraídos con ChCl/etilenglicol 1:4 molar presentó mayor inhibición del radical DPPH (84.7 %), al igual obtuvo mayores concentraciones de μmoles equivalentes de Trolox en el ensayo de FRAP (110 mmol/ 100 g de peso seco) (Moni Bottu *et al.*, 2022). Nuestros resultados en este último son superiores, esto por la naturaleza de la biomasa estudiada.

Aceites esenciales extraídos de hojas de *Perillae folium* presentaron una gran capacidad antioxidante donando electrones inhibiendo los radicales ABTS y DPPH con una IC_{50} menor de 5000 $\mu\text{g/mL}$, el DES con mayor extracción fue ChCl/ácido málico 1:1 molar (Chen *et al.*, 2022).

Extractos de hojas de *Terminalia chebula* presentaron una IC_{50} del radical DPPH de 6.64 $\mu\text{g/mL}$, mientras que un contenido de 631,000 mmol equivalentes de $\text{Fe}^{2+}/100$ g de peso seco; el DES con mejores resultados fue el ChCl/ácido málico 1:2 molar con 30 % de agua (Choudhary *et al.*, 2021). Dabetić *et al.* (2020), revelaron que la combinación de ChCl/ácido cítrico 2:1 molar ejerce actividad antioxidante por sí misma debido a la naturaleza del ácido cítrico ya que se ha reportado como un compuesto con actividad antioxidante. Fu *et al.* (2021), extrajeron compuestos fenólicos de cáscaras de *Carya cayathanesis* esto mediante ChCl/ácido málico 1.5/1 molar asistido de ultrasonido (400 W). Observaron que la actividad antioxidante del DES, comparado con los controles, fue superior ya que obtuvieron 30 $\text{mmoles ET}/100$ g de peso seco en la inhibición del radical DPPH. Mientras que en la inhibición del radical ABTS obtuvieron 55 $\text{mmoles ET}/100$ g y en el ensayo FRAP 55 $\text{mmoles ET}/100$ g, señalando que el ultrasonido incrementó la actividad en un 46.1, 73.7 y 137.7 % en comparación con disolventes tradicionales y extracción por calor y agitación. Estos resultados son superiores a lo reportados en la presente investigación, sin embargo se debe principalmente al material vegetal estudiado.

La actividad antioxidante de aceites esenciales de *Litsea cubensis* obtenidos con ChCl/ácido oxálico 1:1 molar, presentaron una inhibición del 50 % del radical DPPH y ABTS con 7,560 $\mu\text{g/mL}$ y 4,520 $\mu\text{g/mL}$ de extracto, respectivamente (Guo *et al.*, 2021). Mansinhos *et al.* (2021), reportaron 28.8, 24, 40 y 112 $\text{mmoles ET}/100$ g de peso seco de hojas de *Lavanda pedunculata* en los ensayos ABTS, DPPH, FRAP y ORAC respectivamente.

Zannou *et al.* (2022), mostraron la capacidad de donar electrones de extractos de *Rhus coriaria* obtenidos con ChCl/ácido láctico 1:2 molar, presentando un contenido máximo de 235,479 $\text{mmol ET}/100$ g (DPPH) y 307,056 mmol equivalentes de sulfato de hierro/ 100 g (FRAP). Cabe mencionar que dichos resultados se obtuvieron extrayendo los compuestos con DES asistido de ultrasonido el cual fue superior a la extracción por agitación.

Zannou y Koca (2022), extrajeron antocianinas de blackberry, dichos extractos fueron superiores a lo reportado en la presente investigación, donde su valor máximo en la inhibición del radical DPPH fue de 6,877 $\text{mmol ET}/100$ g, en FRAP fue de 8,308 mmol equivalentes de sulfato de hierro/100 g. Cabe mencionar que los DES con mayor capacidad antioxidante no fueron los que mayor rendimiento presentaron de fenoles totales, flavonoides o antocianinas; sin embargo, como HBD se usó ácido cítrico y xilitol por lo que los HBD por sí mismo pudieron ejercer actividad antioxidante.

En cuanto a la seguridad en el uso del 1,6 hexanediol se ha reportado como un ingrediente grado alimenticio el cual puede usarse en los recubrimientos y/o empaques de alimentos, excepto los destinados para infantes. En ensayos *in vitro* se observó que no presenta efectos citotóxicos en condrocitos y linfocitos. Se ha observado que el 1,6 Hexanediol diluido en agua al 80 % no mostró irritación en piel de conejo, después de 20 h. Conejos con dosis de hasta 3 g/kg de peso administrado por sonda sobrevivieron, sin embargo, gatos administrados con 10 g /kg de peso murieron, mientras que otros dos sobrevivieron. En ratas no se ha observado signos de neurotoxicidad o alteración histopatológica. Ratas suministradas con 1,6 hexanediol vía parenteral durante 4 y 6 semanas con dosis máximas de 1 g/kg de peso, no presentaron alteraciones salvo un retraso en el desarrollo del crecimiento. La DL_{50} en ratas vía oral es de 3730 mg/kg, en ratones intraperitoneal 1738 mg/kg , mientras que en conejos es superior a 10 g/kg de peso (PubChem, 2022). Yogiara *et al.* (2015), mencionan que el 1,2 hexanediol puede ser usado como un antimicrobiano en cremas y otras aplicaciones cosméticas por lo que es un ingrediente inocuo para formular cosmeceúticos.

10. CONCLUSIONES

La biomasa de pimiento morrón es abundante en metabolitos secundarios principalmente del tipo fenólico como flavonoides, también es fuente de terpenoides, esteroides, saponinas, esteroides y alcaloides, los cuales podrían tener relevancia en aplicaciones biomédicas relacionadas con su potencial antioxidante *in vitro*. Los principales compuestos identificados en la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas fueron esteroides, terpenos, ácidos grasos y alcaloides, lo que confirma su detección en el tamizaje fitoquímico.

Los DES sintetizados presentaron propiedades fisicoquímicas (pH, densidad, viscosidad, conductividad eléctrica) características de los mismos, previamente reportadas en la literatura. Así mismo, el análisis FTIR confirma la modificación de las señales de grupos funcionales característicos debido a la formación de enlaces de hidrógeno entre el HBA y el HBD, corroborando la formación de redes extendidas de enlaces de hidrógeno en proporciones eutécticas, lo cual da origen a sus propiedades de solvatación.

Se logró la extracción de fenoles totales, luteolina 7-*O*-glicósido y quercetina 3-*O*-ramnósido mediante los DES asistidos de ultrasonido, obteniendo 10.31 mg EQ/g BS, 14.14 µg/g BS y 14.54 µg/g BS respectivamente. Así mismo se logró optimizar el proceso de extracción identificando los valores de tiempo (35.3 s) y potencia de sonicación (74.8 %) que maximizan la extracción de flavonoides glicosilados, por lo que podría ser rentable la valorización de la biomasa de pimiento morrón para la extracción de estos fitoquímicos.

El extracto optimizado presentó capacidad antioxidante principalmente en el método ORAC, lo que señala que los flavonoides tienen capacidad de donar protones, lo que indica que podría ser un potente captador de especies reactivas de oxígeno.

Los DES mostraron ser superiores a la extracción de flavonoides totales y glicosilados, en comparación con la extracción con disolventes convencionales, así mismo el uso del ultrasonido como tecnología asistida a los DES es una herramienta que disminuye considerablemente el tiempo de extracción, por lo que ambos métodos pueden ser usados en conjunto para optimizar la extracción de fitoquímicos de materiales vegetales.

La utilización de los DES como disolventes para extraer fitoquímicos es una alternativa factible ya que presenta mayores rendimientos comparado con solventes tradicionales como el etanol, metanol

y agua al igual una actividad antioxidante superior, por lo que su uso para valorizar biomasas y otros subproductos agrícolas no alimenticios puede llegar a ser prometedor tanto para la industria farmacéutica como alimenticia.

11. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un perfil metabolómico con la finalidad de identificar los fitoquímicos presentes en la biomasa de pimiento morrón. Una vez identificados, cuantificar los de interés y determinar cuál de ellos se encuentra en mayor cantidad en la biomasa para posteriormente optimizar la extracción de dicho (s) compuesto (s).

Por otro lado, es importante estudiar la toxicidad *in vitro* e *in vivo* de los HBA, HBD y DES seleccionado para la optimización (ChCl/1,6 hexanediol) esto para dilucidar posibles aplicaciones futuras usando el extracto total conteniendo el DES y los fitoquímicos, en una aproximación con 100 % de economía atómica.

Se sugiere elucidar la formación de enlaces de hidrógeno en los DES, mediante resonancia magnética nuclear de protón, para corroborar la síntesis de los mismos. Al igual que realizar estudios de calorimetría diferencial de barrido por sus siglas en inglés (DSC).

Es importante el aislamiento y purificación de los metabolitos, puesto que podrían ser de utilización para la industria química (estándares cromatográficos), farmacéutica (suplementos) y/o alimenticia (aditivos antioxidantes). Esto podría realizarse mediante diálisis de los extractos para eliminar el DES y aislar los compuestos de interés. Es de relevancia estas operaciones ya que el extracto crudo por su naturaleza (biomasa) puede contener moléculas indeseadas como plaguicidas, metales pesados entre otros xenobióticos.

Si se corrobora que el DES usado no genera toxicidad, este podría ser empleado para estudios *in vivo* para evaluar su eficacia para inhibir enzimas, marcadores moleculares y/o células que ocasionen desórdenes metabólicos o enfermedades crónico degenerativas.

12. REFERENCIAS

- Abbott, A.P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D.L. y Rasheed, R.K. 2004. Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 126(29), 9142-9147.
- Abbott, A.P., Capper, G., Davies, D.L., Rasheed, R.K. y Tambyrajah, V. 2003. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures [10.1039/B210714G]. *Chemical Communications*(1), 70-71.
- Abranches, D.O. y Coutinho, J.A. P. 2022. Type V Deep Eutectic Solvents: Design and Applications. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 100612.
- Ahmad, R., Aldholmi, M., Alqathama, A., Aldossary, S., Bubshait, S., Aljaber, M., Abuhassan, A., Aldarwish, A. y Alateeq, L. 2021. Green and novel ultrasonic extraction with UHPLC-MSMS analysis of natural sweetener (Glycyrrhizic acid) from *Glycyrrhiza glabra*; a multifactorial mechanistic evaluation based on statistical analysis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 77, 105696.
- Ahmadi, R., Hemmateenejad, B., Safavi, A., Shojaeifard, Z., Mohabbati, M. y Firuzi, O. 2018. Assessment of cytotoxicity of choline chloride-based natural deep eutectic solvents against human HEK-293 cells: A QSAR analysis. *Chemosphere*, 209, 831-838.
- Alam, M.A., Muhammad, G., Khan, M.N., Mofijur, M., Lv, Y., Xiong, W. y Xu, J. 2021. Choline chloride-based deep eutectic solvents as green extractants for the isolation of phenolic compounds from biomass. *Journal of Cleaner Production*, 309, 127445.
- Albuquerque, B.R., Heleno, S.A., Oliveira, M.B.P.P., Barros, L. y Ferreira, I.C.F.R. 2021. Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges [10.1039/D0FO02324H]. *Food & Function*, 12(1), 14-29.
- Ali Redha, A. 2021. Review on Extraction of Phenolic Compounds from Natural Sources Using Green Deep Eutectic Solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(3), 878-912.
- Alrugaibah, M., Washington, T.L., Yagiz, Y. y Gu, L. 2021. Ultrasound-assisted extraction of phenolic acids, flavonols, and flavan-3-ols from muscadine grape skins and seeds using natural deep eutectic solvents and predictive modelling by artificial neural networking. *Ultrasonics Sonochemistry*, 79, 105773.
- Amran, M.A., Palaniveloo, K., Fauzi, R., Satar, N.M., Mohidin, T.B., Mohan, G., Razak, S. A., Arunasalam, M., Nagappan, T. y Sathiya Seelan, J.S. 2021. Value-Added Metabolites from Agricultural Waste and Application of Green Extraction Techniques. *Sustainability*, 13(20)
- An, J.Y., Wang, L.T., Wang, J.D., Cai, Z.H., Wang, Y.Q., Zhang, S., Yang, Q. y Fu, Y.J. 2021. An efficiency strategy for extraction and recovery of ellagic acid from waste chestnut shell and its biological activity evaluation. *Microchemical Journal*, 160, 105616.
- Anal, A.K. 2017. Food Processing By-Products and their Utilization: Introduction. In *Food Processing By-Products and their Utilization*. pp. 1-10.
- Anastas, P.T. y Warner, J.C. 1998. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University

Press.

- Andrés-Lacueva, C., Medina-Rejon, A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., Chiva-Blanch, G., Zamora-Ros, R., Rotches-Ribalta, M. y Lamuela-Raventós, R.M. 2009. Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables. In Fruit and Vegetable Phytochemicals. pp. 53-88.
- Antonio, A.S., Wiedemann, L.S.M. y Veiga Junior, V.F. 2018. The genus *Capsicum*: a phytochemical review of bioactive secondary metabolites [10.1039/C8RA02067A]. RSC Advances, 8(45), 25767-25784.
- Anu, A., Sahni, S., Kumar, P. y Prasad, B.D. 2017. Secondary Metabolites in Horticultural Crops In M.W. Siddiqui & K. Prasad (Eds.), plant secondary metabolites. Vol. 1). United States of America: Apple Academic Press Inc. pp. 306.
- Ayabe, S.I., Uchiyama, H., Aoki, T. y Akashi, T. 2010. Plant Phenolics: Phenylpropanoids. In H.W. Liu & L. Mander (Eds.), Comprehensive Natural Products II ELSEVIER. pp. 929-976.
- Azabou, S., Taheur, F.B., Jridi, M., Bouaziz, M. y Nasri, M. 2017. Discarded seeds from red pepper (*Capsicum annuum*) processing industry as a sustainable source of high added-value compounds and edible oil. Environmental Science and Pollution Research, 24(28), 22196-22203.
- Bajkacz, S. y Adamek, J. 2018. Development of a Method Based on Natural Deep Eutectic Solvents for Extraction of Flavonoids from Food Samples. Food Analytical Methods, 11(5), 1330-1344.
- Bajkacz, S., Adamek, J. y Sobska, A. 2020. Application of Deep Eutectic Solvents and Ionic Liquids in the Extraction of Catechins from Tea. Molecules, 25(14)
- Balaraman, H., Selvasembian, R., Rangarajan, V. y Rathnasamy, S. 2021. Sustainable and Green Engineering Insights on Deep Eutectic Solvents toward the Extraction of Nutraceuticals. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 9(34), 11290-11313.
- Ballard, C.R. y Maróstica, M.R. 2019. Chapter 10 - Health Benefits of Flavonoids. In M.R.S. Campos (Ed.), Bioactive Compounds. Woodhead Publishing. pp. 185-201.
- Barrajón-Catalán, E., Álvarez-Martínez, F.J., Borrás, F., Pérez, D., Herrero, N., Ruiz, J.J. y Micol, V. 2020. Metabolomic analysis of the effects of a commercial complex biostimulant on pepper crops. Food Chemistry, 310, 125818.
- Bener, M., Şen, F.B., Önem, A.N., Bekdeşer, B., Çelik, S.E., Lalikoglu, M., Aşçı, Y.S., Capanoglu, E. y Apak, R. 2022. Microwave-assisted extraction of antioxidant compounds from by-products of Turkish hazelnut (*Corylus avellana* L.) using natural deep eutectic solvents: Modeling, optimization and phenolic characterization. Food Chemistry, 385, 132633.
- Benlebna, M., Ruesgas-Ramón, M., Bonafos, B., Fouret, G., Casas, F., Coudray, C., Durand, E., Cruz Figueroa-Espinoza, M. y Feillet-Coudray, C. 2018. Toxicity of Natural Deep Eutectic Solvent Betaine: Glycerol in Rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66(24), 6205-6212.
- Bentley, J., Olsen, E.K., Moore, J.P. y Farrant, J.M. 2020. The phenolic profile extracted from the desiccation-tolerant medicinal shrub *Myrothamnus flabellifolia* using Natural Deep Eutectic Solvents varies according to the solvation conditions. Phytochemistry, 173, 112323.

- Benvenuti, L., Zielinski, A.A.F. y Ferreira, S.R.S. 2019. Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES? *Trends in Food Science & Technology*, 90, 133-146.
- Berbel, J. y Posadillo, A. 2018. Review and Analysis of Alternatives for the Valorisation of Agro-Industrial Olive Oil By-Products. *Sustainability*, 10(1)
- Bertolo, M.R. V., Martins, V.C. A., Plepis, A.M.G. y Bogusz, S. 2021. Utilization of pomegranate peel waste: Natural deep eutectic solvents as a green strategy to recover valuable phenolic compounds. *Journal of Cleaner Production*, 327, 129471.
- Bi, W., Tian, M. y Row, K.H. 2013. Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *Journal of Chromatography A*, 1285, 22-30.
- Bijttebier, S., Zhani, K., D'Hondt, E., Noten, B., Hermans, N., Apers, S. y Voorspoels, S. 2014. Generic Characterization of Apolar Metabolites in Red Chili Peppers (*Capsicum frutescens* L.) by Orbitrap Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(20), 4812-4831.
- Bonacci, S., Di Gioia, M.L., Costanzo, P., Maiuolo, L., Tallarico, S. y Nardi, M. 2020. Natural Deep Eutectic Solvent as Extraction Media for the Main Phenolic Compounds from Olive Oil Processing Wastes. *Antioxidants*, 9(6).
- Boncan, D.A.T., Tsang, S.S.K., Li, C., Lee, I.H.T., Lam, H.M., Chan, T.F. y Hui, J.H.L. 2020. Terpenes and Terpenoids in Plants: Interactions with Environment and Insects. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19).
- Campos-Vega, R. y Oomah, B.D. (2013). Chemistry and classification of phytochemicals. In *Handbook of Plant Food Phytochemicals*. Wiley. pp. 5-48.
- Carvalho Lemos, V., Reimer, J.J. y Wormit, A. 2019. Color for Life: Biosynthesis and Distribution of Phenolic Compounds in Pepper (*Capsicum annuum*). *Agriculture*, 9(4).
- Castro-Garzón, H., Contreras, E.J. y Rodríguez, J.P. 2020. Análisis ambiental: impactos generados por los residuos agrícolas en el municipio de El Dorado (Meta, Colombia). *Revista Espacios*, 41(2), 42-50.
- Cattaneo, A., Federighi, G. y Vaz, S. 2021. The environmental impact of reducing food loss and waste: A critical assessment. *Food Policy*, 98, 101890.
- CCA. 2014. La quema de residuos agrícolas: fuente de dioxinas. CEC. Recuperado de <http://www.cec.org/files/documents/publications/11405-la-quema-de-residuos-agr-colas-es-una-fuente-de-dioxinas-es.pdf>
- Chaverri, J.P. y Rodríguez, N.C. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes. Aspectos básicos. *Educación Química*, 17(2), 164-173.
- Che Zain, M. S., Yeoh, J.X., Lee, S.Y. y Shaari, K. 2021. Physicochemical Properties of Choline Chloride-Based Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) and Their Applicability for Extracting Oil Palm Flavonoids. *Sustainability*, 13(23)
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S. y Abert-Vian, M. 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.

- Chen, L., Hwang, J.E., Gu, K.M., Kim, J.H., Choi, B., Song, K.S., Park, Y. y Kang, Y.H. 2012. Comparative study of antioxidant effects of five Korean varieties red pepper (*Capsicum annuum* L) extracts from various parts including placenta, stalk, and pericarp. *Food Science and Biotechnology*, 21(3), 715-721.
- Chen, Y., Pan, H., Hao, S., Pan, D., Wang, G. y Yu, W. 2021. Evaluation of phenolic composition and antioxidant properties of different varieties of Chinese citrus. *Food Chemistry*, 364, 130413.
- Chen, Z., Ragauskas, A. y Wan, C. 2020. Lignin extraction and upgrading using deep eutectic solvents. *Industrial Crops and Products*, 147, 112241.
- Chen, Z., Wu, K., Zhu, W., Wang, Y., Su, C. y Yi, F. 2022. Chemical compositions and bioactivities of essential oil from perilla leaf (*Perillae Folium*) obtained by ultrasonic-assisted hydro-distillation with natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 375, 131834.
- Chiaiese, P., Corrado, G., Minutolo, M., Barone, A. y Errico, A. 2019. Transcriptional Regulation of Ascorbic Acid During Fruit Ripening in Pepper (*Capsicum annuum*) Varieties with Low and High Antioxidants Content. *Plants*, 8(7).
- Cho, S.Y., Kim, H.W., Lee, M.K., Kim, H.J., Kim, J.B., Choe, J.S., Lee, Y.M. y Jang, H.H. 2020. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities in Relation to the Flavonoids Composition of Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Antioxidants*, 9(10).
- Choudhary, P., Guleria, S., Sharma, N., Salaria, K.H., Chalotra, R., Ali, V. y Vyas, D. 2021. Comparative phenolic content and antioxidant activity of some medicinal plant extracts prepared by choline chloride based green solvents and methanol. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 4, 100224.
- Chu, J., Ming, Y., Cui, Q., Zheng, N., Yang, S., Li, W., Gao, H., Zhang, R. y Cheng, X. 2022. Efficient extraction and antioxidant activity of polyphenols from *Antrodia cinnamomea*. *BMC Biotechnology*, 22(1), 9.
- Cisneros-Zevallos, L. 2021. The power of plants: how fruit and vegetables work as source of nutraceuticals and supplements. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 72(5), 660-664.
- Clarke, C.J., Tu, W.C., Levers, O., Bröhl, A. y Hallett, J.P. 2018. Green and Sustainable Solvents in Chemical Processes. *Chemical Reviews*, 118(2), 747-800.
- Cress, B.F., Linhardt, R.J. y Koffas, M.A.G. (2013). Isoflavonoid Production by Genetically Engineered Microorganisms. In K.G. Ramawat & J.M. Mérillon (Eds.), *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 1647-1681.
- Cui, Q., Liu, J.Z., Wang, L.T., Kang, Y.F., Meng, Y., Jiao, J. y Fu, Y.J. 2018. Sustainable deep eutectic solvents preparation and their efficiency in extraction and enrichment of main bioactive flavonoids from sea buckthorn leaves. *Journal of Cleaner Production*, 184, 826-835.
- Cui, Q., Peng, X., Yao, X.H., Wei, Z.F., Luo, M., Wang, W., Zhao, C.J., Fu, Y.J. y Zu, Y.G. 2015. Deep eutectic solvent-based microwave-assisted extraction of genistin, genistein and apigenin from pigeon pea roots. *Separation and Purification Technology*, 150, 63-72.

- CYTED. 2020. Producción de biometano para combustible de transporte a partir de residuos de biomasa. Recuperado de: https://www.cyted.org/sites/default/files/d8._desarrollo_de_modelos_de_comercializacion.pdf.
- Dabetić, N., Todorović, V., Panić, M., Radojčić R., I. y Šobajić, S. 2020. Impact of Deep Eutectic Solvents on Extraction of Polyphenols from Grape Seeds and Skin. *Applied Sciences*, 10(14).
- Dai, Y. y Row, K.H. 2019. Application of Natural Deep Eutectic Solvents in the Extraction of Quercetin from Vegetables. *Molecules*, 24(12).
- Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G.J., Verpoorte, R. y Choi, Y.H. 2013. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61-68.
- Dai, Y., Witkamp, G.J., Verpoorte, R. y Choi, Y.H. 2013. Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Analytical Chemistry*, 85(13), 6272-6278.
- Dwamena, A.K., Raynie, D.E. 2020. Solvatochromic parameters of Deep Eutectic Solvents: Effect of Different carboxylic Acids as Hydrogen Bond Donor. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 65(2), 640-646.
- de Lucca, A.J., Bland, J.M., Vigo, C.B., Cushion, M., Selitrennikoff, C.P., Peter, J. y Walsh, T.J. 2002. CAY-1, a fungicidal saponin from *Capsicum* sp. fruit. *Medical Mycology*, 40(2), 131-137.
- De Lucca, A.J., Boue, S., Palmgren, M.S., Maskos, K. y Cleveland, T.E. 2006. Fungicidal properties of two saponins from *Capsicum frutescens* and the relationship of structure and fungicidal activity. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(4), 336-342.
- De Oliveira Vigier, K. y Jérôme, F. 2019. Synthesis and Properties. *Deep Eutectic Solvents: Synthesis, Properties, and Applications*. Wiley. pp. 1-23.
- del Puerto Rodríguez, A.M., Suárez Tamayo, S. y Palacio Estrada, D.E. 2014. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 52, 372-387.
- Di Meo, S. y Venditti, P. 2020. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 9829176.
- Di Sotto, A., Vecchiato, M., Abete, L., Toniolo, C., Giusti, A.M., Mannina, L., Locatelli, M., Nicoletti, M. y Di Giacomo, S. 2018. *Capsicum annuum* L. var. Cornetto di Pontecorvo PDO: Polyphenolic profile and in vitro biological activities. *Journal of Functional Foods*, 40, 679-691.
- Díaz-Pérez, J.C. y St. John, K. 2019. Bell Pepper (*Capsicum annum* L.) under Colored Shade Nets: Plant Growth and Physiological Responses. *HortScience horts*, 54(10), 1795-1801.
- Norma Oficial Mexicana NOM-015-SEMARNAT/SAGARPA-2007, Que establece las especificaciones técnicas de métodos de uso del fuego en los terrenos forestales y en los terrenos de uso agropecuario. Recuperado de http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5077654&fecha=16/01/2009.
- Doria, E., Boncompagni, E., Marra, A., Dossena, M., Verri, M. y Buonocore, D. 2021. Polyphenols Extraction From Vegetable Wastes Using a Green and Sustainable Method [Perspective].

5(342).

- Du, Y., Fu, X., Chu, Y., Wu, P., Liu, Y., Ma, L., Tian, H. y Zhu, B. 2022. Biosynthesis and the Roles of Plant Sterols in Development and Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4).
- Duque-Acevedo, M., Belmonte-Ureña, L.J., Cortés-García, F.J. y Camacho-Ferre, F. 2020. Agricultural waste: Review of the evolution, approaches and perspectives on alternative uses. *Global Ecology and Conservation*, 22, e00902.
- Escalante-Araiza, F. y Gutiérrez-Salmeán, G. 2021. Traditional Mexican foods as functional agents in the treatment of cardiometabolic risk factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(8), 1353-1364.
- Estrada, B., Bernal, M.A., Díaz, J., Pomar, F. y Merino, F. 2002. Capsaicinoids in Vegetative Organs of *Capsicum annuum* L. in Relation to Fruiting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1188-1191.
- FAO. 2020a. Food Outlook. Biannual report on global food markets: June 2020. Recuperado de <https://www.fao.org/documents/card/es/c/ca9509en/>.
- FAO. 2020b. Fruit and Vegetables- your dietary essentials. The International Year of Fruits and Vegetables. Recuperado de <https://www.fao.org/3/cb2395en/CB2395EN.pdf>.
- FAO. 2018. Los contaminantes agrícolas: una grave amenaza para el agua del planeta. Recuperado de <https://www.fao.org/news/story/es/item/1141818/icode/#:~:text=La%20agricultura%20moderna%20es%20responsable,de%20millones%20de%20d%C3%B3lares%20EEUU>.
- Farooqui, T. y A. Farooqui, A. 2010. Molecular Mechanism Underlying the Therapeutic Activities of Propolis: A Critical Review. *Current Nutrition & Food Science*, 6(3), 186-199.
- Ferreira, S., Torres-Palazzolo, C., Bottini, R., Camargo, A. y Fontana, A. 2021. Assessment of *in-vitro* bioaccessibility and antioxidant capacity of phenolic compounds extracts recovered from grapevine bunch stem and cane by-products. *Food Chemistry*, 348, 129063.
- Florencio-Ortiz, V., Sellés-Marchart, S., Zubcoff-Vallejo, J., Jander, G. y Casas, J.L. 2018. Changes in the free amino acid composition of *Capsicum annuum* (pepper) leaves in response to *Myzus persicae* (green peach aphid) infestation. A comparison with water stress. *PLoS ONE*, 13(6), e0198093.
- Flores, E.M.M., Cravotto, G., Bizzi, C.A., Santos, D. y Iop, G.D. 2021. Ultrasound-assisted biomass valorization to industrial interesting products: state-of-the-art, perspectives and challenges. *Ultrasonics Sonochemistry*, 72, 105455.
- Fu, X., Belwal, T., He, Y., Xu, Y., Li, L. y Luo, Z. 2022. UPLC-Triple-TOF/MS characterization of phenolic constituents and the influence of natural deep eutectic solvents on extraction of *Carya cathayensis* Sarg. peels: Composition, extraction mechanism and *in vitro* biological activities. *Food Chemistry*, 370, 131042.
- Fu, X., Wang, D., Belwal, T., Xie, J., Xu, Y., Li, L., Zou, L., Zhang, L. y Luo, Z. 2021. Natural deep eutectic solvent enhanced pulse-ultrasonication assisted extraction as a multi-stability protective and efficient green strategy to extract anthocyanin from blueberry pomace. *LWT*, 144, 111220.

- Fu, X., Wang, D., Belwal, T., Xu, Y., Li, L. y Luo, Z. 2021. Sonication-synergistic natural deep eutectic solvent as a green and efficient approach for extraction of phenolic compounds from peels of *Carya cathayensis* Sarg. *Food Chemistry*, 355, 129577.
- Galanakis, C.M. 2013. Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: A viewpoint of opportunities and challenges. *Food and Bioproducts Processing*, 91(4), 575-579.
- Games, P.D., Koscky-Paier, C.R., Almeida-Souza, H.O., Barbosa, M.O., Antunes, P.W.P., Carrijo, L.C., Pereira, P.R.G. y Baracat-Pereira, M.C. 2013. *In vitro* anti-bacterial and anti-fungal activities of hydrophilic plant defence compounds obtained from the leaves of bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88(5), 551-558.
- Garcia, C. y Blesso, C.N. 2021. Antioxidant properties of anthocyanins and their mechanism of action in atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 172, 152-166.
- Genualdi, S.A., Killin, R.K., Woods, J., Wilson, G., Schmedding, D. y Simonich, S.L.M. 2009. Trans-Pacific and Regional Atmospheric Transport of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Pesticides in Biomass Burning Emissions to Western North America. *Environmental Science & Technology*, 43(4), 1061-1066.
- Genzel, F., Dicke, M.D., Junker-Frohn, L.V., Neuwohner, A., Thiele, B., Putz, A., Usadel, B., Wormit, A. y Wiese-Klinkenberg, A. 2021. Impact of Moderate Cold and Salt Stress on the Accumulation of Antioxidant Flavonoids in the Leaves of Two *Capsicum* Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(23), 6431-6443.
- Ghasemi, K., Ghasemi, Y. y Ebrahimzadeh, M. 2009. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 Citrus species peels and tissues. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 22, 277-281.
- Ghazzawi, H.A., Al-Sayyed, H.F., Al-Kurd, R.A., Mwalla, M.M., Arafat, T.A. y AbdelQader, S.M. 2021. Effect of different extraction solvents on the antioxidant content and capacity of nine seasonal fruits. *Clinical Nutrition Open Science*, 38, 33-42.
- Gouda, M., El-Din Bekhit, A., Tang, Y., Huang, Y., Huang, L., He, Y. y Li, X. 2021. Recent innovations of ultrasound green technology in herbal phytochemistry: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 73, 105538.
- Grozdanova, T., Trusheva, B., Alipieva, K., Popova, M., Dimitrova, L., Najdenski, H., Zaharieva, M.M., Ilieva, Y., Vasileva, B., Miloshev, G., Georgieva, M. y Bankova, V. 2020. Extracts of medicinal plants with natural deep eutectic solvents: enhanced antimicrobial activity and low genotoxicity. *BMC Chemistry*, 14(1), 73.
- Guan, R., Van Le, Q., Yang, H., Zhang, D., Gu, H., Yang, Y., Sonne, C., Lam, S.S., Zhong, J., Jianguang, Z., Liu, R. y Peng, W. 2021. A review of dietary phytochemicals and their relation to oxidative stress and human diseases. *Chemosphere*, 271, 129499.
- Guo, Y., Li, Y., Li, Z., Jiang, L., Cao, X., Gao, W., Wang, J., Luo, D. y Chen, F. 2021. Deep eutectic solvent-homogenate based microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from *Litsea cubeba* (Lour.) Pers. fruits and its chemical composition and biological activity. *Journal of Chromatography A*, 1646, 462089.

- Gurnani, N., Gupta, M., Mehta, D. y Mehta, B.K. 2016. Chemical composition, total phenolic and flavonoid contents, and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of crude extracts from red chilli seeds (*Capsicum frutescens* L.). *Journal of Taibah University for Science*, 10(4), 462-470.
- Gutzeit, H.O. y Ludwig-Muller, J. (2014). *Plant Natural Products: Synthesis, Biological Functions and Practical Applications*. H.O. Gutzeit & J. Ludwig-Muller, Eds. Vol. 1. Wiley Blackwell. pp 436.
- Häckl, K. y Kunz, W. 2018. Some aspects of green solvents. *Comptes Rendus Chimie*, 21(6), 572-580.
- Haghdan, S., Renneckar, S. y Smith, G.D. (2016). 1 - Sources of Lignin. In O. Faruk & M. Sain (Eds.), *Lignin in Polymer Composites*. William Andrew Publishing. pp. 1-11.
- Hansen, B.B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J.M., Horton, A., Adhikari, L., Zelovich, T., Doherty, B.W., Gurkan, B., Maginn, E.J., Ragauskas, A., Dadmun, M., Zawodzinski, T.A., Baker, G.A., Tuckerman, M.E., Savinell, R.F. y Sangoro, J.R. 2021. Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chemical Reviews*, 121(3), 1232-1285.
- Harborne, J.B. (1984). *Methods of Plant Analysis*. In J.B. Harborne (Ed.), *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Springer Netherlands. pp. 1-36.
- Hayyan, M., Mbous, Y.P., Looi, C.Y., Wong, W.F., Hayyan, A., Salleh, Z. y Mohd-Ali, O. 2016. Natural deep eutectic solvents: cytotoxic profile. *SpringerPlus*, 5(1), 913.
- Hazekawa, M., Hideshima, Y., Ono, K., Nishinakagawa, T., Kawakubo-Yasukochi, T., Takatani-Nakase, T. y Nakashima, M. 2017. Anti-inflammatory effects of water extract from bell pepper (*Capsicum annuum* L. var. *grossum*) leaves *in vitro*. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(5), 4349-4355.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. y Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Hellweg, S., Fischer, U., Scheringer, M. y Hungerbühler, K. 2004. Environmental assessment of chemicals: methods and application to a case study of organic solvents [10.1039/B402807B]. *Green Chemistry*, 6(8), 418-427.
- Hernández-Pérez, T., Gómez-García, M.D.R., Valverde, M.E. y Paredes-López, O. 2020. *Capsicum annuum* (hot pepper): An ancient Latin-American crop with outstanding bioactive compounds and nutraceutical potential. A review. 19(6), 2972-2993.
- Hernández, E.A. y Ocotero, V.M. 2015. El chile como alimento. *Ciencia*, 66(3), 16-23.
- Herrera-Pool, E., Ramos-Díaz, A.L., Lizardi-Jiménez, M.A., Pech-Cohuo, S., Ayora-Talavera, T., Cuevas-Bernardino, J.C., García-Cruz, U. y Pacheco, N. 2021. Effect of solvent polarity on the Ultrasound Assisted extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from habanero pepper leaves (*Capsicum chinense*) and its identification by UPLC-PDA-ESI-MS/MS. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76, 105658.
- Houghton, P.J. y Raman, A. 1998. Practical exercises in chemical screening and fractionation of crude extracts from plant materials. In P. J. Houghton & A. Raman (Eds.), *Laboratory*

Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Springer US. pp. 154-183.

- Huang, H., Zhu, Y., Fu, X., Zou, Y., Li, Q. y Luo, Z. 2022. Integrated natural deep eutectic solvent and pulse-ultrasonication for efficient extraction of crocins from gardenia fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) and its bioactivities. *Food Chemistry*, 380, 132216.
- Huang, Y., Feng, F., Jiang, J., Qiao, Y., Wu, T., Voglmeir, J. y Chen, Z.G. 2017. Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 221, 1400-1405.
- Husanu, E., Mero, A., Rivera, J.G., Mezzetta, A., Ruiz, J.C., D'Andrea, F., Pomelli, C.S. y Guazzelli, L. 2020. Exploiting Deep Eutectic Solvents and Ionic Liquids for the Valorization of Chestnut Shell Waste. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(50), 18386-18399.
- Ijardar, S.P., Singh, V. y Gardas, R.L. 2022. Revisiting the Physicochemical Properties and Applications of Deep Eutectic Solvents. *Molecules*, 27(4).
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. 2013. Producción de pimienta morrón en casamalla para el sur de Tamaulipas. Recuperado de: <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/942.pdf>.
- Iorizzi, M., Lanzotti, V., Ranalli, G., De Marino, S. y Zollo, F. 2002. Antimicrobial Furostanol Saponins from the Seeds of *Capsicum annuum* L. Var. acuminatum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(15), 4310-4316.
- Ivanović, M., Albrecht, A., Krajnc, P., Vovk, I. y Razboršek, M. I. 2021. Sustainable ultrasound-assisted extraction of valuable phenolics from inflorescences of *Helichrysum arenarium* L. using natural deep eutectic solvents. *Industrial Crops and Products*, 160, 113102.
- Jablonsky, M., Majova, V., Strizincova, P., Sima, J. y Jablonsky, J. 2020. Investigation of Total Phenolic Content and Antioxidant Activities of Spruce Bark Extracts Isolated by Deep Eutectic Solvents. *Crystals*, 10(5).
- Jablonský, M., Škulcová, A., Malvis, A. y Šima, J. 2018. Extraction of value-added components from food industry based and agro-forest biowastes by deep eutectic solvents. *Journal of Biotechnology*, 282, 46-66.
- Jeong, K.M., Yang, M., Jin, Y., Kim, E.M., Ko, J. y Lee, J. 2017. Identification of Major Flavone C-Glycosides and Their Optimized Extraction from *Cymbidium kanran* Using Deep Eutectic Solvents. *Molecules*, 22(11).
- Ji, Q., Yu, X., Yagoub, A. E.G.A., Chen, L. y Zhou, C. 2020. Efficient removal of lignin from vegetable wastes by ultrasonic and microwave-assisted treatment with ternary deep eutectic solvent. *Industrial Crops and Products*, 149, 112357.
- Jiang, Y., Fang, Z., Leonard, W. y Zhang, P. 2021. Phenolic compounds in *Lycium berry*: Composition, health benefits and industrial applications. *Journal of Functional Foods*, 77, 104340.
- Jones, W.P. y Kinghorn, A.D. 2012. Extraction of Plant Secondary Metabolites. In S.D. Sarker & L. Nahar (Eds.), *Natural Products Isolation*. Humana Press. pp. 341-366.
- Jurić, T., Mičić, N., Potkonjak, A., Milanov, D., Dodić, J., Trivunović, Z. y Popović, B.M. 2021. The evaluation of phenolic content, *in vitro* antioxidant and antibacterial activity of *Mentha piperita* extracts obtained by natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 362, 130226.

- Kalhor, P. y Ghandi, K. 2019. Deep Eutectic Solvents for Pretreatment, Extraction, and Catalysis of Biomass and Food Waste. *Molecules*, 24(22).
- Karunanithi, A y Venkatachalam, S. 2019. Ultrasonic-assisted solvent extraction of phenolic compounds from *Opuntia ficus-indica* peel: Phytochemical identification and comparison with soxhlet extraction. *Journal of Food Process Engineering*, 42(5), e13126.
- Kasapidou, E., Sossidou, E. y Mitlianga, P. 2015. Fruit and Vegetable Co-Products as Functional Feed Ingredients in Farm Animal Nutrition for Improved Product Quality. *Agriculture*, 5(4).
- Kavitha, S., Kannah, R.Y., Kumar, G., Gunasekaran, M. y Banu, J.R. 2020. Introduction: sources and characterization of food waste and food industry wastes. In J.R. Banu, G. Kumar, M. Gunasekaran, & S. Kavitha (Eds.), *Food Waste to Valuable Resources Applications and Management*. Vol. 1. London, United Kingdom: Academic Press, ELSEVIER. pp. 455.
- Kawaguchi, Y., Ochi, T., Takaishi, Y., Kawazoe, K. y Lee, K.H. 2004. New Sesquiterpenes from *Capsicum annuum*. *Journal of Natural Products*, 67(11), 1893-1896.
- Khan, F.A., Mahmood, T., Ali, M., Saeed, A. y Maalik, A. 2014. Pharmacological importance of an ethnobotanical plant: *Capsicum annuum* L. *Natural Product Research*, 28(16), 1267-1274.
- Kim, H.U. 2020. Lipid Metabolism in Plants. *Plants*, 9(7).
- Kim, J.S., Ahn, J., Lee, S.J., Moon, B., Ha, T.Y. y Kim, S. 2011. Phytochemicals and Antioxidant Activity of Fruits and Leaves of Paprika (*Capsicum Annuum* L., var. Special) Cultivated in Korea. 76(2), C193-C198.
- Kimura, E.T., Ebert, D.M. y Dodge, P.W. 1971. Acute toxicity and limits of solvent residue for sixteen organic solvents. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 19(4), 699-704.
- Klein, O., Nier, S. y Tamásy, C. 2022. Towards a Circular Bioeconomy? Pathways and Spatialities of Agri-Food Waste Valorisation. 113(2), 194-210.
- Kosseva, M.R. 2020. Sources, characteristics and treatment of plant-based food waste. In M.R. Kosseva & C. Webb (Eds.), *Food Industry Wastes. Assessment and Recuperation of Commodities*. Second ed., Vol. 1. Academic Press, ELSEVIER. pp. 501.
- Koul, B., Yakoob, M. y Shah, M.P. 2022. Agricultural waste management strategies for environmental sustainability. *Environmental Research*, 206, 112285.
- Kumar, K. 2020. Chapter 5 - Nutraceutical potential and utilization aspects of food industry by-products and wastes. In M.R. Kosseva & C. Webb (Eds.), *Food Industry Wastes*. Second Edition. Academic Press. pp. 89-111.
- Kumar, K., Srivastav, S. y Sharanagat, V.S. 2021. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325.
- Kumar, S. y Pandey, A.K. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 162750.
- Lee, J., Koo, N. y Min, D.B. 2004. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. 3(1), 21-33.
- León-Chan, R.G., López-Meyer, M., Osuna-Enciso, T., Sañudo-Barajas, J.A., Heredia, J.B. y León-Félix, J. 2017. Low temperature and ultraviolet-B radiation affect chlorophyll content

- and induce the accumulation of UV-B-absorbing and antioxidant compounds in bell pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Environmental and Experimental Botany*, 139, 143-151.
- Li, X., Jiang, Q., Wang, T., Liu, J. y Chen, D. 2016. Comparison of the Antioxidant Effects of Quercitrin and Isoquercitrin: Understanding the Role of the 6"-OH Group. *Molecules*, 21(9).
- Li, Z. y Niu, S. 2021. Modeling pesticides in global surface soils: Exploring relationships between continuous and discrete emission patterns. *Science of The Total Environment*, 798, 149309.
- Ling, J.K.U., Chan, Y.S., Nandong, J., Chin, S.F. y Ho, B.K. 2020. Formulation of choline chloride/ascorbic acid natural deep eutectic solvent: Characterization, solubilization capacity and antioxidant property. *LWT*, 133, 110096.
- Liu, Y., Liu, H.Y., Xia, Y., Guo, H., He, X.Q., Li, H., Wu, D.T., Geng, F., Lin, F.J., Li, H.B., Zhuang, Q.G. y Gan, R.Y. 2021. Screening and process optimization of ultrasound-assisted extraction of main antioxidants from sweet tea (*Lithocarpus litseifolius* [Hance] Chun). *Food Bioscience*, 43, 101277.
- Lozada, S.M. y García, L. 2019. Estrés oxidativo y antioxidantes: cómo mantener el equilibrio. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, 17(3).
- Lu, W. y Liu, S. 2020. Choline chloride-based deep eutectic solvents (Ch-DESs) as promising green solvents for phenolic compounds extraction from bioresources: state-of-the-art, prospects, and challenges. *Biomass Conversion and Biorefinery*.
- Luo, Q., Zhang, J.R., Li, H.B., Wu, D.T., Geng, F., Corke, H., Wei, X.L. y Gan, R.Y. 2020. Green Extraction of Antioxidant Polyphenols from Green Tea (*Camellia sinensis*). *Antioxidants*, 9(9).
- Ma, W., Tang, W. y Row, K.H. 2017. Characterization of Deep Eutectic Solvents for Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for Phenolics. *Analytical Letters*, 50(14), 2177-2188.
- Macário, I.P.E., Jesus, F., Pereira, J.L., Ventura, S.P.M., Gonçalves, A.M.M., Coutinho, J.A.P. y Gonçalves, F.J.M. 2018. Unraveling the ecotoxicity of deep eutectic solvents using the mixture toxicity theory. *Chemosphere*, 212, 890-897.
- Macário, I.P.E., Oliveira, H., Menezes, A.C., Ventura, S.P.M., Pereira, J.L., Gonçalves, A.M.M., Coutinho, J.A.P. y Gonçalves, F.J.M. 2019. Cytotoxicity profiling of deep eutectic solvents to human skin cells. *Scientific Reports*, 9(1), 3932.
- Macchioni, V., Carbone, K., Cataldo, A., Frascini, R. y Bellucci, S. 2021. Lactic acid-based deep natural eutectic solvents for the extraction of bioactive metabolites of *Humulus lupulus* L.: Supramolecular organization, phytochemical profiling and biological activity. *Separation and Purification Technology*, 264, 118039.
- Majerska, J., Michalska, A. y Figiel, A. 2019. A review of new directions in managing fruit and vegetable processing by-products. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 207-219.
- Mansinhos, I., Gonçalves, S., Rodríguez-Solana, R., Ordóñez-Díaz, J.L., Moreno-Rojas, J.M. y Romano, A. 2021. Ultrasonic-Assisted Extraction and Natural Deep Eutectic Solvents Combination: A Green Strategy to Improve the Recovery of Phenolic Compounds from *Lavandula pedunculata* subsp. *lusitanica* (Chaytor) Franco. *Antioxidants*, 10(4).
- Mardani-Talae, M., Nouri-Ganblani, G., Razmjou, J., Hassanpour, M., Naseri, B. y Asgharzadeh, A. 2016. Effects of Chemical, Organic and Bio-Fertilizers on Some Secondary Metabolites

in the Leaves of Bell Pepper (*Capsicum annuum*) and Their Impact on Life Table Parameters of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*, 109(3), 1231-1240.

- Maya-Cano, D.A., Arango-Varela, S. y Santa-Gonzalez, G.A. 2021. Phenolic compounds of blueberries (*Vaccinium* spp) as a protective strategy against skin cell damage induced by ROS: A review of antioxidant potential and antiproliferative capacity. *Heliyon*, 7(2), e06297.
- Mbous, Y.P., Hayyan, M., Wong, W.F., Looi, C.Y. y Hashim, M.A. 2017. Unraveling the cytotoxicity and metabolic pathways of binary natural deep eutectic solvent systems. *Scientific Reports*, 7(1), 41257.
- Mišan, A., Nađpal, J., Stupar, A., Pojić, M., Mandić, A., Verpoorte, R. y Choi, Y. H. 2020. The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(15), 2564-2592.
- Mohd Fuad, F., Mohd Nadzir, M. y Harun@Kamaruddin, A. 2021. Hydrophilic natural deep eutectic solvent : A review on physicochemical properties and extractability of bioactive compounds. *Journal of Molecular Liquids*, 339, 116923.
- Moni Bottu, H., Mero, A., Husanu, E., Tavernier, S., Pomelli, C.S., Dewaele, A., Bernaert, N., Guazzelli, L. y Brennan, L. 2022. The ability of deep eutectic solvent systems to extract bioactive compounds from apple pomace. *Food Chemistry*, 386, 132717.
- Moshtaghian, H., Bolton, K. y Roust, K. 2021. Challenges for Upcycled Foods: Definition, Inclusion in the Food Waste Management Hierarchy and Public Acceptability. *Foods*, 10(11).
- Nayak, A. y Bhushan, B. 2019. An overview of the recent trends on the waste valorization techniques for food wastes. *Journal of Environmental Management*, 233, 352-370.
- Nguyen, V.T. 2017. Potential, Uses and Future Perspectives of Agricultural Wastes. In V.T. Nguyen (Ed.), *Recovering Bioactive Compounds from Agricultural Wastes*. Vol. 1. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd. pp. 269.
- Noumedem, J.A.K., Mihasan, M., Lacmata, S.T., Stefan, M., Kuate, J.R. y Kuete, V. 2013. Antibacterial activities of the methanol extracts of ten Cameroonian vegetables against Gram-negative multidrug-resistant bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 26.
- Oliveira, G., Marques, C., de Oliveira, A., de Almeida dos Santos, A., do Amaral, W., Ineu, R. P., Leimann, F.V., Peron, A.P., Igarashi-Mafra, L. y Mafra, M.R. 2021. Extraction of bioactive compounds from *Curcuma longa* L. using deep eutectic solvents: *In vitro* and *in vivo* biological activities. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 70, 102697.
- ONU. 2020. El impacto de las quemadas agrícolas: un problema de calidad del aire. Recuperado de <https://www.unep.org/es/noticias-y-reportajes/reportajes/el-impacto-de-las-quemadas-agricolas-un-problema-de-calidad-del-aire>.
- Pacheco-Fernández, I. y Pino, V. 2019. Green solvents in analytical chemistry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 18, 42-50.
- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R.L. y Duarte, A.R.C. 2014. Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), 1063-1071.

- Pandey, A. y Pandey S. 2014. Solvatochromic Probe Behavior within Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents: Effect of Temperature and Water. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(50), 14652-14661.
- Pandey, A., Rai, R., Pal, M. y Pandey, S. 2014. How polar are choline chloride-based deep eutectic solvents?. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(4), 1559-1568.
- Percevault, L., Limanton, E., Nicolas, P., Paquin, L. y Lagrost, C. 2021. Electrochemical Determination and Antioxidant Capacity Modulation of Polyphenols in Deep Eutectic Solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(2), 776-784.
- Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J. y Lampi, A.M. 2000. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. 80(7), 939-966.
- Pinto, M.T.T. y Alvarez, F. 2018. Aspectos generales del manejo agronomico del pimiento en Chile. Recuperado de <https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/6651>.
- Plaza, M., Domínguez-Rodríguez, G., Sahelices, C. y Marina, M.L. 2021. A Sustainable Approach for Extracting Non-Extractable Phenolic Compounds from Mangosteen Peel Using Ultrasound-Assisted Extraction and Natural Deep Eutectic Solvents. *Applied Sciences*, 11(12).
- Polenta, G. 2016. El aprovechamiento de subproductos como estrategia para la prevención de pérdidas y desperdicios en alimentos. Recuperado de: <https://www.cyted.org/sites/default/files/Aprovechamiento%20de%20subproductos%20y%20valorizacion%20de%20recursos%20autoctonos%20interrelacion%20investigacion%20-%20produccion%20-%20desarrollo%20y%20sociedad.pdf>.
- Prabakaran, S., Ramu, L., Veerappan, S., Pemiah, B. y Kannappan, N. 2017. Effect of different solvents on volatile and non-volatile constituents of red bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and their *in vitro* antioxidant activity. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(4), 1531-1541.
- Prokopenko, Y.S., Georgiyants, V.A., Mishchenko, V.A. y Garnaya, S.V. 2013. Lipophilic Compounds from Leaves and Stems of *Capsicum annuum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 49(4), 738-739.
- Radošević, K., Čanak, I., Panić, M., Markov, K., Bubalo, M.C., Frece, J., Srček, V.G. y Redovniković, I.R. 2018. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(14), 14188-14196.
- Radošević, K., Cvjetko B.M., Gaurina S.V., Grgas, D., Landeka D.T. y Radojčić R.I. 2015. Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112, 46-53.
- Ranjha, M.M.A.N., Irfan, S., Lorenzo, J.M., Shafique, B., Kanwal, R., Pateiro, M., Arshad, R. N., Wang, L., Nayik, G.A., Roobab, U. y Aadil, R.M. 2021. Sonication, a Potential Technique for Extraction of Phytoconstituents: A Systematic Review. *Processes*, 9(8).
- Rao, M.V., Sengar, A.S., Sunil, C K., y Rawson, A. 2021. Ultrasonication - A green technology extraction technique for spices: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 975-991.
- RAPAM. 2017. Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México Recuperado de:

<https://www.rapam.org/wp-content/uploads/2017/09/Libro-Plaguicidas-Final-14-agst-2017sin-portada.pdf>.

- Reddy, A.V.B., Moniruzzaman, M., Madhavi, V. y Jaafar, J. (2020). Chapter 8 - Recent improvements in the extraction, cleanup and quantification of bioactive flavonoids. In R. Attur (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 66. ELSEVIER. pp. 197-223.
- Reddy, J.P. y Rhim, J.W. 2018. Extraction and Characterization of Cellulose Microfibers from Agricultural Wastes of Onion and Garlic. *Journal of Natural Fibers*, 15(4), 465-473.
- Rehfeldt, S.C., Silva, J., Alves, C., Pinteus, S., Pedrosa, R., Laufer, S. y Goettert, M.I. 2022. Neuroprotective Effect of Luteolin-7-*O*-Glucoside against 6-OHDA-Induced Damage in Undifferentiated and RA-Differentiated SH-SY5Y Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6).
- Rocchetti, G., Gregorio, R.P., Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Oliveira, P.G., Prieto, M.A., Simalgandara, J., Mosele, J.I., Motilva, M.J., Tomas, M., Patrone, V., Capanoglu, E. y Lucini, L. 2022. Functional implications of bound phenolic compounds and phenolics–food interaction: A review. 21(2), 811-842.
- Romo-Hualde, A., Yetano-Cunchillos, A.I., González-Ferrero, C., Sáiz-Abajo, M.J. y González-Navarro, C.J. 2012. Supercritical fluid extraction and microencapsulation of bioactive compounds from red pepper (*Capsicum annum* L.) by-products. *Food Chemistry*, 133(3), 1045-1049.
- Ruegas-Ramón, M., Figueroa-Espinoza, M.C. y Durand, E. 2017. Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(18), 3591-3601.
- SADER. 2020. Mi parcela no se quema. Gobierno de México. Recuperado de: <https://www.gob.mx/agricultura/acciones-y-programas/miparcelanosequema>.
- SADER. 2021. El fuego ya no es una alternativa. Gobierno de México. Recuperado de: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/el-fuego-ya-no-es-una-alternativa>.
- Santana, A.P.R., Mora-Vargas, J.A., Guimarães, T.G.S., Amaral, C.D.B., Oliveira, A. y Gonzalez, M.H. 2019. Sustainable synthesis of natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods. *Journal of Molecular Liquids*, 293, 111452.
- Santos, M.C., Barouh, N., Durand, E., Baréa, B., Robert, M., Micard, V., Lullien-Pellerin, V., Villeneuve, P., Cameron, L.C., Ryan, E.P., Ferreira, M.S. y Bourlieu-Lacanal, C. 2021. Metabolomics of Pigmented Rice Coproducts Applying Conventional or Deep Eutectic Extraction Solvents Reveal a Potential Antioxidant Source for Human Nutrition. *Metabolites*, 11(2).
- Schaeffer, N., Abranches, D.O., Silva, L.P., Martins, M.A.R., Carvalho, P.J., Russina, O., Triolo, A., Paccou, L., Guinet, Y., Hedoux, A. y Coutinho, J.A.P. 2021. Non-Ideality in Thymol + Menthol Type V Deep Eutectic Solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(5), 2203-2211.
- Seidel, V. 2012. Initial and Bulk Extraction of Natural Products Isolation. In S.D. Sarker & L. Nahar (Eds.), *Natural Products Isolation*. Humana Press. pp. 27-41.
- Shafie, M.H., Yusof, R. y Gan, C.Y. 2019. Synthesis of citric acid monohydrate-choline chloride

based deep eutectic solvents (DES) and characterization of their physicochemical properties. *Journal of Molecular Liquids*, 288, 111081.

- Shang, X., Tan, J.N., Du, Y., Liu, X. y Zhang, Z. 2018. Environmentally-Friendly Extraction of Flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja Leaves with Deep Eutectic Solvents and Evaluation of Their Antioxidant Activities. *Molecules*, 23(9).
- Sharma, H.K. y Kaur, M. 2018. Utilization of Waste from Tropical Fruits. In A.K. Anal (Ed.), *Food Processing By-Products and their Utilization*. Vol. 1. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd. pp. 583.
- Shishov, A., Bulatov, A., Locatelli, M., Carradori, S. y Andruch, V. 2017. Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review. *Microchemical Journal*, 135, 33-38.
- SIAP. 2021. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Consultado de: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- Siemińska-Kuczer, A., Szymańska-Chargot, M. y Zdunek, A. 2022. Recent advances in interactions between polyphenols and plant cell wall polysaccharides as studied using an adsorption technique. *Food Chemistry*, 373, 131487.
- Sillero, L., Prado, R., Welton, T. y Labidi, J. 2021. Extraction of flavonoid compounds from bark using sustainable deep eutectic solvents. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 24, 100544.
- Silva, L.R., Azevedo, J., Pereira, M.J., Valentão, P. y Andrade, P.B. 2013. Chemical assessment and antioxidant capacity of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 240-248.
- Smith, E.L., Abbott, A.P. y Ryder, K.S. 2014. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060-11082.
- Sosa, F.H.B., Abranches, D.O., da Costa L.A.M., Coutinho, J.A.P. y da Costa, M.C. 2020. Kraft Lignin Solubility and Its Chemical Modification in Deep Eutectic Solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(50), 18577-18589.
- Srinivasan, K. 2016. Biological Activities of Red Pepper (*Capsicum annuum*) and Its Pungent Principle Capsaicin: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(9), 1488-1500.
- Stergiopoulou, T., De Lucca, A.J., Meletiadis, J., Sein, T., Boue, S.M., Schaufele, R., Roilides, E., Ghannoum, M. y Walsh, T.J. 2008. *In vitro* activity of CAY-1, a saponin from *Capsicum frutescens*, against *Microsporum* and *Trichophyton* species. *Medical Mycology*, 46(8), 805-810.
- Sukor, N.F., Selvam, V.P., Jusoh, R., Kamarudin, N.S. y Rahim, S.A. 2021. Intensified DES mediated ultrasound extraction of tannic acid from onion peel. *Journal of Food Engineering*, 296, 110437.
- Sung, J. y Lee, J. 2016. Capsicoside G, a furostanol saponin from pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds, suppresses adipogenesis through activation of AMP-activated protein kinase in 3T3-L1 cells. *Journal of Functional Foods*, 20, 148-158.
- Surjadinata, B.B., Jacobo-Velázquez, D.A. y Cisneros-Zevallos, L. 2021. Physiological role of reactive oxygen species, ethylene, and jasmonic acid on UV light induced phenolic biosynthesis in wounded carrot tissue. *Postharvest Biology and Technology*, 172, 111388.

- Sylla, N., Bouyahya, A., Taha, D., Dakka, N. y Elhajji, H. 2021. Study of the antioxidant and antidiabetic activity *in vitro* of free and encapsulated phenolic compounds of olive pomace. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 36, 102126.
- Tang, J., Diao, P., Shu, X., Li, L. y Xiong, L. 2019. Quercetin and Quercitrin Attenuates the Inflammatory Response and Oxidative Stress in LPS-Induced RAW264.7 Cells: *In Vitro* Assessment and a Theoretical Model. *BioMed Research International*, 2019, 7039802.
- Tankeo, S.B., Lacmata, S.T., Noumedem, J.A.K., Dzoyem, J.P., Kuate, J.R. y Kuete, V. 2014. Antibacterial and antibiotic-potential activities of some Cameroonian food plants against multi-drug resistant gram-negative bacteria. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 20(7), 546-554.
- Torres-Vega, J., Gómez-Alonso, S., Pérez-Navarro, J., Alarcón-Enos, J. y Pastene-Navarrete, E. 2021. Polyphenolic Compounds Extracted and Purified from *Buddleja Globosa* Hope (Buddlejaceae) Leaves Using Natural Deep Eutectic Solvents and Centrifugal Partition Chromatography. *Molecules*, 26(8).
- Tsao, R. y McCallum, J. 2009. Chemistry of Flavonoids. In *Fruit and Vegetable Phytochemicals*. Wiley. pp. 131-153.
- Upchurch, R.G. 2008. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters*, 30(6), 967-977.
- Vermerris, W. y Nicholson, R. (2006). Families of Phenolic Compounds and Means of Classification. In W. Vermerris & R. Nicholson (Eds.), *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer Netherlands. pp. 1-34.
- Vinayaka, K.S., Nandini, K.C., Rakshitha, M.N., Ramya, M., Shruthi, J., Shruthi, V., Prashith, K. T.R. y Raghavendra, H.L. 2010. Proximate Composition, Antibacterial and Anthelmintic Activity of *Capsicum frutescens* (L.) Var. Longa (Solanaceae) Leaves. *Pharmacognosy Journal*, 2(12), 486-491.
- Vuolo, M.M., Lima, V.S. y Maróstica Junior, M.R. (2019). Chapter 2 - Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. In M.R.S. Campos (Ed.), *Bioactive Compounds*. Woodhead Publishing. pp. 33-50.
- Wang, J. y Wang S. (2019). Preparation, modification and environmental application of biochar: A review. *Journal of Cleaner Production*, 222, 1002-1022.
- Wahyuni, Y., Ballester, A.R., Sudarmonowati, E., Bino, R.J. y Bovy, A.G. 2013. Secondary Metabolites of Capsicum Species and Their Importance in the Human Diet. *Journal of Natural Products*, 76(4), 783-793.
- Wang, M., Wang, J., Zhou, Y., Zhang, M., Xia, Q., Bi, W. y Chen, D.D. Y. 2017. Ecofriendly Mechanochemical Extraction of Bioactive Compounds from Plants with Deep Eutectic Solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(7), 6297-6303.
- Wang, M., Zhao, H., Wen, X., Ho, C.T. y Li, S. 2021. Citrus flavonoids and the intestinal barrier: Interactions and effects. 20(1), 225-251.
- Wang, R., Zhang, W., He, R., Li, W. y Wang, L. 2021. Customized Deep Eutectic Solvents as Green Extractants for Ultrasonic-Assisted Enhanced Extraction of Phenolic Antioxidants from Dogbane Leaf-Tea. 10(11), 2527.

- Wang, Y., Ma, C., Liu, C., Lu, X., Feng, X. y Ji, X. 2020. Thermodynamic Study of Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents with Water and Methanol. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 65(5), 2446-2457.
- Williamson, G. (2020). Chapter 34 - Dietary flavonoids. In B. P. Marriott, D. F. Birt, V. A. Stallings, & A. A. Yates (Eds.), *Present Knowledge in Nutrition* (11 Edition). Academic Press. pp. 561-572.
- Xiong, Y., Zhang, P., Warner, R.D. y Fang, Z. 2021. *In vitro* and cellular antioxidant activities of 3-deoxyanthocyanidin colourants. *Food Bioscience*, 42, 101171.
- Xu, M., Ran, L., Chen, N., Fan, X., Ren, D. y Yi, L. 2019. Polarity-dependent extraction of flavonoids from citrus peel waste using a tailor-made deep eutectic solvent. *Food Chemistry*, 297, 124970.
- Yang, L., Xiao, X. y Gu, K. 2021. Agricultural Waste Recycling Optimization of Family Farms Based on Environmental Management Accounting in Rural China. *Sustainability*, 13(10).
- Yogiara., Hwang, S.J., Park, S., Hwang, J.K. y Pan, J.G. 2015. Food-grade antimicrobials potentiate the antibacterial activity of 1,2-hexanediol. 60(5), 431-439.
- Yoo, D.E., Jeong, K.M., Han, S.Y., Kim, E.M., Jin, Y. y Lee, J. 2018. Deep eutectic solvent-based valorization of spent coffee grounds. *Food Chemistry*, 255, 357-364.
- Younas, M., Hano, C., Giglioli-Guivarc'h, N. y Abbasi, B.H. 2018. Mechanistic evaluation of phytochemicals in breast cancer remedy: current understanding and future perspectives [10.1039/C8RA04879G]. *RSC Advances*, 8(52), 29714-29744.
- Zannou, O. y Koca, I. 2022. Greener extraction of anthocyanins and antioxidant activity from blackberry (*Rubus* spp) using natural deep eutectic solvents. *LWT*, 158, 113184.
- Zannou, O., Pashazadeh, H., Galanakis, C.M., Alamri, A.S. y Koca, I. 2022. Carboxylic acid-based deep eutectic solvents combined with innovative extraction techniques for greener extraction of phenolic compounds from sumac (*Rhus coriaria* L.). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 30, 100380.
- Zaynab, M., Fatima, M., Sharif, Y., Sughra, K., Sajid, M., Khan, K.A., Sneharani, A.H. y Li, S. 2021. Health and environmental effects of silent killers Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyl. *Journal of King Saud University - Science*, 33(6), 101511.
- Zeng, Z., Centner, C., Gollhofer, A. y König, D. 2021. Effects of Dietary Strategies on Exercise-Induced Oxidative Stress: A Narrative Review of Human Studies. *Antioxidants*, 10(4).
- Zhang, Q., De Oliveira, K., Royer, S. y Jérôme, F. 2012. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications [10.1039/C2CS35178A]. *Chemical Society Reviews*, 41(21), 7108-7146.
- Zhao, B.Y., Xu, P., Yang, F.X., Wu, H., Zong, M.H. y Lou, W.Y. 2015. Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application to the Extraction of Rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 3(11), 2746-2755.
- Zhu, L., Li, W., Deng, Z., Li, H. y Zhang, B. 2020. The Composition and Antioxidant Activity of Bound Phenolics in Three Legumes, and Their Metabolism and Bioaccessibility of Gastrointestinal Tract. *Foods*, 9(12).

- Zimmer, A.R., Leonardi, B., Miron, D., Schapoval, E., Oliveira, J.R.D. y Gosmann, G. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(1), 228-233.
- Zou, Y., Zhang, M., Zhang, T., Wu, J., Wang, J., Liu, K. y Zhan, N. 2018. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Cynaroside from *Elsholtzia bodinieri*. *Natural Product Communications*, 13(11), 1934578X1801301122.