



Instituto Tecnológico de Veracruz

Universidad de Cádiz

**Termodinámica del proceso de obtención
de extractos secos de *Moringa oleifera***

Tesis

Que para obtener los grados de:

Doctor en Ciencias en Alimentos

Doctor en Recursos Agroalimentarios

Presenta:

M.C. LUCIO ABEL VÁZQUEZ LEÓN

Asesores:

Dra. Guadalupe del Carmen Rodríguez Jimenes

Dr. Gerardo Fernández Barbero

H. Veracruz, Ver. Méx.

Junio 2018

RESUMEN

Vázquez León, Lucio Abel. Doctorado en Ciencias en Alimentos - Instituto Tecnológico de Veracruz. Doctorado en Recursos Agroalimentarios – Universidad de Cádiz. Junio 2018. **Termodinámica del proceso de obtención de extractos secos de *Moringa oleifera***. Asesores: Dra. Guadalupe del Carmen Rodríguez Jimenes, Dr. Gerardo Fernández Barbero.

Las hojas de moringa (*Moringa oleifera*) son una fuente importante de compuestos fenólicos con acciones terapéuticas. Su cultivo se ha extendido ampliamente debido a los beneficios que representan su explotación y consumo. En el presente trabajo, se propuso estudiar el proceso de obtención de extractos secos de moringa atendiendo criterios térmicos y de calidad. Se consideraron aspectos relacionados con la recolección del vegetal, la extracción sólido-líquido a partir de hojas de moringa y el secado por aspersion con nitrógeno en ciclo cerrado (SACC) de extractos alcohólicos. En la primera etapa del trabajo se evaluó el efecto de la edad del árbol, los factores climáticos y los parámetros físicos y químicos del suelo sobre el contenido de ácido gálico, fenoles totales, carotenoides totales y ácido ascórbico; y sobre la actividad antirradical de extractos de moringa. El análisis de datos mostró que los compuestos de referencia y la actividad antirradical de las hojas de moringa presentaron correlación con los factores climáticos (precipitación, temperatura y radiación) y con los nutrientes del suelo (principalmente con K y P). Posteriormente se realizaron cinéticas de extracción de hojas secas de moringa con etanol:agua 80:20 (p/p) para evaluar sus propiedades de equilibrio y de transferencia de masa. Las extracciones se realizaron a diferentes tamaños de partícula, temperaturas y relaciones de muestra/disolvente. Con los datos obtenidos, se calcularon los parámetros de equilibrio: solución retenida específica por gramo de inerte (M) y constante de distribución entre fases al equilibrio (K_{eq}). Se definieron las condiciones de operación para obtener el rendimiento máximo de extracción con la concentración máxima del extracto: tres etapas, relación de muestra/disolvente ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) de 0.03, 120 min por cada etapa a 55 °C y con hoja entera. En la siguiente etapa se evaluó el efecto de diferentes proporciones (p/p) de material de soporte:sólidos de extracto y de distintas temperaturas de entrada y de salida del gas de secado sobre el rendimiento del proceso, la retención de quercetina-3-rutinósido (Q3R) y kaempferol-3-glucósido (K3G) y el consumo de energía durante el SACC del extracto de moringa. Se usó una mezcla 95:5 (p/p) de maltodextrina DE-10 (M) y sílice precipitada (S) como material de soporte. Finalmente, se evaluó el efecto de la temperatura (25 y 50 °C) y la humedad relativa de almacenamiento (25, 50 y 75%) sobre la estabilidad del contenido de Q3G y K3G en extractos secos de moringa. Las condiciones de SACC que permitieron el menor consumo de energía ($80 \text{ kW}\cdot\text{h}\cdot\text{kg}_{\text{ss}}^{-1}$), el mayor rendimiento de proceso (57.8%) y la mayor retención de Q3R (71.3%) y K3G (65.5%), corresponden a temperaturas de entrada y salida de 140 y 60 °C, respectivamente, a una proporción de 3 g de MS por g de sólidos de extracto. La adición de S permitió mayor estabilidad de las partículas secas de moringa.



ABSTRACT

Vázquez León, Lucio Abel. Doctorado en Ciencias en Alimentos - Instituto Tecnológico de Veracruz. Doctorado en Recursos Agroalimentarios – Universidad de Cádiz. June 2015. **Thermodynamic of obtaining process of Moringa oleifera dry extracts**. Advisors: PhD. Guadalupe del Carmen Rodríguez Jimenes, PhD. Gerardo Fernández Barbero.

Moringa leaves (*Moringa oleifera*) are an important source of phenolic compounds with therapeutic action. Moringa crops have increase due to the benefits of its exploitation and consumption. In the present work, it was proposed to study the obtaining process of moringa dry extracts according to both thermal and quality criteria. Aspects related to moringa leaves harvest, solid-liquid extraction from moringa leaves and spray drying with nitrogen in closed loop (SDCL) of alcoholic extracts were considered. In the first stage of the work, the effects of the tree age, the climatic factors and physical and chemical parameters of the soil on the content of gallic acid, total phenols, total carotenoids and ascorbic acid, and on the antiradical activity of ethanolic extracts from moringa-dried leaves were evaluated. Multivariate data analysis showed that the bioactive compounds measured as reference and the antiradical activity from moringa leaves presented correlation with climatic factors (precipitation, humidity and radiation) and with soil nutrients (principally with K and P). In the next stage, fundamental information on the mass transfer properties and the concentration distribution between phases at the equilibrium were estimated from solid-liquid extraction kinetics in a single stage from moringa-dried leaves. A mixture of ethanol:water 80:20 (w/w) was used as solvent. The extractions were carried out at different particle sizes, temperatures and sample/solvent ratios. With the obtained data, the equilibrium parameters were calculated: specific retained solution per inert gram (M) and distribution constant between phases at equilibrium (K_{eq}). Process conditions were defined to produce the maximum extraction yield with the maximum extract concentration: a feed as whole dry leaves to decrease the retained solution, extraction temperature of 55 °C, an extraction time of 120 min by each extraction stage, solid to solvent ratio of 0.03 g·g⁻¹. In the third stage, the extracts were spray dried at different inlet and outlet temperatures. A mixture of 95:5 (w/w) of maltodextrin DE10:precipitated silica (MS) was used as carrier material. The process yield and retention of both kaempferol-3-glucoside (K3G) and quercetin-3-rutinoside (Q3R) and the energy consumption during the SDCL of moringa extract were evaluated. Finally, the effects of temperature (25 and 50 °C) and relative humidity (25, 50 and 75%) on the stability of the content of Q3G and K3G in moringa-dried extracts were evaluated. The SACC conditions that allowed the lowest energy consumption (80 kW·h·kg_{ss}⁻¹), the highest process yield (57.8%) and the highest retention of Q3R (71.3%) and K3G (65.5%) correspond to inlet and outlet temperatures of 140 and 60 °C, respectively, at a ratio of 3 g of MS per g of extract solids. The addition of precipitated silica allowed greater stability of the moringa-dried particles.

CONTENIDO

RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
CONTENIDO.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 ANTECEDENTES.....	4
2.1 <i>Moringa oleifera</i> Lam.....	4
2.2 Obtención de extractos secos de plantas de uso medicinal.....	7
2.3 Secado convectivo de plantas de uso medicinal.....	11
2.4 Proceso de extracción de compuestos bioactivos a partir de materiales vegetales.....	12
2.4.1 Consideraciones en el proceso de extracción sólido-líquido.....	16
2.4.2 Extracción por lote en etapas múltiples a contracorriente (EMC).....	18
2.4.3 Modelación y simulación del proceso de extracción por lote en etapas múltiples a contracorriente.....	19
2.5 Secado por aspersión de extractos vegetales.....	21
2.5.1 Materiales de soporte utilizados en secado por aspersión de extractos vegetales.....	23
2.5.2 Secado por aspersión en ciclo cerrado como alternativa para el secado de extractos orgánicos obtenidos de materiales vegetales.....	24
2.5.3 Modelación del proceso de secado por aspersión.....	26
2.6 Pruebas aceleradas de estabilidad de compuestos bioactivos.....	34
2.7 Síntesis de antecedentes.....	34
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo general.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
4.1 Estudio de las variaciones del contenido de compuestos bioactivos y actividad antirradical de hojas de moringa.....	38
4.1.1 Sitio de cultivo de la materia prima.....	38



4.1.2	Reactivos y disolventes	38
4.1.3	Preparación de la muestra	39
4.1.4	Extracción asistida por ultrasonido	39
4.1.4.1	Determinación de actividad antirradical por ensayo DPPH	39
4.1.4.2	Determinación de actividad antirradical por ensayo ABTS	40
4.1.4.3	Cuantificación de fenoles totales (CFT).....	40
4.1.4.4	Cuantificación de ácido gálico por HPLC	41
4.1.5	Cuantificación de carotenoides totales	41
4.1.6	Determinación del contenido de ácido ascórbico	42
4.1.7	Recolección de datos meteorológicos	42
4.1.8	Análisis del suelo.....	42
4.1.9	Análisis estadístico.....	43
4.2	Determinación experimental de las propiedades de equilibrio en el sistema etanol:agua:moringa seca	44
4.2.1	Materia prima, reactivos y disolventes	44
4.2.2	Preparación de la muestra	45
4.2.3	Caracterización de las hojas de moringa	45
4.2.3.1	Determinación del contenido de agua en hojas de moringa	45
4.2.3.2	Determinación del contenido de sólidos no extraíbles y material extraíble de las hojas de moringa	45
4.2.4	Cinéticas de extracción de hojas secas de moringa	46
4.2.4.1	Estimación de parámetros de equilibrio.....	46
4.2.5	Simulación de extracción por lote en etapas múltiples a contracorriente (EMC) de hojas de moringa.....	48
4.2.6	Procedimiento experimental de la EMC	49
4.2.7	Validación del modelo	49
4.2.8	Comparación de la EMC con otros métodos de extracción	50
4.2.8.1	Extracción Soxhlet (ES)	51
4.2.8.2	Extracción asistida por ultrasonido (EAU)	51
4.2.9	Métodos analíticos	51
4.2.9.1	Determinación del contenido de sólidos de los extractos de moringa	51
4.2.9.2	Determinación de actividad antirradical por ensayos DPPH y ABTS.....	52
4.2.9.3	Determinación del contenido de fenoles totales (CFT)	52



4.2.10	Análisis estadístico	52
4.3	Estudio del secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos de moringa ...	52
4.3.1	Materiales, reactivos y disolventes	53
4.3.2	Preparación de las hojas de moringa para su extracción	53
4.3.3	Preparación de los extractos etanólicos de hojas secas de moringa	53
4.3.4	Preparación de la mezcla de alimentación	54
4.3.5	Secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado (SACC) de extractos etanólicos de hojas de moringa.....	55
4.3.6	Determinación del contenido de humedad de los extractos secos.....	55
4.3.7	Determinación del rendimiento del proceso de SACC.....	55
4.3.8	Cuantificación de compuestos fenólicos por UHPLC	56
4.3.9	Cálculo de retención de compuestos fenólicos.....	57
4.3.10	Diseño experimental y análisis estadístico	57
4.4	Simulación del proceso de secado por aspersión en ciclo cerrado de extractos de moringa .	58
4.4.1	Obtención de datos de adsorción de extractos secos de moringa	60
4.4.1.1	Obtención y preparación de las muestras	60
4.4.1.2	Generación de las isotermas de adsorción	60
4.4.1.3	Representación matemática de las isotermas de adsorción	61
4.5	Estudio de estabilidad del extracto seco de moringa durante su almacenamiento	61
4.5.1	Materiales evaluados y reactivos utilizados	61
4.5.2	Preparación de las muestras para iniciar las pruebas de estabilidad.....	62
4.5.3	Cinéticas de estabilidad de extractos secos de moringa	63
4.5.3.1	Preparación de las muestras para su análisis UHPLC.....	63
4.5.3.2	Cuantificación de compuestos fenólicos usando UHPLC	64
4.5.4	Análisis estadístico	64
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
5.1	Variación en compuestos bioactivos y actividad antirradical de hojas de <i>Moringa oleifera</i> : influencia de factores climáticos, edad del árbol y parámetros del suelo	65
5.1.1	Efecto de los factores climáticos y la edad del árbol sobre el contenido de compuestos bioactivos y la actividad antirradical de extractos de hojas de <i>Moringa oleifera</i>	68
5.1.2	Efecto de los parámetros del suelo y la edad del árbol sobre el contenido de compuestos bioactivos y la actividad antirradical de extractos de hojas de <i>Moringa oleifera</i>	71
5.2	Optimización de la extracción por lote en etapas múltiples a contracorriente de compuestos fenólicos de hojas de <i>Moringa oleifera</i> utilizando un modelo mecanicista	74



5.2.1	Composición inicial de la alimentación	75
5.2.2	Determinación experimental de los parámetros de equilibrio	75
5.2.3	Resultados de la simulación de extracción por lote en etapas múltiples a contracorriente (EMC) de hojas de moringa	80
5.2.4	Resultados experimentales de extracción por lote en etapas múltiples a contracorriente (EMC) de hojas de moringa	81
5.2.5	Extracción Soxhlet (ES) de hojas de moringa.....	84
5.2.6	Extracción asistida por ultrasonido (EAU) de hojas de moringa.....	84
5.2.7	Comparación entre los métodos de extracción evaluados	86
5.3	Secado por aspersion con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos etanólicos de moringa	88
5.3.1	Rendimiento del proceso de secado por aspersion de extractos etanólicos de moringa.....	91
5.3.2	Retención de compuestos fenólicos de referencia durante el secado por aspersion de extractos etanólicos de moringa.....	93
5.4	Representación dinámica del secado por aspersion con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos etanólicos de moringa.....	97
5.4.1	Comportamiento dinámico de la temperatura de salida de la fase continua usando las variables del conjunto experimental a diferentes ε y $G\gamma$	98
5.4.2	Efecto de las interacciones termodinámicas de los sólidos de la alimentación sobre la humedad simulada del producto	100
5.4.3	Consumo de energía durante el secado por aspersion de extractos etanólicos de moringa.....	103
5.5	Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre la estabilidad de compuestos fenólicos de referencia en los extractos secos de moringa	104
6	CONCLUSIONES	113
	LISTA DE REFERENCIAS	114
	APENDICE A	122
	APENDICE B	124
	APENDICE C	126

Tesis Doctoral



LISTA DE TABLAS

TABLA 2.1 Contenido de compuestos bioactivos y otras características de <i>Moringa oleifera</i>	8
TABLA 2.2 Extracción de compuestos bioactivos a partir de hojas de <i>Moringa oleifera</i> utilizando diferentes técnicas.....	13
TABLA 4.1 Variables evaluadas en tres tipos de suelos utilizados en este estudio y métodos analíticos realizados.....	43
TABLA 4.2 Niveles evaluados de las variables del proceso de secado por aspersión en ciclo cerrado de extractos etanólicos de hojas de <i>Moringa oleifera</i>	54
TABLA 4.3 Propiedades utilizadas para la solución del modelo mecanicista propuesto por Aguirre-Alonso (2016).....	59
TABLA 4.4 Extractos secos de moringa evaluados en el presente estudio de estabilidad.....	62
TABLA 4.5 Atmósferas modificadas evaluadas durante el presente estudio de estabilidad de extractos secos de moringa.....	63
TABLA 5.1 Datos climáticos y fechas de recolección en el sitio de producción de árboles de <i>Moringa oleifera</i> investigado en el presente estudio.....	66
TABLA 5.2 Parámetros evaluados en septiembre (2014) de tres tipos de suelos utilizados en el presente estudio para el cultivo de árboles de <i>Moringa oleifera</i>	66
TABLA 5.3 Variaciones en compuestos bioactivos y actividad antirradical de hojas de <i>Moringa oleifera</i> cultivadas en tres tipos de suelo y cosechadas en diferentes meses.....	67
TABLA 5.4 Caracterización de las hojas de moringa.....	75
TABLA 5.5 Comparación entre los valores de M obtenidos experimentalmente en el presente trabajo.....	78
TABLA 5.6 Variables de proceso para extracción a 35 °C por lote en etapas múltiples a contracorriente de hojas de moringa.....	82
TABLA 5.7 Variables de proceso para extracción a 55 °C por lote en etapas múltiples a contracorriente de hojas de moringa.....	82
TABLA 5.8 Comparación del contenido de fenoles totales y la actividad antirradical en las etapas de extracción a diferentes temperaturas de operación.....	83
TABLA 5.9 Comparación de las variables evaluadas a diferentes tiempos de contacto durante la extracción Soxhlet de hojas de moringa.....	83
TABLA 5.10 Comparación de las variables evaluadas a diferentes tiempos de contacto durante la extracción asistida por ultrasonido de hojas de moringa.....	86
TABLA 5.11 Comparación de los diferentes métodos de extracción de hojas de moringa.....	87



TABLA 5.12 Condiciones experimentales del secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos etanólicos de moringa.....	89
TABLA 5.13 Coeficientes de regresión para cada variable de respuesta evaluada durante el secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos etanólicos de moringa.....	90
TABLA 5.14 Valores de p de las variables independientes evaluadas durante el secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos etanólicos de moringa.....	90
TABLA 5.15 Variables de estado estables para el funcionamiento del secador por aspersión en ciclo cerrado.	97
TABLA 5.16 Coeficientes de regresión para cada variable de respuesta evaluada durante la prueba de estabilidad de extractos secos de moringa.	105
TABLA 5.17 Parámetros de los modelos GAB y BET para extractos secos de moringa obtenidos con diferentes materiales de soporte.	111

UCA

Tesis Doctoral



LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 Esquema general de la secuencia de obtención de extractos secos de plantas de uso medicinal.....	10
FIGURA 2.2 Diagrama de flujo del proceso de extracción sólido-líquido en una sola etapa.....	16
FIGURA 2.3 Representación de extractores sólido-líquido por lote en etapas múltiples ideales a contracorriente.....	18
FIGURA 2.4 Diseño básico del secado por aspersion en ciclo abierto y flujo co-corriente.....	22
FIGURA 2.5 Diseño del secado por aspersion en ciclo cerrado y flujo co-corriente.....	25
FIGURA 2.6 Esquema del modelo mecanicista del proceso de secado por aspersion.....	27
FIGURA 4.1 Diagrama general de la metodología seguida en el presente trabajo.....	37
FIGURA 4.2 Representación del diagrama de flujo del proceso de extracción en tres etapas a contracorriente.....	50
FIGURA 4.3 Secador por aspersion BÜCHI B-290 acoplado a bomba de calor BÜCHI B-295 y deshumidificador BÜCHI B-296 alimentado con nitrógeno como gas de secado.....	56
FIGURA 5.1 Evolución de la fracción másica de sólidos extraíbles en el extracto y en el refinado. Alimentación: hojas trituradas de moringa. Temperatura: 35 °C.....	77
FIGURA 5.2 Solución retenida específica obtenida experimentalmente para extractos de moringa usando diferentes proporciones (g muestra)/(g disolvente).....	77
FIGURA 5.3 Evolución de la fracción másica de sólidos extraíbles en el extracto y en el refinado. Alimentación: hojas enteras de moringa. Temperatura: 35 °C.....	78
FIGURA 5.4 Evolución de la fracción másica de sólidos extraíbles en el extracto y en el refinado. Alimentación: hojas enteras de moringa. Temperatura: 55 °C.....	79
FIGURA 5.5 Relación de equilibrio termodinámico obtenida experimentalmente para extractos de moringa usando diferentes proporciones (g alimentación)/(g disolvente).....	80
FIGURA 5.6 Simulación de extracciones por lote en etapas múltiples a contracorriente de hojas secas de moringa.....	81
FIGURA 5.7 Secado por aspersion en ciclo cerrado de extractos etanólicos de moringa: efecto de las variables independientes sobre el rendimiento del proceso.....	92
FIGURA 5.8 Cromatograma UHPLC de extracto seco de moringa usando 3 g de material de soporte por cada g de sólidos de extracto.....	94
FIGURA 5.9 Espectros UV de kaempferol-3-glucósido y quercetina-3-rutinósido obtenidos a partir de extracto seco de moringa y de estándares puros.....	94
FIGURA 5.10 Retención de quercetina-3-rutinósido durante el secado por aspersion con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos etanólicos de moringa.....	95



FIGURA 5.11 Retención de kaempferol-3-glucósido durante el secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos etanólicos de moringa	96
FIGURA 5.12 Valores experimentales <i>versus</i> simulados de la temperatura de salida de la fase continua a diferentes ε . Variables de estado iniciales: Tabla 5.15. $G\gamma = 0.0135 \text{ kg}\cdot\text{s}^{-1}$	98
FIGURA 5.13 Valores experimentales <i>versus</i> simulados de la temperatura de salida de la fase continua a diferentes $G\gamma$. Variables de estado iniciales: Tabla 5.15. $\varepsilon = 0.95$	99
FIGURA 5.14 Valores experimentales y simulados de la humedad de extractos secos de moringa. Variables de estado iniciales: Tabla 5.15. $\varepsilon = 0.95$. $G\gamma = 0.0135 \text{ kg}\cdot\text{s}^{-1}$	101
FIGURA 5.15 Isoterma de adsorción a 25 °C de extractos secos de moringa obtenidos con 3 g de material de soporte por cada g de sólidos de extracto. Representación de los datos de adsorción: Ecuación (2.48).....	101
FIGURA 5.16 Valores experimentales y simulados de la humedad de extractos secos de moringa. Variables de estado iniciales: Tabla 5.15. $\varepsilon = 0.95$. $G\gamma = 0.0135 \text{ kg}\cdot\text{s}^{-1}$. Representación de las interacciones termodinámicas de los sólidos de la alimentación: Ecuación (5.1).....	102
FIGURA 5.17 Valores experimentales <i>versus</i> simulados de la temperatura de salida de la fase continua. Variables de estado iniciales: Tabla 5.15. $\varepsilon = 0.95$. $G\gamma = 0.0135 \text{ kg}\cdot\text{s}^{-1}$. Representación de las interacciones termodinámicas de los sólidos de la alimentación: Ecuación (5.1)	103
FIGURA 5.18 Consumo de energía durante el secado por aspersión de extractos etanólicos de moringa. Variables de estado iniciales: Tabla 5.15. $\varepsilon = 0.95$. $G\gamma = 0.0135 \text{ kg}\cdot\text{s}^{-1}$. Representación de las interacciones termodinámicas de los sólidos de la alimentación: Ecuación (5.1)	104
FIGURA 5.19 Efecto de la humedad relativa y la temperatura sobre el contenido de quercetina-3-rutinósido durante el almacenamiento de extractos secos de moringa	106
FIGURA 5.20 Efecto de la humedad relativa y la temperatura sobre el contenido de kaempferol-3-glucósido durante el almacenamiento de extractos secos de moringa.....	107
FIGURA 5.21 Isotermas de adsorción a 25 y 50 °C para extractos secos de moringa obtenidos con 3 g de 95:5 (p/p) maltodextrina:sílice precipitada por cada g de sólidos de extracto	109
FIGURA 5.22 Isotermas de adsorción a 25 y 50 °C para extractos secos de moringa obtenidos con 2 g de maltodextrina DE-10 por cada g de sólidos de extracto.....	109
FIGURA 5.23 Isotermas de adsorción a 25 y 50 °C para extractos secos de moringa obtenidos con 0.5 g de sílice precipitada por cada g de sólidos de extracto.....	110



LISTA DE SÍMBOLOS

D	Residuo seco de R	kg
E_j	Extracto en la etapa j	kg
F	Alimentación	kg
K_{eq}	Coefficiente de distribución termodinámica	$kg \cdot kg^{-1}$
L_j	Solución retenida en la etapa j	kg
M_j	Solución retenida específica en la etapa j	$kg \cdot kg^{-1}$
N	Número de etapas	
S	Disolvente	kg
R_j	Refinado en la etapa j	kg
x_{Eji}	Fracción másica en el extracto del componente i en la etapa j	
x_{Fi}	Fracción másica en la alimentación del componente i	
x_{Oji}	Fracción másica en la fase sólida del componente i en la etapa j	
x_{Sji}	Fracción másica en el disolvente del componente i en la etapa j	
x_{Rji}	Fracción másica en el refinado del componente i en la etapa j	
a_w	Actividad de agua	
a	Superficie específica de transferencia de masa	$m^2 \cdot m^{-3}$
A	Superficie externa de contacto de la cámara de secado	m^2
C_p	Calor específico	$J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}$
G	Velocidad de flujo másico	$kg \text{ materia seca} \cdot h^{-1}$
h	Coefficiente de transferencia de calor	$W \cdot m^{-2} \cdot K^{-1}$
H	Entalpía	$J \cdot kg^{-1}$
k	Conductividad térmica	$W \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}$
k_c	Coefficiente de transferencia de masa	$m \cdot s^{-1}$
p	Presión	Pa
T	Temperatura	$^{\circ}C$
X	Contenido de agua	$kg \text{ agua} \cdot (kg \text{ materia seca})^{-1}$
V	Volumen	m^3
D	Difusividad	$m^2 \cdot s^{-2}$
R	Radio de gota	m
N	Flujo de transferencia de masa	$kg \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$
M	Peso molecular	$kg \text{ mol}^{-2}$

Símbolos Griegos

η	Rendimiento de extracción	
ε	Fracción del volumen de la fase continua	$m^3 \cdot m^{-3}$
ρ	Densidad	$kg \cdot m^{-3}$
λ	Calor latente de vaporización	$kJ \cdot kg^{-1}$
μ	Viscosidad	$kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$

Subíndices

i	Indica el componente. 1: sólidos no extraíbles; 2: sólidos extraíbles; 3: agua; 4: etanol.
i	Interfase producto seco – gas de secado
j	Salida de una etapa ideal
0	Condiciones iniciales
1	Elemento idealmente mezclado
w	Referido al agua
wv	Referido al vapor de agua
ev	Referido al Vapor de etanol
s	Materia seca
e	Etanol
exp	Experimental
sim	Simulado

Subíndices Griegos

β	Materia seca en la fase dispersa (producto seco)
γ	Materia seca en la fase continua (nitrógeno)

Tesis Doctoral



1 INTRODUCCIÓN

Desde hace miles de años, la civilización humana ha aprovechado diversas plantas por sus propiedades medicinales. Documentos egipcios escritos alrededor de 1500 años a.C. incluyen más de 700 prescripciones médicas tradicionales con materiales vegetales tales como: cilantro, ajo, semillas de lino, menta, higos, amapola, anís y aceite de ricino (Mujumdar, 2006; Krishnaiah *et al.*, 2011). Actualmente, los materiales vegetales continúan siendo recursos muy valiosos, útiles en la vida diaria como alimentos, aditivos alimentarios (saborizantes, colorantes, fragancias, antioxidantes) o en particular en la industria farmacéutica como fuente de principios activos, o precursores químicos, (Vinatoru, 2001; Shirsath *et al.*, 2012) debido a la presencia de diferentes compuestos bioactivos en dichos alimentos, los cuales contribuyen a prevenir el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas (Krishnaiah *et al.*, 2011; Shirsath *et al.*, 2012).

Para su aprovechamiento en las industrias alimentaria y farmacéutica, los compuestos bioactivos de materiales vegetales se obtienen generalmente de muestras deshidratadas (Ahmad *et al.*, 2013a), con una posterior extracción sólido-líquido en condiciones controladas (tipo y cantidad de disolvente, temperatura), en esta etapa se emplean principalmente disolventes orgánicos, como el metanol y el etanol, mezclados con agua (Rakotondramasy *et al.*, 2007; Castillo-Santos *et al.*, 2016). La siguiente etapa involucra la separación de los sólidos a partir de los extractos (Rakotondramasy *et al.*, 2007), para ello se utiliza ampliamente el secado por aspersion, sin embargo, es necesario evaporar previamente el disolvente orgánico para evitar su combustión durante el secado. Esta etapa se asocia con la consecuente reducción del rendimiento de los compuestos bioactivos (Praveen *et al.*, 2008). Una opción para evitar la etapa de evaporación del disolvente orgánico de los extractos vegetales es acoplar la unidad de secado por aspersion a una bomba de calor, la cual le confiere una configuración de ciclo cerrado, y con ello la posibilidad de utilizar gases inertes en recirculación (por ejemplo, nitrógeno). Además permite recuperar el disolvente a través de la unidad de condensación (Paudel *et al.*, 2013).

Diferentes condiciones de procesamiento pueden conducir a productos con distintas características, por lo tanto, el estudio de las etapas involucradas en la obtención de extractos secos de materiales vegetales es requisito básico para finalizar con un nivel uniforme y suficiente de compuestos bioactivos que garanticen la eficacia del producto (Bott *et al.*, 2010). Esto no es una tarea fácil debido a que los vegetales y sus preparaciones son (a diferencia de las drogas sintéticas) mezclas complejas de componentes con diferentes características físico-químicas (Papadakis *et al.*, 2006; Souza y Oliveira, 2006; Karaaslan y Dalgiç, 2012).



INTRODUCCIÓN

Una fuente importante de compuestos bioactivos, particularmente de compuestos fenólicos, está contenida en las hojas de *Moringa oleifera* Lam. (moringa). En México en la última década su cultivo se ha extendido ampliamente, debido a su fácil adaptación y rápido crecimiento, además de los beneficios que representan su explotación y consumo (Olson y Fahey, 2011; Olson y Alvarado-Cárdenas, 2016). Por estas características se seleccionó como material de estudio en el presente trabajo de investigación. El objetivo se centró en estudiar el proceso de obtención de extractos secos de hojas de moringa. Para ello, se consideraron aspectos relacionados con: la variación de compuestos bioactivos en cultivos de moringa; la modelación y simulación del proceso de extracción y del secado por aspersion en ciclo cerrado.

Para obtener un extracto vegetal seco con la concentración óptima de compuestos bioactivos que garantice su eficacia se requiere una comprensión apropiada de cada etapa involucrada en el proceso. Actualmente existe una tendencia de optimización de los procesos de extracción de compuestos bioactivos y secado por aspersion de extractos a través de modelos obtenidos mediante metodología de superficie de respuesta, sin embargo, éstos sólo son aplicables dentro de la región de estudio. En general, para comprender los fenómenos de transporte del proceso se requiere el desarrollo de modelos matemáticos capaces de reproducir la conducta dinámica de un proceso.

En este sentido, en el Instituto Tecnológico de Veracruz existe una línea de investigación en modelación, simulación y optimización de procesos alimentarios. Como resultado, Castillo-Santos *et al.* (2016) propusieron un modelo matemático general que representa la dinámica del proceso de extracción por lote en etapas múltiples a contracorriente. El modelo considera como disolvente una mezcla muy común en el área de extracción de compuestos bioactivos (etanol:agua) y dos relaciones de equilibrio requeridas para la descripción del sistema de extracción sólido-líquido. Estas relaciones de equilibrio se obtuvieron experimentalmente a partir de un sistema etanol:agua:vainilla y se aplicó en el mismo para su simulación y optimización. En el presente trabajo se retomó el modelo de Castillo-Santos *et al.* (2016) para la obtención de un extracto crudo óptimo de moringa, tratando de demostrar que mientras el proceso presente una tendencia lineal, la optimización en función del aumento del rendimiento de sólidos extraíbles es factible.

Para representar la dinámica del proceso de secado por aspersion del extracto alcohólico crudo obtenido con las variables del proceso optimizadas, se planteó utilizar el modelo propuesto por Aguirre-Alonso (2016) para un sistema en ciclo cerrado. Este modelo fue obtenido a partir del modelo propuesto por Palencia *et al.* (2002), el cual es uno de los modelos más generales que han sido reportados para representar la dinámica del proceso de secado por aspersion, debido a que está en términos de ecuaciones simultáneas de transferencia de calor y masa interna y externa con una relación de equilibrio para el agua entre las fases en una serie de N etapas idealmente mezcladas dentro de la cámara de secado. Las variables de ambos modelos (Palencia *et al.*, 2002; Aguirre-Alonso, 2016) están directamente relacionadas con el consumo de energía y materia prima, y con la



INTRODUCCIÓN

productividad y la humedad final del producto; no se correlacionan con la retención de compuestos bioactivos en el producto final. Por ello, se decidió realizar el estudio del efecto de las variables del proceso de secado por aspersión en ciclo cerrado sobre la retención de compuestos fenólicos de referencia, implicando de esta forma la correlación tanto de criterios térmicos como de calidad para la definición de las variables del secado por aspersión de extractos de moringa que permitieran obtener la mayor retención posible de compuestos bioactivos con el menor consumo de energía.

La resolución del modelo de Aguirre-Alonso (2016), al igual que el de Palencia *et al.* (2002), se basa en el conocimiento de las propiedades del material a secar. Por lo tanto se requirió generar la isoterma de sorción del extracto seco de moringa para integrarla al modelo propuesto por Aguirre-Alonso (2016). Finalmente, se estudió la estabilidad del extracto seco a diferentes humedades relativas y temperaturas, evaluando el contenido de compuestos fenólicos de referencia, debido a que éstos representan los compuestos bioactivos mayoritarios en las hojas de moringa.



Tesis Doctoral

2 ANTECEDENTES

Las plantas medicinales contienen una serie de moléculas que pueden tener un impacto sobre la prevención de algunas enfermedades, siendo estos constituyentes denominados compuestos bioactivos. En las últimas dos décadas estas sustancias están siendo ampliamente investigadas en laboratorios de las industrias farmacéutica y alimentaria. Los compuestos bioactivos se aprovechan particularmente en forma de extractos. La obtención de los extractos secos de plantas es una estrategia prometedora para mejorar la estabilidad del producto, su manipulación, transporte y almacenamiento. Las hojas de *Moringa oleifera* Lam. (moringa) son una fuente importante de compuestos fenólicos y su cultivo se ha extendido ampliamente en México. Representa un árbol de creciente interés para el desarrollo económico de algunas poblaciones mexicanas donde las condiciones climáticas no son aptas para la mayoría de los cultivos, por lo cual se ha propuesto como material vegetal para estudiar y optimizar el proceso de obtención de extractos secos. En esta sección se abordan los antecedentes de las variables de estudio: la variación de compuestos bioactivos durante el desarrollo del árbol, el proceso de extracción de compuestos bioactivos y el secado por aspersión en ciclo cerrado de extractos.

2.1 *Moringa oleifera* Lam.

Originario de la India, el árbol de *Moringa oleifera* Lam. (moringa) lleva ya varios siglos como parte de la horticultura tradicional mexicana, prospera preferentemente en zonas tropicales con temperaturas mínimas por encima de los 15 °C, con una precipitación menor a los 1.000 mm y altitudes de hasta 600 msnm. Esta combinación de características climáticas se encuentra principalmente en el trópico seco de la depresión del Balsas y en la costa del Pacífico Mexicano. Un total de 13 estados mexicanos presentan localidades óptimas para el cultivo del árbol de moringa, destacando por su área Guerrero, Michoacán, Oaxaca, Veracruz y Jalisco (Olson y Fahey, 2011; Olson y Alvarado-Cárdenas, 2016). El árbol de moringa es considerado uno de los árboles más útiles en el mundo debido a que cada parte se puede utilizar para alimentos de consumo humano, medicamentos o para efectos prácticos industriales (piensos para animales, fibra textil, madera para fuego). Pero el especial interés en el árbol recae sobre las hojas, pues se encuentran disponibles durante todo el año, se pueden comer frescas, cocidas, o ser almacenadas como producto seco durante muchos meses sin necesidad de refrigeración (Verma *et al.*, 2009; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2015). Diferentes acciones terapéuticas han sido atribuidas a su consumo, y se cuenta con artículos científicos que reportan que las hojas de moringa son: antiespasmódicas, antiinflamatorias

ANTECEDENTES

(Cáceres *et al.*, 1992), antiulcerosas (Pal *et al.*, 1995), hipocolesterolémicas (Ghasi *et al.*, 2000), hipotensivas (Faizi *et al.*, 2007), hipolipidémicas, antiateroscleróticas (Chumark *et al.*, 2008), hipoglucemiantes (Tende *et al.*, 2011), antioxidantes (Shih *et al.*, 2011; Moyo *et al.*, 2012; Vongsak *et al.*, 2013) y antidiabéticas (Yassa y Tohamy, 2014). Estas actividades son derivadas de diferentes compuestos bioactivos presentes en las hojas de moringa, principalmente: compuestos fenólicos, β -caroteno y ácido ascórbico (Chumark *et al.*, 2008). En particular, algunos investigadores han afirmado que las hojas de moringa son ricas en ácido clorogénico, ácido gálico, glucósidos de kaempferol y de quercetina (Verma *et al.*, 2009; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2015). Estos fitoquímicos son factores importantes para evaluar la calidad de los extractos de moringa, ya que son responsables de su capacidad de captación de radicales libres y de su actividad benéfica para la salud humana. Sin embargo, el contenido de estos componentes depende de diferentes factores que se discuten a continuación.

Los compuestos bioactivos de plantas se producen en forma de metabolitos secundarios, los cuales permiten a la planta incrementar su capacidad general para sobrevivir y superar las condiciones de estrés de su entorno (Azmir *et al.*, 2013). La abundancia relativa de estos fitoquímicos en cada planta determina la contribución específica para prevenir deficiencias, mejorar la salud o prevenir enfermedades. La composición y el contenido de los componentes químicos de las plantas se ven influenciadas por la especie, la edad de la planta, las fechas de recolección, y por otros factores que afectan el desarrollo del árbol; como el suelo, la ubicación geográfica y las condiciones climáticas (Liang *et al.*, 2004; Hellin *et al.*, 2010; Campbell *et al.*, 2013).

En este término, Siddhuraju y Becker (2003) estudiaron la capacidad antirradical y la actividad antioxidante de extractos de hojas liofilizadas de moringa provenientes de tres regiones agroclimáticas (India, Nicaragua y Níger). Los resultados mostraron que el mayor rendimiento de extracción de compuestos fenólicos corresponde a una mayor actividad antioxidante y que las hojas recolectadas en Nicaragua presentaron un mayor contenido de fenoles totales (4.25 g/100 g bs) que las muestras procedentes de la India (2.94 g/100 g bs) y Níger (3.66 g/100 g bs). Sin embargo, no existen datos específicos que describan el efecto de los factores climáticos u otros factores agronómicos sobre el potencial antioxidante de las hojas de moringa. Iqbal y Bhangar (2006) reportaron variaciones significantes en la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de hojas de moringa en función de las estaciones de cosecha y las condiciones agroclimáticas de cinco lugares de Pakistán. En general, se observó una relación inversa entre la temperatura ambiental y el contenido de fenoles totales (CFT) y la actividad antioxidante. Sin embargo, no se investigó el efecto de las propiedades del suelo sobre estos parámetros y tampoco se especificó el rango de temperatura, referido en el reporte como frío o caliente.



ANTECEDENTES

Jongrungruangchok *et al.* (2010) compararon la composición proximal y los constituyentes minerales en hojas de moringa de 11 regiones agroclimáticas diferentes distribuidas en Tailandia. Sin embargo, a pesar de tener 11 muestras de diferentes regiones, los autores no discutieron las razones de las variaciones en los valores del perfil nutricional.

En otra investigación se estimaron los principales fitoquímicos (glucosinolatos, compuestos fenólicos y flavonoides) y nutrientes (proteína total, grasa cruda, ácidos grasos y minerales) de diferentes tejidos de moringa (raíz, semilla, tallo, peciolo y hoja) cultivados en Ghana y cosechados en tres etapas de desarrollo: plantas vegetativas, plantas post-floración y plantas post-producción de vainas (Amaglo *et al.*, 2010). En todas las etapas de desarrollo, los autores informan que las hojas tenían los contenidos de flavonoides más altos y más complejos, mientras que compuestos fenólicos y flavonoides no se detectaron en las raíces y las semillas. Además, los niveles más altos de compuestos bioactivos se detectaron en las hojas de las plantas post-floración. Cuando estos autores compararon sus resultados con otros informes, encontraron diferencias en el contenido de los compuestos bioactivos, explicando que podrían ser causados por diferencias en las condiciones de cultivo y cosecha, pero no fueron específicos sobre la fuente de estas variaciones.

Shih *et al.* (2011) describen el efecto de diferentes partes del árbol de moringa (hojas, tallo y peciolo) y de las estaciones (julio de 2004 y enero de 2005) sobre la composición química y la actividad antioxidante de árboles de moringa cultivados en Taiwán. Sus resultados mostraron que las muestras cosechadas en enero tuvieron mayor contenido de cenizas (excepto la parte del tallo), calcio y compuestos fenólicos (excepto la parte de la hoja) y una mayor actividad antioxidante que las muestras de julio. En ambas estaciones las hojas expresaron la mayor actividad antioxidante, seguida por el peciolo y el tallo. Recientemente, Ndhkala *et al.* (2014) realizaron un estudio para evaluar la variación de las propiedades antioxidantes, antimicrobianas y fitoquímicas de trece cultivares de moringa obtenidos en diferentes lugares: Tailandia, Taiwán, Sudáfrica y Estados Unidos de América. Todas las accesiones fueron cultivadas en la granja experimental del Consejo de Investigación Agrícola (ARC, por sus siglas en inglés) ubicada en Roodeplaas, Pretoria. En general, los cultivares de Tailandia exhibieron las mayores cantidades de compuestos fenólicos totales y los mayores valores de actividad antioxidante. Las variaciones en los datos obtenidos por Ndhkala *et al.* (2014) pueden sugerir diferencias en la capacidad de cada procedencia para establecerse en el nuevo entorno. Sin embargo, estos autores no proporcionaron información sobre las condiciones agroclimáticas; por lo tanto no es posible inferir cómo estos factores afectaron a las plantas.

Mientras que el contenido de compuestos bioactivos en las plantas varía ampliamente, puede generalizarse que las hojas de moringa son una fuente importante de éstos. Si añadimos a este hecho que el uso de plantas medicinales como alternativa terapéutica de origen natural ha recibido consideración importante en todo el mundo (Bott *et al.*, 2010), podemos afirmar que el árbol de moringa representa una opción muy atractiva para ser cultivado y ampliamente explotado en regiones



ANTECEDENTES

tropicales y subtropicales. Sin embargo, dada la falta de información específica correlacionando las condiciones agroclimáticas con las variaciones sobre el contenido de compuestos bioactivos en hojas de moringa (Tabla 2.1), es necesario proporcionar el conocimiento para determinar las condiciones agronómicas que disminuyen o aumentan el contenido de estos compuestos bioactivos en hojas de moringa. En el presente estudio se propuso contribuir a conocer los efectos de la edad del árbol, los parámetros físicos y químicos del suelo y los factores climáticos, sobre el contenido de compuestos fenólicos totales, carotenoides totales y ácido ascórbico; y sobre la actividad antirradical de los extractos etanólicos obtenidos a partir de hojas de moringa.

2.2 Obtención de extractos secos de plantas de uso medicinal

En la mayoría de los casos, las plantas secas trituradas con las cuales se elaboran los productos fitofarmacéuticos son consideradas erróneamente como las sustancias activas. Sin embargo, las plantas son mezclas complejas de componentes con diferentes características físico-químicas, y no precisamente todos son los responsables de una actividad terapéutica definida. La obtención de extractos de plantas de uso medicinal permite recuperar los compuestos bioactivos que, como se ha venido discutiendo, son los responsables de las actividades terapéuticas asociadas al consumo de productos derivados de plantas. El desarrollo y obtención de extractos secos es, en los últimos años, un tema importante de las industrias de transformación de plantas de uso medicinal, debido a las ventajas del extracto seco sobre las formas líquidas convencionales: menores costes de almacenamiento, fácil manejo del producto, mayor concentración de los compuestos bioactivos e incremento de su estabilidad durante el almacenamiento (Souza y Oliveira, 2006; Bott *et al.*, 2010; Cortés y Oliveira, 2012).

En la Figura 2.1 se representa un enfoque integrado que muestra la secuencia de obtención de extractos secos de plantas de uso medicinal. Las condiciones de operación involucradas en este proceso afectan directamente los costes de producción y las propiedades físico-químicas del producto final, pudiéndose originar diversos grados de pérdida de los compuestos bioactivos (Bott *et al.*, 2010). En el presente trabajo se propuso estudiar sistemáticamente la extracción de compuestos bioactivos a partir de hojas secas de moringa y el secado por aspersion del extracto obtenido, con el fin de determinar las condiciones que permitieran obtener la mayor cantidad posible de compuestos bioactivos en el producto final con el mínimo consumo de disolvente y energía. Por dicho enfoque, en las siguientes secciones se describen las etapas principales para obtener el extracto vegetal seco: secado del material vegetal, extracción de los compuestos bioactivos y secado por aspersion del extracto.



ANTECEDENTES

TABLA 2.1 Contenido de compuestos bioactivos y otras características de *Moringa oleifera*.

Variables de respuesta	Partes del árbol evaluadas	Origen del cultivo	Fecha de recolección	Etapas de desarrollo del árbol	Variables estudiadas del suelo	Factores climáticos evaluados	Referencias
Ácido ascórbico, fenólicos totales, flavonoides totales, separación de flavonoides por HPLC y determinación de actividad antioxidante por métodos diferentes	Hojas	India, Nicaragua y Níger	Diciembre 2000	NR	NR	NR	Siddhuraju y Becker (2003)
Ácido ascórbico, fenólicos totales, flavonoides totales, actividad antirradical y determinación de actividad antioxidante por métodos diferentes	Hojas	5 diferentes provincias de Pakistán	Diciembre, marzo, junio y septiembre (2001 a 2003)	NR	NR	Temperatura ambiental: temperaturas frías y calientes	Iqbal y Bhanger (2006)
Fenólicos totales, flavonoides totales, carotenoides totales, ácido ascórbico, tocoferol, actividad antirradical y determinación de antioxidantes enzimáticos por diferentes métodos	Hojas	India	NR	Hojas maduras y tiernas	NR	NR	Sreelatha y Padma (2009)
Separación, cuantificación e identificación de glucosinolatos, fenólicos, flavonoides y otros de fitoquímicos. Contenido de nutrientes: proteína total, grasa cruda, ácidos grasos y minerales	Raíz, semilla, tallo, peciolo y hoja	Kumasi, Ghana	Las semillas fueron trasplantadas en mayo de 2004	Plantas vegetativas (100 días de edad), plantas de post-floración y de post-producción de vaina (320 y 380 días)	NR	Descripción del sitio de producción en forma general	Amaglo <i>et al.</i> (2010)

NR: no reportado. ^aCapacidad de intercambio catiónico, ^bconductividad eléctrica.

ANTECEDENTES

Continúa TABLA 2.1

Variables de respuesta	Partes del árbol evaluadas	Origen del cultivo	Fecha de recolección	Etapas de desarrollo del árbol	Variables estudiadas del suelo	Factores climáticos evaluados	Referencias
Composición proximal (humedad, cenizas, grasa cruda, proteína cruda y fibra cruda) y componentes minerales (calcio, potasio, hierro)	Hojas	11 diferentes provincias de Tailandia	NR	NR	NR	NR	Jongrungruangchok <i>et al.</i> (2010)
Compuestos fenólicos totales, ácido ascórbico, composición proximal (proteína cruda, grasa cruda, cenizas y calcio) y actividad antioxidante	Hoja, y tallo	Taichung, Taiwan	Julio 2004 y enero 2005	NR	NR	NR	Shih <i>et al.</i> (2011)
Fenólicos totales, flavonoides totales, actividad antibacteriana, actividad antifúngica y determinación de actividad antioxidante por diferentes métodos	Hojas	13 germoplasmas recogidos de diferentes lugares	NR	NR	NR	Todas las procedencias recibieron las mismas prácticas de manejo	Ndhkala <i>et al.</i> (2014)
Contenido de compuestos fenólicos totales, carotenoides totales, ácido ascórbico y ácido gálico; y determinación de la actividad antirradical mediante ensayos DPPH y ABTS	Hojas	Veracruz, México	Junio, julio y septiembre 2014; enero y mayo 2015	Diferentes muestras: 276 a 949 días de edad	pH, CEC ^a , EC ^b , K, P, NH ₄ ⁺ , materia orgánica, arcilla, limo, arena	Temperatura media, precipitación, humedad relativa, radiación solar, radiación UV	Presente trabajo

NR: no reportado. ^aCapacidad de intercambio catiónico, ^bconductividad eléctrica.

ANTECEDENTES

Selección del material vegetal:

- Revisión en literatura sobre resultados científicos de su actividad terapéutica.
- Autenticación de los datos para su validez: contenido y presencia de compuestos bioactivos, pruebas *in vitro/in vivo* de su actividad terapéutica, etc.
- Decisión sobre la necesidad de pruebas de control durante la secuencia de obtención del extracto seco: contenido de compuestos bioactivos, actividad antirradical, humedad, actividad de agua, etc.



Preparación del material vegetal (secado y trituración):

- Recolección del material vegetal.
- Secado de la muestra bajo condiciones que permitan conservar el mayor contenido posible de compuestos bioactivos.
- Trituración del material vegetal deshidratado.



Extracción de los compuestos bioactivos del material vegetal:

- Comparar la selectividad de diferentes disolventes para la extracción de los compuestos bioactivos de interés.
- Extracción del material vegetal seco y triturado mediante el método que permita el mayor rendimiento de los compuestos bioactivos de interés.



Obtención del extracto vegetal seco:

- Concentración (mediante destilación) del extracto crudo para eliminar el disolvente orgánico (generalmente etanol).
- Secado del extracto acuoso concentrado mediante liofilización ó secado por aspersion.
- Pruebas de estabilidad del producto seco obtenido: concentración de compuestos bioactivos, actividad antirradical, pruebas de su actividad biológica, estabilidad física de las partículas, etc.

FIGURA 2.1 Esquema general de la secuencia de obtención de extractos secos de plantas de uso medicinal (Adaptado de Aguilera, 2003; Praveen *et al.*, 2008; Bott *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2010; Azmir *et al.*, 2013).

2.3 Secado convectivo de plantas de uso medicinal

El secado es una técnica de conservación de alimentos basada en la disminución de la actividad de agua de los mismos, a fin de brindarles estabilidad frente a la degradación microbiana, reducir reacciones químicas deteriorativas y reducir gastos de almacenamiento y transporte (Singh y Heldman, 2009). En el caso particular de la extracción de compuestos bioactivos, el secado evita la interferencia de agua en la liberación de estos componentes, mejorando el rendimiento de extracción (Ahmad *et al.*, 2013a). La ruptura de los componentes celulares durante el secado también podría facilitar la liberación de los componentes activos ligados a éstos (Ahmad *et al.*, 2013b). Los métodos más populares para el secado de materiales vegetales son: a la sombra, al sol y el secado en hornos con aire caliente (Gyamfi *et al.*, 2011). Para fines industriales, el secado por aire caliente es el método más ampliamente utilizado, ya que permite un control preciso de las variables de proceso y un tiempo corto de operación en comparación a los otros métodos (Ahmad *et al.*, 2013a; Ahmad *et al.*, 2013b).

Tradicionalmente, las temperaturas de aire comprendidas entre 30 y 40 °C se utilizan para proteger los compuestos bioactivos de la degradación térmica durante el secado convectivo. Sin embargo, el secado a estas temperaturas constituye un proceso lento en el que las reacciones metabólicas y de oxidación pueden ser de larga duración, lo que conlleva a la degradación de los componentes activos de los materiales vegetales (Fennell *et al.*, 2004). De esta manera, en algunos reportes se sugiere el uso de temperaturas de aire entre 50 y 60 °C para el secado de materiales vegetales (Göğüş y Maskan, 2006; Pérez-Landa, 2013). En este rango de temperaturas, la velocidad de secado se incrementa, esto podría aumentar la productividad a escala industrial, pero al mismo tiempo podría promover la degradación de compuestos termosensibles (Gomes y Caponio, 2001).

En este contexto, numerosas investigaciones se han centrado en evaluar el efecto de las condiciones de operación y de diferentes métodos de secado, sobre el perfil y el contenido de los componentes bioactivos presentes en materiales vegetales (Di Cesare *et al.*, 2004; Ben Haj Said *et al.*, 2013). Específicamente, en las hojas de moringa se han realizado diferentes trabajos (Joshi y Mehta, 2010; Premi *et al.*, 2010; Gyamfi *et al.*, 2011; Pérez-Landa, 2013), entre los cuales, Pérez-Landa (2013) evaluó el efecto del secado por liofilización, en lecho fluidizado, a la sombra y al sol; haciendo un seguimiento a través del tiempo de secado del contenido de compuestos fenólicos, de ácido ascórbico, de carotenoides totales y la actividad antirradical (estas cinéticas no se realizaron para el secado por liofilización). Concluyó que la temperatura es la variable de mayor influencia sobre la retención de los atributos antioxidantes en el secado por convección forzada (lecho fluidizado), y reporta que a 65 y 55 °C se consiguen porcentajes de retención de fenoles (84 y 85%, respectivamente) mayores que a 45 °C (79%) y 35 °C (37%), lo que sugiere que estos resultados se obtuvieron debido a los distintos tiempos de exposición a la corriente de aire que produjo reacciones de oxidación. El trabajo de Pérez-Landa (2013) se tomó como referencia para el secado de las hojas de moringa durante este estudio.



ANTECEDENTES

2.4 Proceso de extracción de compuestos bioactivos a partir de materiales vegetales

Los compuestos bioactivos se encuentran en matrices complejas, generalmente en estado sólido. Para separar un soluto de la fase sólida, ésta se pone en contacto con una fase líquida. El disolvente debe difundirse al interior del sólido para disolver el o los compuestos deseados que se transfieren a su vez a la fase líquida, lo cual permite una separación de los componentes originales del sólido. Este proceso se llama extracción sólido-líquido o lixiviación (Geankoplis, 2003). A partir de este momento este proceso se citará simplemente como extracción.

Recientemente se han desarrollado varias técnicas para la extracción de los compuestos bioactivos de materiales vegetales, con el fin de disminuir el tiempo de extracción, la cantidad de muestra, el consumo de disolvente, aumentar el rendimiento y mejorar la calidad de los extractos (Wang y Weller, 2006). Estos métodos no convencionales de extracción incluyen la extracción asistida por ultrasonido (Vinatoru, 2001), la extracción asistida por microondas (Kaufmann y Christen, 2002), la extracción con fluido supercrítico (Lang y Wai, 2001), la extracción con disolvente presurizado (Kaufmann y Christen, 2002) y la extracción con agua sobrecalentada (Smith, 2002). En general, se consideran rápidos y eficientes para la extracción de compuestos bioactivos de materiales vegetales. Sin embargo, el proceso de extracción por maceración es el método convencional para la obtención de extractos de plantas de uso medicinal. En este proceso, el material vegetal se coloca en contacto con el disolvente de extracción en contenedores, los cuales pueden contar con agitación y/o calentamiento, y el proceso puede ser llevado por largos periodos de tiempo (Azmir *et al.*, 2013).

El uso de compuestos bioactivos en diferentes sectores comerciales; como las industrias farmacéutica, alimentaria y química; representa la necesidad de definir el método apropiado para extraer estos componentes activos de materiales vegetales. Hasta el momento, ningún método (convencional o no) es considerado como estándar para la extracción de compuestos bioactivos a partir de plantas. La eficiencia de los métodos de extracción convencionales y no convencionales dependen principalmente de las variables de operación del proceso, la comprensión de la naturaleza físico-química del material vegetal y de sus compuestos bioactivos (Azmir *et al.*, 2013).

En este contexto se han evaluado distintas técnicas para la extracción de los compuestos bioactivos presentes en las hojas de moringa, sin embargo, la mayoría de los estudios sobre estas técnicas se han llevado a cabo para realizar análisis fitoquímicos y/o ensayos biológicos *in vitro* e *in vivo*, sin tener en cuenta la transferencia de masa durante la extracción de hojas de moringa y la eficiencia de extracción (Tabla 2.2). Este es un problema debido a que las condiciones de extracción pueden no ser suficientes para una extracción completa de compuestos bioactivos a partir de hojas de moringa o cualquier otro material vegetal, dando como resultado una subestimación del contenido y del perfil fitoquímico.



ANTECEDENTES

TABLA 2.2 Extracción de compuestos bioactivos a partir de hojas de *Moringa oleifera* utilizando diferentes técnicas.

Características físicas de las hojas	Técnica de extracción	Disolvente*	Proporción muestra / disolvente (p/v)	Temperatura**	Tiempo	Objetivo de extracción	Rendimiento del proceso (%)	Referencias
Las muestras fueron liofilizadas y trituradas para obtener un polvo	Soxhlet	Agua 80% metanol 70% etanol	1:60	Controlada	3 h	Análisis fitoquímico y evaluación de disolventes	24.50 – 37.70 ^A	Siddhuraju y Becker (2003)
Las muestras fueron secadas con aire y trituradas hasta pasar por un tamiz de 1 mm	Maceración con agitación	80% metanol	1:5	Ambiente	3 h	Análisis fitoquímico	NR	Iqbal y Bhanger (2006)
Hojas frescas	Infusión	Agua	1:5	Ebullición	5 min	Ensayos biológicos <i>in vivo</i>	10.00 ^B	Chumark <i>et al.</i> (2008)
Muestras secas trituradas hasta pasar a través del tamiz No. 40	Infusión	Agua	1:8 p/p	80 °C	2 h	Ensayos biológicos <i>in vitro</i>	10.87 ^A	Singh <i>et al.</i> (2009)
Las hojas se secaron bajo sombra y se pasaron a través del tamiz No. 20	Soxhlet	Agua	1:6	Controlada	18-20 h	Ensayos biológicos <i>in vitro</i>	10.00 ^A	Sreelatha y Padma (2009)
Las muestras secadas al aire se trituraron para pasar a través del tamiz No. 80	Maceración con agitación y soxhlet	Etanol Metanol 80% etanol 80% metanol	1:10	Maceración: temperatura ambiente Soxhlet: temperatura controlada	6 h	Evaluación del efecto del proceso de extracción sobre la actividad antioxidante	Maceración: 9.60 – 17.90 ^A Soxhlet: 12.20 – 21.10 ^A	Sultana <i>et al.</i> (2009)
Las muestras secadas se trituraron para obtener un polvo	Maceración	50% metanol	NR	Ambiente	3 días	Análisis fitoquímico y ensayos biológicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	NR	Verma <i>et al.</i> (2009)

ANTECEDENTES

Continúa TABLA 2.2

Características físicas de las hojas	Técnica de extracción	Disolvente*	Proporción muestra / disolvente (p/v)	Temperatura**	Tiempo	Objetivo de extracción	Rendimiento del proceso (%)	Referencias
Muestras liofilizadas se trituraron hasta pasar a través del tamiz No. 20	Maceración con agitación	Metanol	1:10	Ambiente	24 h	Ensayos de actividad antioxidante	51.95-81.72 ^A	Shih <i>et al.</i> (2011)
Las hojas se secaron bajo sombra y se trituraron para obtener un polvo	Maceración	70% etanol	NR	Ambiente	24 h	Ensayos biológicos <i>in vivo</i>	NR	Tende <i>et al.</i> (2011)
Las hojas se secaron bajo sombra y se trituraron para obtener un polvo	Maceración con agitación	Acetona Agua	1:5	30 °C	48 h	Ensayos biológicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Acetona: 16 ^C Agua: 13 ^C	Moyo <i>et al.</i> (2012)
Hojas frescas (HF). Las muestras se secaron en un horno (60 °C, 24 h) y se trituraron hasta pasar a través del tamiz No. 20 (hojas secas: HS)	Trituración (T) Decocción (D) Maceración con agitación ocasional (M) Percolación (P) de HS Soxhlet (S) d HS	Agua (sólo para T y D) 50% etanol 70% etanol	T y P: 1:10 M de HF: 1:20 M de HS: 1:40 S: 1:50	D: 100 °C M y P: Ambiente (28 ± 2 °C)	D: 30 min M: 72 h P: velocidad de flujo de 1 mL/min S: 20 h	Evaluación del método de extracción mediante ensayos biológicos <i>in vitro</i>	T: 22 ^A D: 59 - 61 ^A M: 38 - 43 ^A P: 33 - 34 ^A S: 34 - 36 ^A	Vongsak <i>et al.</i> (2013)
Las muestras se secaron en un horno (50 °C, 48 h) y se trituraron para obtener un polvo	Extracción asistida por ultrasonido	50% metanol Acetona 70% etanol Agua	1:20	NR	1 h	Análisis fitoquímico, ensayos antioxidantes y ensayos antimicrobianos	NR	Ndhlala <i>et al.</i> (2014)

ANTECEDENTES

Continúa TABLA 2.2

Características físicas de las hojas	Técnica de extracción	Disolvente*	Proporción muestra / disolvente (p/v)	Temperatura**	Tiempo	Objetivo de extracción	Rendimiento del proceso (%)	Referencias
Las muestras secadas con aire se trituraron para obtener un polvo	Infusión	Agua	1:10	Ebullición	15 min	Ensayos biológicos <i>in vivo</i>	NR	Yassa y Tohamy (2014)
Las hojas se secaron bajo sombra y se trituraron para obtener un polvo	Maceración con agitación (M) Extracción asistida por ultrasonido (EAU) (cuatro etapas con disolvente fresco cada una)	100%, 70% y 50% para cada disolvente orgánico: Metanol Etanol Acetona	1:50	Ambiente	M: 1, 3, 6 y 12 h EAU: 15 min por cada etapa	Evaluación del método de extracción y análisis fitoquímico sobre el mejor procedimiento de extracción	NR	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> (2015)

*El porcentaje (%) indica la fracción del disolvente orgánico que se mezcló con agua.

**Algunos autores no especificaron la temperatura.

^APorcentaje de rendimiento = [peso del extracto seco (g) / peso seco de la muestra (g)] 100.

^BPorcentaje de rendimiento = [peso del extracto seco (g) / peso de las hojas frescas (g)] 100.

^CLos autores no especificaron cómo calcularon el rendimiento.

NR: No reportado.

ANTECEDENTES

La extracción es un proceso de separación bien conocido, cuya eficacia puede aumentarse mediante la aplicación de una extracción por lote en etapas múltiples a contracorriente (EMC) (Rodríguez-Jimenes *et al.*, 2013), por lo cual puede permitir una extracción completa de los compuestos bioactivos del material vegetal. La EMC se emplea para la separación de sustancias sensibles a temperaturas elevadas, cuando el tiempo de contacto requerido para alcanzar el equilibrio debe ser grande (Castillo-Santos *et al.*, 2016) y cuando la concentración de componentes de soluciones altamente diluidas por destilación o evaporación es imposible o no viable (Elizarov *et al.*, 2013), por ejemplo, en el campo de la extracción de compuestos bioactivos hay una reducción del contenido de fitoquímicos en la etapa de evaporación (Praveen *et al.*, 2008) por lo cual esta etapa debe evitarse o buscar las condiciones para minimizar su impacto sobre el perfil fitoquímico del extracto vegetal. En el presente trabajo se propuso el uso de la EMC para la obtención del extracto de moringa por las ventajas que representa. Para profundizar en la selección o diseño de un proceso de extracción a continuación se describen algunas consideraciones importantes en el proceso de extracción, seguido de una descripción del arreglo de EMC y su modelación.

2.4.1 Consideraciones en el proceso de extracción sólido-líquido

La extracción en una sola etapa (Figura 2.2) implica el contacto entre una alimentación sólida (F) y un disolvente (S) a las condiciones de operación establecidas (tipo y cantidad de disolvente, temperatura, agitación); al final de la etapa se obtiene un flujo superior o extracto (E) y un flujo inferior o refinado (R). Se supone que la F libre de soluto es insoluble y que el equilibrio de la extracción se alcanza cuando se ha disuelto totalmente el soluto de la F en el S ; esto se consigue si hay suficiente S para que todo el soluto de la F pueda disolverse en el S . En consecuencia, la concentración del soluto en el E es igual a la concentración del soluto en el líquido que acompaña al R (Perry *et al.*, 1984; Ocón-García y Tojo-Barreiro, 1986; Geankoplis, 2003). Cabe resaltar que la transferencia completa de los solutos al disolvente implica suponer una solubilidad infinita, lo cual no es necesariamente cierto, como quedó demostrado en los trabajos de Castillo-Santos *et al.* (2016) y Olguín-Rojas (2014).

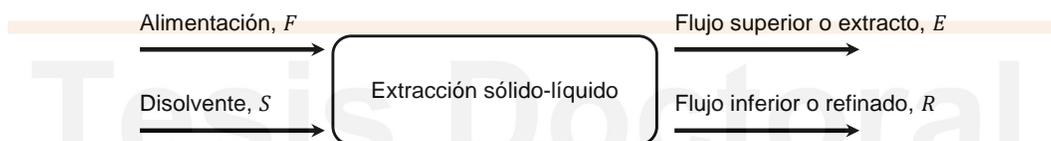


FIGURA 2.2 Diagrama de flujo del proceso de extracción sólido-líquido en una sola etapa (Tomado de Ocón-García y Tojo-Barreiro, 1986).

ANTECEDENTES

Desde el punto de vista de ingeniería, la extracción de compuestos bioactivos a partir de materiales vegetales se considera como una operación de transferencia de masa en estado no estacionario, multicomponente y multifase. Esto implica la transferencia de más de una especie química (el soluto) del sólido al disolvente. La difusión molecular, o de Fick, en la fase fluida es ampliamente aceptada como mecanismo predominante de transferencia de masa dentro de los alimentos sólidos (por ejemplo, el secado y la extracción). Ésta establece que dentro de un medio continuo y bajo la presencia de un gradiente de concentración, la migración neta de moléculas de soluto debido al movimiento aleatorio se produce a partir de una región de alta concentración a una de menor concentración. Por lo tanto, la fuerza impulsora para la difusión es un gradiente de concentración o actividad química (Perry *et al.*, 1984; Aguilera, 2003; Olguín-Rojas, 2014). Dentro de los parámetros a considerar durante el proceso de extracción destacan:

1. Tamaño de partícula. El tamaño del sólido debe ser adecuado (área de superficie por unidad de volumen) para hacer que el soluto sea más accesible al disolvente y para favorecer la extracción, pero no muy fino como para compactar los sólidos y obstaculizar el libre flujo de disolvente.
2. Selección del disolvente para la extracción. Se consideran selectividad, inercia química, propiedades termofísicas, inflamabilidad, toxicidad, coste, y disponibilidad para la selección del disolvente adecuado. Con respecto a la extracción de compuestos bioactivos a partir de hojas de moringa, diversos autores han evaluado distintos disolventes (Tabla 2.2). En el presente estudio el disolvente utilizado fue una mezcla de etanol-agua con 80% de etanol (p/p), se escogió de acuerdo con los datos disponibles en literatura (Tabla 2.2): Sultana *et al.* (2009) encontraron mayor rendimiento, contenido fenólico y actividad antirradical cuando se utilizaron disolventes orgánicos acuosos (metanol al 80%, etanol al 80%) para la extracción de hojas de moringa. No se trabajó con metanol debido a que en aplicaciones industriales este disolvente es descartado porque es tóxico para los seres humanos y representa un peligro ambiental (M'hiri *et al.*, 2015).
3. Selección de la temperatura de operación. La temperatura debe ser lo suficientemente alta para dar mayor solubilidad al soluto en el disolvente, pero no tan alta como para causar pérdidas de disolvente o daños de componentes termosensibles. En productos orgánicos se sugiere una temperatura entre 35 °C y 70 °C (Aguilera, 2003).
4. Selección del equipo. Debe estar en función del modo de operación (por lotes o continuo), por el tipo de sólidos que se operan (lecho fijo, percolación o por inmersión total) o la mejora del rendimiento (una etapa o de múltiples etapas). De acuerdo al enfoque de optimizar el proceso de extracción, en este trabajo se propone la recuperación de compuestos bioactivos de hojas secas de moringa a través de la extracción por lote en etapas múltiples a contracorriente, por lo cual se describe este proceso a continuación.



2.4.2 Extracción por lote en etapas múltiples a contracorriente (EMC)

Las aplicaciones de la extracción sólido-líquido en etapas múltiples a contracorriente (EMC) para extraer compuestos bioactivos de recursos naturales han sido evaluadas en varios trabajos de investigación, por ejemplo, la extracción de ácido glicirrízico de *Glycyrrhiza uralensis* Fisch (Wang *et al.*, 2004), escutelareína de *Erigeron breviscapus* Vant. (Xie *et al.*, 2009), antioxidantes de hojas de *Ginkgo biloba* (Yu *et al.*, 2012) y resveratrol de *Arachis hypogaea* (Zhang *et al.*, 2015). En esta configuración (Figura 2.3) el disolvente fresco (S) entra en el recipiente que contiene el sólido más agotado (R_{N-1}). El extracto que se recupera de este recipiente (E_N) se pasa sucesivamente a través de una batería de extractores hasta llegar al recipiente más recientemente cargado con la alimentación (F). El extracto recuperado de este extractor (E_1) se descarga para su posterior procesamiento: la eliminación del disolvente orgánico. Por esta configuración la EMC se considera como un método de procesamiento *cuasi* continuo y su propósito es aumentar la carga de soluto en el S a un valor máximo, agotar los solutos de la F y disminuir el consumo de S (Aguilera, 2003; Geankoplis, 2003).

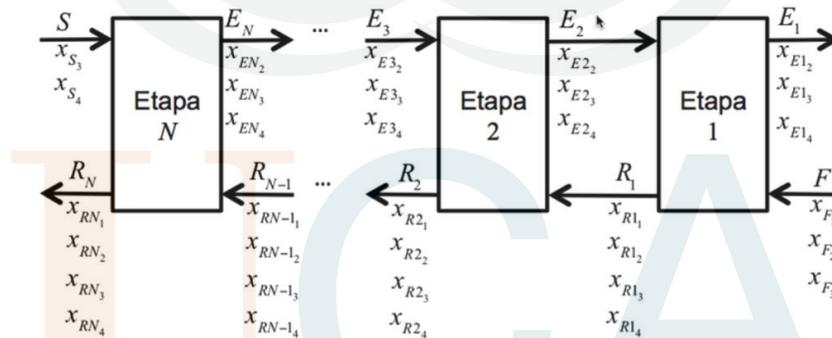


FIGURA 2.3 Representación de extractores sólido-líquido por lote en etapas múltiples ideales a contracorriente (Tomado de Castillo-Santos *et al.*, 2016).

Como se ha expresado en secciones anteriores, en extracción existen factores a considerar para establecer un diseño eficiente de dicho proceso. En el presente trabajo, para mejorar la eficiencia de la EMC se consideraron el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio de sólidos en el proceso de extracción en etapa simple, la estimación de la cantidad de disolvente necesario para el proceso y el cálculo del número de etapas reales para maximizar la eficiencia de extracción. Para conseguir lo anterior, la modelación y simulación del proceso de extracción son herramientas útiles.

2.4.3 Modelación y simulación del proceso de extracción por lote en etapas múltiples a contracorriente

El modelo es la representación matemática del proceso que determina las funciones de interpretación en términos de las variables de decisión o de otras variables independientes sujetas a restricción. La modelación de un proceso es la aplicación de ciencias de la ingeniería y el conocimiento para describir matemáticamente (usando matemáticas, estadística, análisis numérico, software informático, etc.) un proceso y sus resultados. La simulación es el uso del modelo para evaluar diferentes escenarios. La simulación del proceso con un modelo matemático que predice resultados de un proceso para cualquier conjunto de variables de decisión, facilita la optimización del proceso contra los experimentos costosos. Además, la simulación ayuda a comprender el proceso, para evaluar alternativas, y para responder a preguntas específicas. La optimización se describe como la simulación realizada con el objetivo de maximizar (o minimizar) un objetivo determinado del proceso; la búsqueda del óptimo deseado se realiza generalmente mediante algoritmos matemáticos, estableciendo criterios específicos deseados en el producto o una combinación de ambas estrategias (Tzia, 2003). En este contexto la tendencia reciente en el campo de la extracción de compuestos bioactivos, incluyendo la EMC, ha sido la modelación, simulación y optimización por métodos estadísticos y la metodología de superficie de respuesta (Wang *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015; Heleno *et al.*, 2016). Sin embargo, estos tipos de modelos son válidos sólo en las condiciones experimentales en las que fueron ajustados, y por lo tanto no son adecuados para una modelación general de procesos de extracción en ingeniería química ó de alimentos.

Recientemente, Castillo-Santos *et al.* (2016) desarrollaron un modelo matemático general de extractores sólidos-líquidos por lote en etapas múltiples ideales a contracorriente aplicados a sistemas complejos (disolvente compuesto y materiales vegetales). Este modelo fue conceptualizado en términos de balances de masa macroscópicos al final del proceso por lote, es decir, cuando el equilibrio fue alcanzado (etapas ideales) y por lo tanto las propiedades de transferencia de masa deben ser previamente conocidas. Además, el modelo toma en cuenta la composición del disolvente, la alimentación con un componente del disolvente y dos propiedades de equilibrio: la solución retenida específica (M) por kg de sólidos inertes (sólidos no extraíbles) en el refinado (R) y la relación de equilibrio termodinámico entre fases (K_{eq}), que puede reducirse a la ley de distribución de Nernst si la relación de equilibrio es lineal (Ec. (2.1)) (Castillo-Santos *et al.*, 2016).

$$x_{E_2} = K_{eq} x_{O_2} \quad (2.1)$$



ANTECEDENTES

La Ec. (2.1) implica que la concentración del extracto (x_{E_2}) está en función de los sólidos extraíbles en la fase sólida del refinado (x_{O_2}), y no con la fase líquida. El valor de esta constante adimensional tiene un efecto directo en el número de etapas reales que deben llevarse a cabo para la obtención del extracto. El modelo propuesto por Castillo-Santos *et al.* (2016) considera que el proceso de extracción de los recursos naturales es un sistema complejo de cuatro componentes: 1) sólidos no extraíbles, 2) sólidos extraíbles, 3) agua y 4) etanol (Figura 2.3). Es evidente que un sistema con otro disolvente orgánico miscible en agua diferente al etanol puede describirse de manera similar. De acuerdo a Castillo-Santos *et al.* (2016) la EMC (Figura 2.3) con dos propiedades de equilibrio (su determinación experimental se menciona en la sección 4.3.1) y un disolvente con dos líquidos miscibles se describe mediante los siguientes balances de masa macroscópicos al final de cada etapa de extracción, esto es, cuando se ha alcanzado el equilibrio sólido-líquido:

$$\text{Balance general} \quad E_{j+1} + R_{j-1} - E_j - R_j = 0 \quad (2.2)$$

$$\text{Balance de sólidos no extraíbles} \quad R_{j-1}x_{Rj-1_1} - R_jx_{Rj_1} = 0 \quad (2.3)$$

$$\text{Balance de sólidos extraíbles} \quad E_{j+1}x_{Ej+1_2} + R_{j-1}x_{Rj-1_2} - E_jx_{Ej_2} - R_jx_{Rj_2} = 0 \quad (2.4)$$

$$\text{Balance de agua} \quad E_{j+1}x_{Ej+1_3} + R_{j-1}x_{Rj-1_3} - E_jx_{Ej_3} - R_jx_{Rj_3} = 0 \quad (2.5)$$

$$\text{Balance de etanol} \quad E_{j+1}x_{Ej+1_4} + R_{j-1}x_{Rj-1_4} - E_jx_{Ej_4} - R_jx_{Rj_4} = 0 \quad (2.6)$$

En el refinado:

$$\text{Balance general} \quad R_j - L_j - O_j = 0 \quad (2.7)$$

$$\text{Balance de sólidos no extraíbles} \quad R_jx_{Rj_1} - O_jx_{Oj_1} = 0 \quad (2.8)$$

$$\text{Balance de sólidos extraíbles} \quad R_jx_{Rj_2} - L_jx_{Ej_2} - O_jx_{Oj_2} = 0 \quad (2.9)$$

$$\text{Balance de agua} \quad R_jx_{Rj_3} - L_jx_{Ej_3} = 0 \quad (2.10)$$

$$\text{Balance de etanol} \quad R_jx_{Rj_4} - L_jx_{Ej_4} = 0 \quad (2.11)$$

$$\text{Definición de } O \quad O_j - Fx_{F1} - O_jx_{Oj_2} = 0 \quad (2.12)$$

$$\text{Relación de equilibrio termodinámico} \quad K_{eq} = \frac{x_{Ej_2}}{x_{Oj_2}} \quad (2.13)$$

$$\text{Solución retenida específica} \quad M_j = \frac{L_j}{R_jx_{Rj_1}} \quad (2.14)$$

Donde $F = R_0$ y $S = E_{j+1}$



ANTECEDENTES

En el presente proyecto, se generó información fundamental sobre las propiedades de transferencia de masa y se estimó la distribución de concentración entre fases en el equilibrio a partir de cinéticas de extracción sólido-líquido en una sola etapa de hojas secas de moringa. Con esta información se resolvió el modelo teórico conceptualizado por Castillo-Santos *et al.* (2016) para definir el número de etapas y la cantidad de disolvente requerida para producir el máximo rendimiento de extracción con la máxima concentración de extracto, tratando de demostrar que mientras el proceso presente una tendencia lineal, la optimización en función al aumento del rendimiento de sólidos extraíbles es factible. El desempeño de la EMC en términos de rendimiento de extracción y eficiencia de extracción de compuestos bioactivos se comparó con otras técnicas de extracción convencionales (extracción Soxhlet) y no convencionales (extracción asistida por ultrasonido (EAU)).

2.5 Secado por aspersion de extractos vegetales

Como se ha mencionado, convencionalmente el proceso de extracción de compuestos bioactivos de materiales vegetales se realiza con una mezcla de etanol-agua como disolvente (Castillo-Santos *et al.*, 2016), sin embargo las industrias alimentaria y farmacéutica utilizan los compuestos bioactivos de plantas en forma de partículas secas porque en esta forma tiene una mayor vida útil y una mayor facilidad de manejo (Pang *et al.*, 2014). Actualmente, los extractos secos de plantas se obtienen industrialmente casi exclusivamente mediante secado por aspersion (Sollohub y Cal, 2010).

El secado por aspersion es un método ampliamente utilizado por las industrias química, farmacéutica y de alimentos para recuperar los sólidos de emulsiones, suspensiones, dispersiones, soluciones acuosas y orgánicas (Baker y McKenzie, 2005). El producto sólido resultante puede estar en forma de gránulos o aglomerados, la forma depende de las propiedades físico-químicas de la alimentación y del diseño y operación del secador (Vega *et al.*, 2001; Filková *et al.*, 2006). En la Figura 2.4 se muestra el diseño básico de un secador por aspersion. El proceso consiste en esparcir el producto a secar usando un atomizador rotatorio o de boquilla, el producto al ser atomizado se fragmenta en partículas muy finas que inmediatamente al contacto con una corriente gaseosa caliente, generalmente aire, sufre una evaporación rápida. Lo anterior se debe a que la atomización del líquido en forma de gotas finas, incrementa significativamente el área superficial por unidad de volumen, llevándose a cabo la transferencia de calor y masa de forma rápida. Debido a la evaporación instantánea del agua en el producto, la temperatura del aire de secado disminuye rápidamente, en consecuencia siempre se mantiene una temperatura baja del producto. Lo anterior convierte al secado por aspersion en una operación viable para el secado de productos termo-sensibles (Filková *et al.*, 2006).



ANTECEDENTES

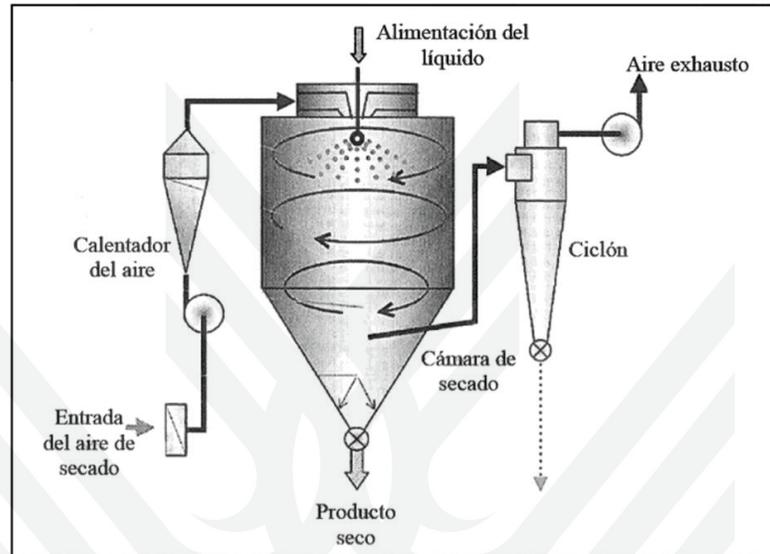


FIGURA 2.4 Diseño básico del secado por aspersión en ciclo abierto y flujo co-corriente (Adaptado de Vega *et al.*, 2001).

El secado por aspersión se ha convertido en un medio competitivo para la obtención de una amplia variedad de productos, por ejemplo: fórmulas lácteas, detergentes, colorantes, productos farmacéuticos, extractos secos, etc. (Büchi, 2002; Páramo, 2005). Específicamente en el área de extractos secos de plantas de uso medicinal, en la última década se han desarrollado diferentes proyectos para evaluar las propiedades físicas de las partículas obtenidas mediante secado por aspersión (Souza y Oliveira, 2006), para evaluar el efecto de este proceso sobre las propiedades químicas (Georgetti *et al.*, 2008; Kha *et al.*, 2010), antioxidantes y antimicrobianas (Arana *et al.*, 2010) del extracto seco, para evaluar la estabilidad del extracto seco obtenido durante el almacenamiento (Pang *et al.*, 2014), para evaluar la retención de compuestos bioactivos (Rajabi *et al.*, 2015), entre otros (Chiou y Langrish, 2007; Fernandes *et al.*, 2012).

Las variables de proceso a considerar durante el secado por aspersión son: flujo de alimentación, temperaturas de entrada y salida del gas de secado y sus propiedades (humedad, caudal). Por otra parte, las variables de formulación a considerar son: composición de la alimentación (compuestos bioactivos, material de soporte, tipo de disolvente), contenido de sólidos en la alimentación, viscosidad y tensión superficial de la solución de secado (Paudel *et al.*, 2013). En el caso del procesamiento de extractos vegetales debe considerarse que durante el secado por aspersión se presentan problemas de adherencia del producto en las paredes del secador (Papadakis *et al.*, 2006; Souza y Oliveira, 2006; Karaaslan y Dalgıç, 2012). Para tratar este problema el método



ANTECEDENTES

más común es la adición de agentes auxiliares de secado al producto a ser atomizado, también denominados como materiales de soporte (Papadakis *et al.*, 2006; Souza y Oliveira, 2006; Sollohub y Cal, 2010).

2.5.1 Materiales de soporte utilizados en secado por aspersión de extractos vegetales

Los extractos vegetales están formados por distintos compuestos de bajo peso molecular, lo cual resulta en la formación de depósitos sin secar en las paredes del secador, de los conductos y del ciclón; finalmente los conductos se obstruyen y la dinámica del secado cambia. El resultado final es un proceso ineficiente con bajos rendimientos y un producto seco higroscópico. Por otra parte, el extracto seco, debido a que es tan fino, fluye pobremente y durante el almacenamiento se hace no fluido debido al apelmazamiento (Jäger y Kilbride, 1997; Souza y Oliveira, 2006; Sollohub y Cal, 2010; Karaaslan y Dalgıç, 2012). Por ello los extractos vegetales se secan junto con materiales de soporte destinados a facilitar el proceso de secado por aspersión (Sollohub y Cal, 2010). Varios trabajos han reportado el secado por aspersión de extractos vegetales utilizando diferentes materiales de soporte, por ejemplo: maltodextrinas, almidones modificados, dióxido de silicio coloidal, celulosa microcristalina, β -ciclodextrina y goma arábica (Cortés y Oliveira, 2012). Cada material de soporte tiene ventajas y desventajas en cuanto a propiedades, coste y eficiencia de encapsulación; pero las maltodextrinas continúan siendo los materiales más reportados en el área de secado por aspersión de extractos vegetales (Papadakis *et al.*, 2006; Sansone *et al.*, 2011). Además de reducir la higroscopicidad del producto seco, otras ventajas del secado por aspersión con materiales de soporte son:

- (i) Encapsulación de los compuestos bioactivos. Los materiales de soporte proporcionan una barrera física que mejora la estabilidad físico-química del extracto seco durante su almacenamiento, debido a que protege los compuestos bioactivos contra reacciones de oxidación, contra las condiciones de humedad ambiental y contra cambios producidos por la luz y el calor. Además esta barrera generada mejora la retención de estos componentes durante la operación de secado (Gharsallaoui *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2013).
- (ii) Se aumenta la solubilidad acuosa de los compuestos bioactivos, esto es importante debido a que un porcentaje de estos componentes es poco soluble en agua, partiendo del hecho de que para su extracción se utilizan generalmente disolventes orgánicos como el etanol (fenoles, alcaloides) o el hexano (compuestos lipofílicos, como aceites esenciales o carotenoides) (Sollohub y Cal, 2010; da Silva *et al.*, 2013).



ANTECEDENTES

- (iii) Modificación de la capacidad de flujo de los extractos secos vegetales. Para la industria farmacéutica es importante obtener productos de flujo libre que faciliten la encapsulación o formación de comprimidos (Pereira de Souza *et al.*, 2007; Sollohub y Cal, 2010).

En el presente trabajo se estudió la dinámica del proceso de secado por aspersión de extractos alcohólicos de moringa utilizando una mezcla 95:5 (p/p) de (maltodextrina DE-10):(sílice precipitada), la cual se formuló atendiendo los resultados obtenidos por Vázquez (2013) y que se discuten más adelante. La maltodextrina es un agente auxiliar de secado común debido a su papel beneficioso como material de soporte y/o como un agente de encapsulación para aumentar la estabilidad de los compuestos bioactivos, es razonablemente barata y comercialmente disponible (Busso *et al.*, 2007; Kha *et al.*, 2010). Los dióxidos de silicio (por ejemplo, SIPERNAT® y Tixosil®) se han utilizado ampliamente como agentes auxiliares de secado adicionados directamente en el secado por aspersión de extractos vegetales debido a que actúan como reguladores de flujo (Oliveira *et al.*, 2006; Georgetti *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2010). Su adición aumenta el rendimiento del secado por aspersión (Evonik, 2015); además, este material es químicamente inerte, inocuo, estable térmicamente y seguro; las cuales son propiedades necesarias para obtener un excipiente farmacéutico (Souza y Oliveira, 2006).

2.5.2 Secado por aspersión en ciclo cerrado como alternativa para el secado de extractos orgánicos obtenidos de materiales vegetales

En el campo de la producción de extractos secos vegetales, la tendencia ha sido el uso exclusivo del secado por aspersión con una configuración en ciclo abierto (Figura 2.4), utilizando aire como agente de secado (Chiou y Langrish, 2007; Georgetti *et al.*, 2008; Bott *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2012; Karaaslan y Dalgıç, 2012; Simon-Brown *et al.*, 2016), el cual se utiliza sólo una vez y luego es expulsado a la atmósfera. Por lo tanto, la evaporación del disolvente orgánico utilizado para la extracción (por ejemplo, etanol) es una etapa necesaria para evitar su ignición durante el secado, sin embargo, esto implica una reducción del contenido de compuestos bioactivos termolábiles (Praveen *et al.*, 2008). Esto no es deseable porque un producto degradado es de bajo valor nutritivo y, en consecuencia, dificulta la intención de producir un aditivo para un alimento funcional, un producto nutracéutico o incluso para obtener un precursor químico para la industria farmacéutica (Pang *et al.*, 2014). Una opción para evitar la etapa de evaporación del disolvente orgánico es el uso del secado por aspersión en un ciclo cerrado (SACC) usando nitrógeno como gas de secado (Figura 2.5). En esta configuración, es posible trabajar de forma segura con disolventes orgánicos, se logra un secado por aspersión libre de explosiones debido a la atmósfera de gas inerte, además, en combinación con una unidad de condensación se puede recuperar el disolvente orgánico y evitar la contaminación del medio ambiente (Paudel *et al.*, 2013). En estos sistemas el gas de secado se vuelve a calentar



ANTECEDENTES

después de la eliminación del disolvente y se reintroduce en la cámara de secado. En consecuencia, el consumo de gas de secado se reduce en comparación con el sistema en ciclo abierto y es, por lo tanto, más económico en el funcionamiento normal a pesar de que las inversiones iniciales son mayores. Esta configuración se elige cuando se desean secar soluciones orgánicas inflamables, productos tóxicos o productos sensibles a la oxidación (Miller *et al.*, 2012; Paudel *et al.*, 2013).

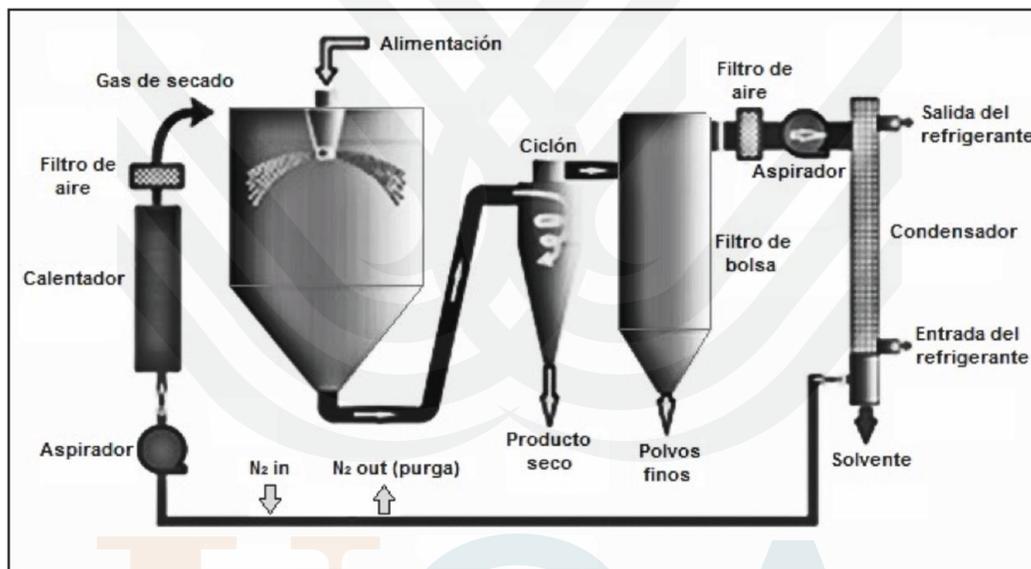


FIGURA 2.5 Diseño del secado por aspersión en ciclo cerrado y flujo co-corriente (Adaptado de Fuji Chemical Industry Co., 2012).

Un campo de estudio muy limitado sobre las aplicaciones de SACC en extractos de plantas está disponible en la literatura, siendo este proceso utilizado casi exclusivamente por la industria farmacéutica (Miller *et al.*, 2012; Ógáin *et al.*, 2012; Paudel *et al.*, 2013; Sass y Lee, 2014). Hasta la fecha de publicación de la presente tesis, sólo Vázquez (2013) describe el secado por aspersión de extractos de moringa de disolventes no acuosos. Vázquez (2013) evaluó el efecto del SACC a diferentes temperaturas de entrada (130 y 140 °C) y salida (60 y 70 °C) del nitrógeno sobre la retención de fenoles totales (FT), carotenoides totales (CT), ácido ascórbico (AAsc) y actividad antirradical (AAR) (ensayos DPPH y ABTS) de extractos etanólicos de hojas frescas de *Moringa oleifera*, utilizando nitrógeno como agente de secado. Empleó distintos materiales de soporte en diferentes proporciones respecto al contenido de sólidos en el extracto (66.67 y 50.00% de maltodextrina (MD) y 33.30 y 23.08% de β -ciclodextrina (CD) y sílice precipitada (SP)). El análisis

ANTECEDENTES

estadístico de sus resultados mostró un efecto significativo ($p < 0.05$) de las temperaturas de entrada y de salida, y la proporción de material de soporte sobre todas las respuestas. Las retenciones de FT (93%), AAsc (48%) y AAr (71% por DPPH y 92% por ABTS, respectivamente) se obtuvieron usando una proporción de 66.67% de MD, temperatura de entrada de 140 °C y temperatura de salida de 60 °C. La retención del 72% de los CT se obtuvo con 33.30% de SP a 130 y 60 °C. Los resultados con MD sugieren que a mayor contenido de material de soporte, la película de protección se forma más rápidamente alrededor de los compuestos bioactivos. Los resultados conseguidos con SP se asocian a su capacidad para absorber compuestos hidrofóbicos debido a su alta porosidad. Las partículas secas de extracto de moringa obtenidas por SACC mostraron retenciones superiores al 50% de compuestos bioactivos y AAr, abriendo perspectivas para su uso como aditivo alimentario y/o como fuente de principios activos para la industria farmacéutica. Sin embargo, la parte de ingeniería no fue abordada completamente por Vázquez (2013), cuyo enfoque hubiese permitido minimizar los recursos para obtener un extracto seco con niveles significantes de compuestos bioactivos que garanticen su eficacia. Sin embargo, encontrar las condiciones óptimas de procesamiento que maximicen la eficiencia térmica del proceso, y que a su vez minimicen las pérdidas de energía, requiere en la mayoría de los casos, numerosos tratamientos experimentales los cuales resultan caros, tardados y con frecuencia imprácticos. Es por ello que el procedimiento analítico es implementado, ya que se pueden obtener resultados muy exactos, utilizando modelos matemáticos que describan el comportamiento del proceso de secado, de una forma rápida y económica (Cengel y Ghajar, 2011).

2.5.3 Modelación del proceso de secado por aspersión

Existen diversos estudios sobre la modelación y simulación de la operación de secado por aspersión. Sin embargo, a pesar de que el proceso de secado por aspersión es ampliamente usado, pocos estudios han sido enfocados en la optimización del consumo de energía. Se cuenta con trabajos donde se ha modelado y simulado el proceso de secado por aspersión con el objetivo de evaluar los patrones de flujo y los perfiles de temperatura en la cámara de secado (Huang *et al.*, 2004), así como el tiempo de residencia y la trayectoria de las partículas (Huang *et al.*, 2005; Birchall *et al.*, 2006), la distribución del tamaño de las gotas, los depósitos de las partículas en la pared de la cámara, la temperatura de salida, el desempeño global del proceso de secado (Huang y Mujumdar, 2007), y las cinéticas de secado (Roustapour *et al.*, 2009). Sin embargo, en los trabajos anteriores, los modelos utilizados no describen las variables de estado necesarias para realizar el análisis termodinámico del proceso de secado por aspersión: la humedad y la temperatura del gas de secado y la humedad y temperatura del producto.



ANTECEDENTES

Palencia *et al.* (2002) desarrollaron un modelo dinámico que considera los balances de calor y masa en el aire, producto e interfase, en conjunto con la relación de equilibrio entre las fases. Con este modelo los autores lograron reproducir la operación en estado estable y el comportamiento dinámico experimental de un secador de aspersión escala planta piloto. Además, este modelo si proporciona las cuatro variables de estado necesarias para evaluar el consumo de energía, cuando éste alcanza el estado estable. Este modelo, es uno de los modelos más generales que han sido reportados debido a que está en términos de ecuaciones simultáneas de transferencia de calor y de masa interna y externa con una relación de equilibrio para el agua entre las fases en una serie de N etapas idealmente mezcladas dentro de la cámara de secado (Figura 2.6).

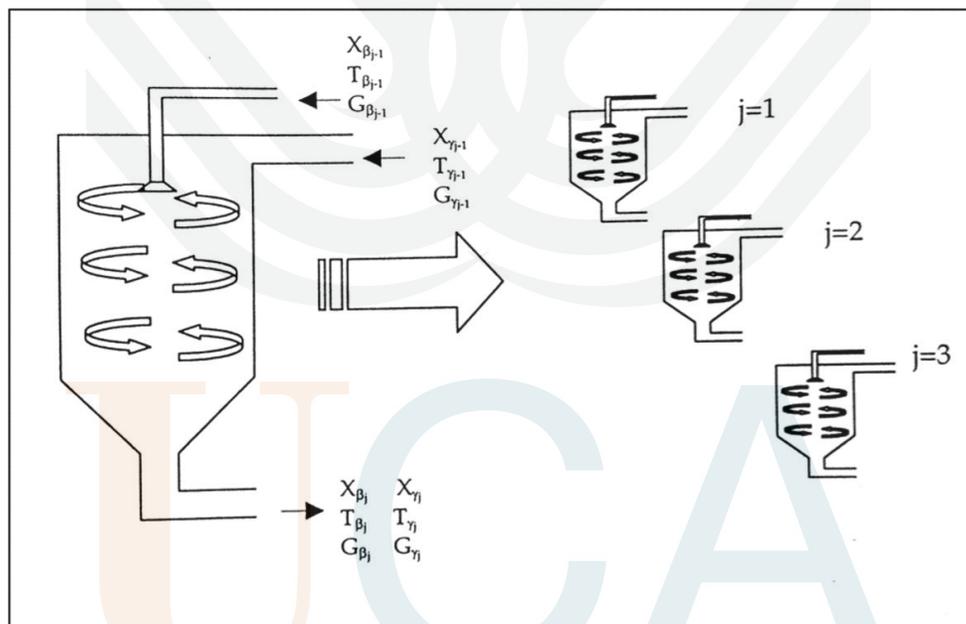


FIGURA 2.6 Esquema del modelo mecanicista del proceso de secado por aspersión (Adaptado de Palencia *et al.*, 2002).

El modelo mecanicista propuesto por Palencia *et al.* (2002), está representado por 4n ecuaciones diferenciales simultáneas junto con 3n ecuaciones algebraicas simultáneas. Este modelo representa la conducta dinámica de un secador por aspersión tanto en mezclado ideal ($n = 1$), con desviaciones del mezclado ideal ($n > 1$), o de flujo tapón ($n \approx 100$). Es por lo tanto, un sistema generalizado para modelar secadores de aire en operación continua. El modelo completo se presenta a continuación.

ANTECEDENTES

$$\frac{dX_{\beta j}}{dt} = \frac{k_{c\beta}a(X_{\beta j} - X_{\beta ji})}{1 - \varepsilon} - \frac{G_{\beta}(X_{\beta j} - X_{\beta ji})}{\rho_{\beta}(1 - \varepsilon)V_j} \quad (2.15)$$

$$\frac{dX_{\gamma j}}{dt} = \frac{k_{c\gamma}a(X_{\gamma ji} - X_{\gamma j})}{\varepsilon} - \frac{G_{\gamma}(X_{\gamma j} - X_{\gamma j-1})}{\rho_{\gamma}\varepsilon V_j} \quad (2.16)$$

$$\frac{dT_{\beta j}}{dt} = \frac{h_{\beta}a(T_{ji} - T_{\beta j})}{\rho_{\beta}(1 - \varepsilon)(Cp_{\beta} + Cp_w X_{\beta j})} - \frac{Cp_w T_{\beta j}}{(Cp_{\beta} + Cp_w X_{\beta j})} \frac{dX_{\beta j}}{dt} - \frac{G_{\beta}[(Cp_{\beta} + Cp_w X_{\beta j})T_{\beta j} - (Cp_{\beta} + Cp_w X_{\beta j-1})T_{\beta j-1}]}{\rho_{\beta}(1 - \varepsilon)V_j(Cp_{\beta} + Cp_w X_{\beta j})} \quad (2.17)$$

$$\begin{aligned} \frac{dT_{\gamma j}}{dt} = & -\frac{h_{\gamma}a(T_{\gamma j} - T_{ji})}{\rho_{\beta}\varepsilon(Cp_{\gamma} + Cp_{wv}X_{\gamma j})} + \frac{k_{c\beta}a\rho_{\beta}(X_{\beta j} - X_{\beta ji})\lambda}{\rho_{\gamma}\varepsilon(Cp_{\gamma} + Cp_{wv}X_{\gamma j})} \\ & - \frac{(H_{wv} + Cp_{wv}T_{\gamma j})}{(Cp_{\gamma} + Cp_{wv}X_{\gamma j})} \frac{dX_{\gamma j}}{dt} - \frac{1}{\varepsilon\rho_{\gamma}V_j(Cp_{\gamma} + Cp_{wv}X_{\gamma j})} \\ & \times \left[G_{\gamma} \left\{ [Cp_{\gamma}T_{\gamma j} + (H_{wv} + Cp_{wv}T_{\gamma j})X_{\gamma j}] \right. \right. \\ & \left. \left. - [Cp_{\gamma}T_{\gamma j-1} + (H_{wv} + Cp_{wv}T_{\gamma j-1})X_{\gamma j-1}] \right\} \right] \\ & - \frac{h_{out}A_{out}(T_{\gamma j} - T_{out})}{\varepsilon\rho_{\gamma}V_j(Cp_{\gamma} + Cp_{wv}X_{\gamma j})} \end{aligned} \quad (2.18)$$

Para $j = 1, 2, \dots, N$

$$X_{\gamma} - X_{\gamma i} - \frac{k_{c\beta}\rho_{\beta}}{k_{c\gamma}\rho_{\gamma}}(X_{\beta i} - X_{\beta}) = 0 \quad (2.19)$$

$$h_{\gamma}(T_{\gamma} - T_i) - h_{\beta}(T_i - T_{\beta}) - k_{c\beta}\rho_{\beta}(X_{\beta} - X_{\beta i})\lambda = 0 \quad (2.20)$$

$$X_{\gamma i} = \frac{a_w p_w / p}{1 - a_w p_w / p} \quad \text{donde } a_w = f(X_{\beta i}, T_i) \quad (2.21)$$



ANTECEDENTES

Específicamente, las ecuaciones (2.15) y (2.17) representan los balances de masa y calor de la fase dispersa (sólido), mientras que las ecuaciones (2.16) y (2.18) representan los balances de masa y calor para la fase continua (aire de secado), respectivamente. Las ecuaciones (2.19) – (2.21) representan el fenómeno interfacial entre la fase continua y la fase dispersa. Estas ecuaciones involucran la transferencia de masa y energía de las variables del proceso tales como: la humedad del producto (X_β), la temperatura del producto (T_β), la humedad del aire (X_γ) y la temperatura del aire (T_γ). El modelo propuesto se resuelve utilizando el método numérico de Runge-Kutta de cuarto orden en dos etapas. En la primera etapa se fijan las variables de entrada ($X_{\beta 0}, X_{\gamma 0}, T_{\beta 0}, T_{\gamma 0}$), se establece una condición arbitraria y se resuelve hasta que las variables de estado ($X_{\beta j}, X_{\gamma j}, T_{\beta j}, T_{\gamma j}$) se estabilizan. En la segunda etapa, los valores estables de las variables son tomados como valores iniciales, y una perturbación en cualquiera de las variables de entrada es introducida, y de esta forma, el comportamiento dinámico del proceso es evaluado. En general, con este simulador se puede predecir el comportamiento de las variables del proceso, con la finalidad de establecer las condiciones de operación (flujo másico y temperatura del aire de entrada) que se requieran en un proceso de secado por aspersión para obtener un producto con determinado contenido de humedad final y a su vez evaluar la cantidad de energía consumida por kilogramo de producto obtenido.

Con respecto a los estudios realizados sobre el consumo de energía del proceso de secado por aspersión, Luna-Solano *et al.* (2005) realizaron la optimización del proceso de secado de levadura de cerveza usando el modelo mecanicista propuesto por Palencia *et al.* (2002). El objetivo de Luna-Solano *et al.* (2005) fue minimizar el consumo de energía requerido para obtener una producción de levadura de cerveza deshidratada a una humedad y viabilidad dada, obteniendo resultados satisfactorios. Con los resultados obtenidos por Palencia *et al.* (2002) y Luna-Solano *et al.* (2005), se puede inferir que el modelo de Palencia *et al.* (2002) puede dar buenos resultados si se quiere escalar el proceso a nivel industrial. Sin embargo, la resolución del modelo se basa en el conocimiento de las propiedades del gas de secado utilizado convencionalmente en un sistema abierto: el aire. Además considera que la fase líquida de alimentación está conformada sólo por agua.

En el presente proyecto se propuso el uso del SACC para obtener extractos alcohólicos secos de moringa, es decir, el material a secar se definió como un sistema agua:etanol:sólidos y el gas de secado utilizado fue el nitrógeno. En este contexto, Aguirre-Alonso (2016) para describir el SACC de un sistema agua:etanol:sólidos:nitrógeno tomó los balances de masa y calor en ambas fases del modelo propuesto por Palencia *et al.* (2002) y adicionó la contribución del etanol en el sistema, quedando de la siguiente manera:

$$\rho_\beta V(1 - \varepsilon) \frac{dX_{w\beta 1}}{dt} = -G_\beta (X_{w\beta 1} - X_{w\beta 0}) - N_w aV \quad (2.22)$$

$$\rho_\beta V(1 - \varepsilon) \frac{dX_{e\beta 1}}{dt} = -G_\beta (X_{e\beta 1} - X_{e\beta 0}) - N_e aV \quad (2.23)$$



ANTECEDENTES

$$\rho_{\beta}V(1 - \varepsilon)\frac{dh_{\beta 1}}{dt} = -G_{\beta}(h_{\beta 1} - h_{\beta 0}) - (q_1 + q_2)aV \quad (2.24)$$

$$\rho_{\gamma}V\varepsilon\frac{dX_{w\gamma 1}}{dt} = -G_{\gamma}(X_{w\gamma 1} - X_{w\gamma 0}) + N_w aV \quad (2.25)$$

$$\rho_{\gamma}V\varepsilon\frac{dX_{e\gamma 1}}{dt} = -G_{\gamma}(X_{e\gamma 1} - X_{e\gamma 0}) + N_e aV \quad (2.26)$$

$$\rho_{\gamma}V\varepsilon\frac{dh_{\gamma 1}}{dt} = -G_{\gamma}(h_{\gamma 1} - h_{\gamma 0}) + (q_1 + q_2)aV \quad (2.27)$$

$$h_{\beta} = (Cp_s + Cp_w X_{w\beta} + Cp_e X_{e\beta})T_{\beta} \quad (2.28)$$

$$h_{\gamma} = Cp_{N_2}T_{\gamma} + (H_{wv}^0 + Cp_{wv}T_{\gamma})X_{w\gamma} + (H_{ev}^0 + Cp_{ev}T_{\gamma})X_{e\gamma} \quad (2.29)$$

Las ecuaciones (2.22) – (2.24), representan los balances de masa y calor para la fase sólido-líquido, mientras que las ecuaciones (2.25) – (2.27) representan los balances de masa y calor para la fase gaseosa. En las ecuaciones (2.23) y (2.26) se incorporan los balances de masa para el etanol en ambas fases. Las relaciones de entalpías se expresan en las ecuaciones (2.28) y (2.29), y están formuladas en términos de la temperatura.

Las ecuaciones planteadas por Aguirre-Alonso (2016) involucran la transferencia de masa y energía de las variables del proceso necesarias para el análisis termodinámico del proceso de secado: la humedad que corresponde a la fracción de agua ($X_{w\beta}$) y la fracción de etanol ($X_{e\beta}$) en el producto, la humedad que corresponde a la fracción de agua ($X_{w\gamma}$) y la fracción de etanol ($X_{e\gamma}$) en el gas de secado, así como las entalpías del producto en términos de la temperatura del producto (T_{β}) y la temperatura del gas de secado (T_{γ}). Con este modelo es posible predecir las variables fundamentales que definen el estado del proceso: concentración de agua de salida, concentración de etanol de salida, entalpía de salida y por lo tanto la temperatura de salida tanto del producto como del gas de secado.

Aguirre-Alonso (2016) se basó en las ecuaciones de flujo de transferencia de masa para la fase dispersa y fase continua propuestas por García y Ragazzo (2000) para considerar la fracción de agua (Ec. (2.30)) y la fracción de etanol (Ec. (2.31)) en el gas de secado, en función del coeficiente de transferencia de masa externo ($k_{c\gamma}$) y en función de las propiedades del flujo del gas de secado; quedando finalmente representadas como:

$$N_w = k_c \rho_{\gamma}(X_{w\gamma i} - X_{w\gamma 1}) \quad (2.30)$$

$$N_e = k_c \rho_{\gamma}(X_{e\gamma i} - X_{e\gamma 1}) \quad (2.31)$$

ANTECEDENTES

Aguirre-Alonso (2016) aplicó el mismo criterio para representar las ecuaciones de flujo de transferencia de calor:

$$q_1 = h(T_{\beta 1} - T_{\gamma 1}) \quad (2.32)$$

$$q_2 = (N_w + N_e)\lambda \quad (2.33)$$

donde h es expresado en términos de la conductividad del producto y sus alrededores, y λ representa el calor latente de vaporización considerando el calor necesario para evaporar la fracción de agua y etanol.

Para calcular el calor latente de vaporización λ (Ec. (2.34)) se aplica la sumatoria del calor latente de vaporización del agua pura (Ec. (2.35)) y el calor latente de vaporización del etanol puro (Ec. (2.36)), anexando un coeficiente de actividad γ_3 debido a que las ecuaciones del calor latente de vaporización del agua pura y del etanol puro son para mezclas ideales y el sistema sólido:etanol:agua:nitrógeno no sigue ese comportamiento. Dicho coeficiente (γ_3) fue calculado por Huesca-Osorio (2014) al analizar la dinámica de la evaporación de mezclas complejas mediante el uso de un modelo de calentamiento-evaporación para extracto de vainilla en un evaporador rotatorio.

$$\lambda = (\lambda_w x_w \beta_w + \lambda_e x_e \beta_w) \gamma_3 \quad (2.34)$$

$$\lambda_w = H_{wv}^0 + Cp_{wv} T_\beta - Cp_w T_\beta \quad (2.35)$$

$$\lambda_e = H_{ev}^0 + Cp_{ev} T_\beta - Cp_e T_\beta \quad (2.36)$$

A partir de las ecuaciones generadas por Huesca-Osorio (2014), Aguirre-Alonso (2016) planteó las ecuaciones para calcular la fracción másica de agua (Ec. (2.37)) y etanol (Ec. (2.38)) en un mezcla binaria, las cuales son necesarias para el cálculo del calor latente de vaporización:

$$x_{w\beta e} = \frac{x_{w\beta}}{x_{ew\beta}} \quad (2.37)$$

$$x_{e\beta w} = \frac{x_{e\beta}}{x_{ew\beta}} \quad (2.38)$$

Aguirre-Alonso (2016) partió de las ecuaciones generadas por Huesca-Osorio (2014) para representar los fenómenos interfaciales en la fase continua y la fase dispersa:

$$X_{eyi} = \frac{x_{eywi}^* x_{vyi}^* M_e}{1 - p_v/p} M_{N_2} \quad (2.39)$$

$$X_{wyi} = \frac{x_{wywi}^* x_{vyi}^* M_w}{1 - p_v/p} M_{N_2} \quad (2.40)$$

ANTECEDENTES

en donde $x_{w\gamma w}^*$ y $x_{e\gamma w}^*$ son la fracción molar de agua y etanol como mezcla binaria en la interfase. A la ecuación del cálculo de fracción másica de etanol para la fase gaseosa se le agregó un coeficiente de actividad γ_2 debido a que la mezcla no sigue un comportamiento ideal, representándose como se muestra (Huesca-Osorio, 2014):

$$x_{e\gamma w}^* = \frac{p_{ev}^0 \gamma_2}{p_v} \quad (2.41)$$

$$x_{w\gamma w}^* = 1 - x_{e\gamma w}^* \quad (2.42)$$

y para la fracción molar etanol-agua en la interfase de acuerdo a la ley de gases ideales se tiene que:

$$x_{v\gamma}^* = \frac{p_v}{P} \quad (2.43)$$

Para calcular la presión de vapor, Aguirre-Alonso (2016) siguió lo reportado por Huesca-Osorio (2014) y consideró que la presión de vapor de la mezcla es la suma de la presión de vapor del agua y la presión de vapor del etanol, y cada una está en función de la temperatura:

$$p_v^0 = p_{wv}^0(T_\beta) x_{w\beta w}^* + p_{ev}^0(T_\beta) x_{e\beta w}^* \quad (2.44)$$

y en las cuales se considera la fracción molar del agua ($x_{w\beta w}^*$) y el etanol ($x_{e\beta w}^*$) como una mezcla binaria en sólidos:

$$x_{e\beta w}^* = \frac{X_{e\beta}/M_e}{X_{e\beta}/M_e + X_{w\beta}/M_w} \quad (2.45)$$

$$x_{w\beta w}^* = \frac{X_{w\beta}/M_w}{X_{e\beta}/M_e + X_{w\beta}/M_w} \quad (2.46)$$

Para calcular la presión de vapor se agregó un coeficiente de actividad (γ_1) el cual representa la desviación de la conducta ideal, debido a que la mezcla no es un gas ideal y no sigue la ley de Raoult, quedando como (Huesca-Osorio, 2014):

$$p_v = \gamma_1 a_{we} p_v^0 \quad (2.47)$$

donde a_{we} expresa las interacciones termodinámicas de los sólidos de la alimentación. Aguirre-Alonso (2016) utilizó la ecuación de Henderson modificada por Salgado-Cervantes *et al.* (1994) para describir la a_{we} en función de la temperatura y humedad del producto:

$$a_{we} = 1 - \exp\left(-k_1 T_\beta^{k_2} X_{ew\beta}^{k_3}\right) \quad (2.48)$$

$$\text{donde } X_{ew\beta} = X_{w\beta} + X_{e\beta} \quad (2.49)$$

ANTECEDENTES

La función que relaciona la actividad del agua de la fase dispersa (a_w) con su contenido de humedad a una temperatura dada se conoce como isoterma de sorción (Palencia *et al.*, 2002) y es particular para cada producto alimenticio (Al-Muhtaseb *et al.*, 2002).

Los coeficientes de actividad ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$) propuestos por Huesca-Osorio (2014) son los siguientes:

$$\gamma_1 = 6.0502x_{e\beta w}^3 - 9.2498x_{e\beta w}^2 + 4.1078x_{e\beta w} + 1.0123 \quad (2.50)$$

$$\gamma_2 = 1 + 4.4942\exp(-8.505x_{e\beta w}) \quad (2.51)$$

$$\gamma_3 = 0.59781x_{e\beta w}^{-0.176} \quad \text{Si } x_{e\beta w} > 0.005 \quad (2.52)$$

$$\gamma_3 = 1 \quad \text{Si } x_{e\beta w} \leq 0.005 \quad (2.53)$$

Aguirre-Alonso (2016) utilizó γ_1 para corregir la presión de vapor de la ecuación (2.47), γ_2 para corregir las fracciones de etanol en la fase gaseosa de la ecuación (2.41) y γ_3 para corregir el calor latente de vaporización de la ecuación (2.34).

Finalmente, para considerar el sistema como un ciclo cerrado, Aguirre-Alonso (2016) anexó un balance de energía de la fase gaseosa para el condensador de la bomba de calor (Ec. (2.54)), de esta forma se puede calcular la energía teórica consumida en el proceso de SACC de extractos cuya fase líquida esté compuesta por etanol y agua, y donde el gas de secado sea nitrógeno (N_2).

$$h_\gamma = Cp_{N_2}T_\gamma + (H_{wv}^0 + Cp_{wv}T_\gamma)X_{w\gamma} + (H_{ev}^0 + Cp_{ev}T_\gamma)X_{e\gamma} \quad (2.54)$$

Al igual que el modelo de Palencia *et al.* (2002), las variables del modelo propuesto por Aguirre-Alonso (2016) están directamente relacionadas con el consumo de energía y materia prima, y con la productividad y la humedad final del producto, pero no se correlacionan con el contenido de compuestos bioactivos en el producto final, lo cual fue de interés particular durante el presente proyecto debido a la naturaleza de la alimentación: extracto de moringa con un contenido de compuestos fenólicos con distintas acciones terapéuticas. Por ello se recurrió a recuperar datos cuantitativos a partir de un diseño experimental para definir el efecto de las variables independientes del SACC y sus interacciones sobre el contenido de compuestos fenólicos de referencia de extractos de moringa. Con la información obtenida se correlacionaron tanto criterios térmicos como de calidad para la definición de las variables del secado por aspersión de extractos de moringa que permitiesen obtener el mayor contenido posible de compuestos fenólicos en el producto final, con el menor consumo de energía.



ANTECEDENTES

2.6 Pruebas aceleradas de estabilidad de compuestos bioactivos

Una vez obtenido el extracto seco se deben asegurar las propiedades del producto a través de condiciones de almacenamiento que permitan reducir reacciones físico-químicas, la adsorción de agua y el crecimiento de microorganismos, como bacterias, mohos y levaduras. En productos hechos a base de plantas, los cambios en el contenido de compuestos bioactivos en función del tiempo de almacenamiento, pueden evaluarse a través de pruebas de estabilidad. Estas pruebas se realizan bajo condiciones controladas de temperatura, humedad relativa, oxígeno y/o luz. Los resultados de las pruebas de estabilidad permiten establecer la vida útil del producto y las condiciones de almacenamiento necesarias para mantener sus propiedades. Normalmente, la degradación de compuestos bioactivos en forma de partículas secas es muy lenta, por esta razón es habitual elegir condiciones de almacenamiento de estrés, utilizando temperaturas y humedades altas para acelerar la predicción de estabilidad (Bott *et al.*, 2010).

Debido a que los extractos secos de materiales vegetales pueden contener diferentes y múltiples compuestos bioactivos, la medición de la estabilidad y la determinación de la vida útil son particularmente desafiantes, independientemente de si se conocen los componentes con la acción terapéutica definida. La mayoría de los trabajos en pruebas aceleradas de estabilidad se centran en pocos compuestos de referencia para simplificar el trabajo (Stefan y Chantal, 2005).

El estado físico de los extractos secos de materiales vegetales es muy sensible a pequeños cambios en la temperatura y la humedad relativa que pueden ocurrir en las condiciones de almacenamiento habituales de estos productos. Esto se atribuye al contenido de componentes de bajo peso molecular, de azúcares y ácidos orgánicos y a la cantidad de agua de estos materiales. Por ello, estas variables se consideran factores cruciales de estudio durante las pruebas aceleradas de estabilidad de extractos secos (Moraga *et al.*, 2012).

2.7 Síntesis de antecedentes

Las plantas medicinales contienen una serie de sustancias que pueden tener un impacto sobre la prevención de algunas enfermedades, estos constituyentes son denominados compuestos bioactivos (Azmir *et al.*, 2013). En la actualidad estas sustancias están siendo ampliamente investigadas en laboratorios de las industrias farmacéutica y alimentaria. De acuerdo a los antecedentes mostrados, las hojas de moringa tienen potencial para ser utilizadas como fuente de compuestos bioactivos con acción terapéutica. Sin embargo, hay muchos factores que pueden afectar los niveles de los componentes activos obtenidos a partir de plantas: las condiciones climáticas durante el desarrollo del árbol, la composición del suelo donde se cultive el árbol, las condiciones de extracción de los compuestos bioactivos y el secado por aspersión de los extractos vegetales .



ANTECEDENTES

En México el cultivo de moringa se ha extendido exitosamente debido a las ventajas de explotación y consumo que representa (Olson y Alvarado-Cárdenas, 2016), sin embargo, no se ha encontrado ningún estudio que haya sido llevado a cabo sobre la evolución del contenido de compuestos bioactivos de hojas de moringa cultivados en México, y la información disponible en literatura (Tabla 2.1) no permite inferir cómo las variables agronómicas afectan el perfil fitoquímico de las hojas de moringa. Por esta razón, se inició un programa de colaboración con el Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz - México, para dar seguimiento a la evolución de compuestos bioactivos de cultivos de moringa durante su desarrollo, y también, con la finalidad de determinar el lote a explotar durante el presente trabajo de investigación.

En otro contexto, aunque existen numerosos trabajos que proponen otros métodos, o nuevas técnicas de extracción, la maceración en etapas simples es el proceso más utilizado por investigadores e industriales para la extracción de compuestos bioactivos a partir de materiales vegetales. Hasta la fecha, no se ha estudiado la transferencia de masa durante la extracción de hojas de moringa y no se han encontrado reportes de extracción de compuestos bioactivos de moringa utilizando maceración por lote en etapas múltiples a contracorriente (Tabla 2.2), lo cual permitiría mejorar la eficiencia de extracción. Por lo tanto, se decidió generar información fundamental sobre las propiedades de transferencia de masa y estimar la distribución de concentración entre fases en el equilibrio a partir de cinéticas de extracción sólido-líquido en una sola etapa de hojas secas de moringa. Con dicha información se propuso resolver el modelo teórico conceptualizado por Castillo-Santos *et al.* (2016) para definir el número de etapas y la cantidad de disolvente requeridos para producir el máximo rendimiento de extracción con la máxima concentración de extracto. Con esto se buscó garantizar la alimentación de un extracto crudo con el mayor contenido de sólidos y de compuestos bioactivos al secado por aspersión, el cual se decidió operar en ciclo cerrado utilizando nitrógeno como gas de secado para evitar una etapa previa de evaporación del disolvente orgánico utilizado durante la extracción, la cual se asocia con la degradación de compuestos bioactivos.

Como se ha mencionado anteriormente, el modelo propuesto por Aguirre-Alonso (2016) permite estimar la cantidad de energía consumida durante el SACC de extractos cuya fase líquida esté compuesta por etanol y agua, y donde el gas de secado sea nitrógeno. Sin embargo, con dicho modelo no es posible inferir qué efecto tienen las variables independientes del SACC sobre el contenido de compuestos bioactivos del extracto alimentado. Por lo cual fue necesario generar la información necesaria para definir cómo las condiciones del SACC afectan la retención de compuestos bioactivos de extractos de moringa.



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estudiar la termodinámica del proceso de obtención de extractos secos de *Moringa oleifera*.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la edad del árbol, los factores climáticos y los parámetros físicos y químicos del suelo sobre el contenido de compuestos bioactivos y la actividad antirradical de extractos etanólicos de hojas secas de moringa.
- Optimizar el proceso de extracción de compuestos bioactivos de hojas secas de moringa con respecto al rendimiento de sólidos extraíbles.
- Evaluar el proceso de secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado del extracto etanólico de hojas secas de moringa con respecto a la retención de compuestos fenólicos de referencia y el consumo de energía.
- Estudiar el efecto de la temperatura y humedad relativa sobre la estabilidad de compuestos fenólicos de referencia en los extractos secos.

Tesis Doctoral

4 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se dividió en cinco etapas para alcanzar cada uno de los objetivos específicos planteados, las cuales se describen en la Figura 4.1.

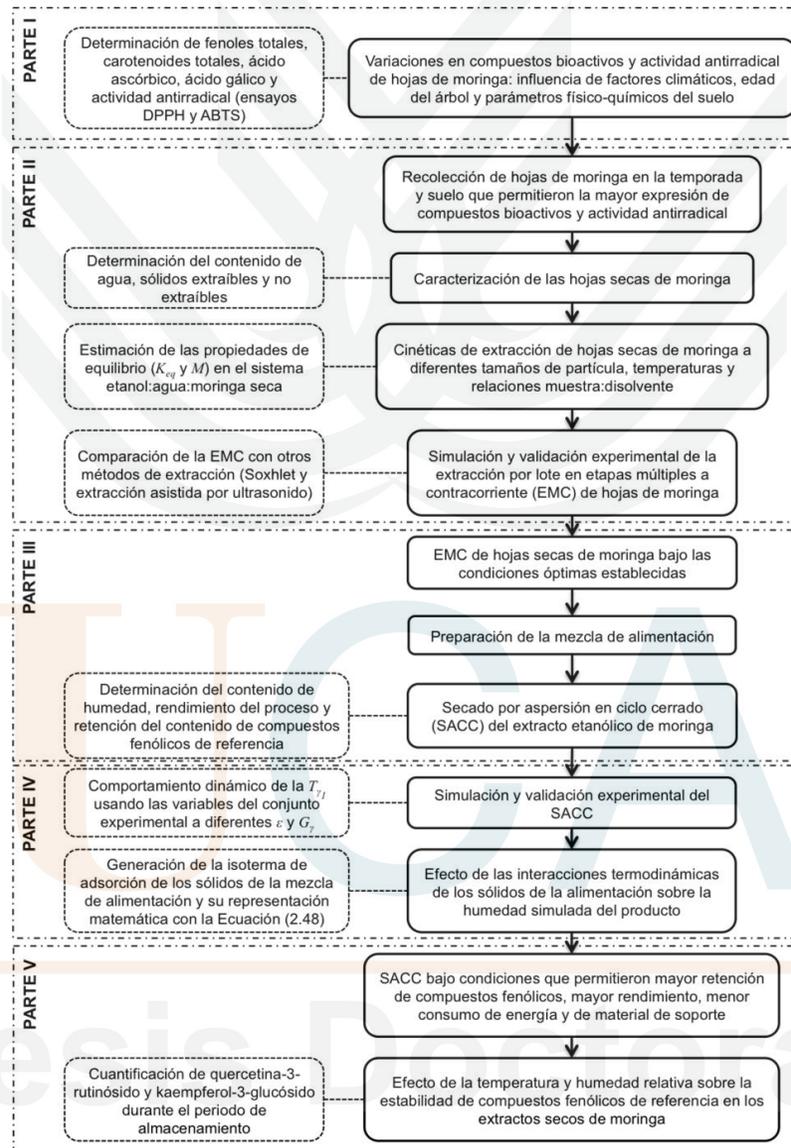


FIGURA 4.1 Diagrama general de la metodología seguida en el presente trabajo.



4.1 Estudio de las variaciones del contenido de compuestos bioactivos y actividad antirradical de hojas de moringa

Este estudio se realizó para investigar la evolución del contenido de fenoles totales, carotenoides totales, ácido ascórbico y ácido gálico; y la actividad antirradical expresada como capacidad de captación de radicales libres de extractos etanólicos obtenidos a partir de hojas liofilizadas de moringa cosechadas en diferentes etapas de desarrollo del árbol. También se estudió si existe alguna correlación entre las variables estudiadas en el material vegetal y la composición del suelo.

4.1.1 Sitio de cultivo de la materia prima

Las hojas frescas de moringa se recolectaron en el Colegio de Postgraduados (COLPOS), ubicado en el centro del estado de Veracruz, en la costa este de México, en diferentes fechas de recolección: junio, julio y septiembre de 2014; enero y mayo de 2015. Las hojas fueron recolectadas de tres parcelas (A, B y C), cada una en diferentes edades. Las hojas maduras de moringa se recolectaron a mano aleatoriamente de las ramas medias de los árboles de moringa. Se descartaron las hojas tiernas y con daños físicos, los criterios para seleccionar las hojas de moringa se basaron en los resultados obtenidos por Sreelatha y Padma (2009). Las hojas se lavaron con agua destilada para eliminar la suciedad y se eliminó el exceso de agua. Posteriormente, las hojas se almacenaron a -32 °C y se procesaron en menos de 48 h. Todas las parcelas de moringa fueron sometidas a prácticas de cultivo idénticas para minimizar la influencia de factores pre- y post- cosecha.

4.1.2 Reactivos y disolventes

El 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), 2,2'azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS), persulfato de potasio, reactivo de Folin-Ciocalteu, 2,6-dicloroindofenol sódico, ácido metafosfórico, ácido ascórbico, trolox y ácido gálico se adquirieron en Sigma Chemicals (Toluca, México). El carbonato sódico, bicarbonato sódico, hexano, acetona, metanol y ácido acético glacial se adquirieron en JT Baker (CDMX, México). El óxido de magnesio y el etanol se adquirieron en Golden Bell Reagents (CDMX, México) y la celita en LABESSA (CDMX, México). Todos los disolventes utilizados en este estudio fueron de grado analítico, excepto el metanol y el ácido acético glacial, que fueron grado HPLC. Se trabajó con agua purificada en sistemas Hydrox 40 (Mirage Corp.; Ciudad Obregón, Sonora, México) y Simplicity® (Millipore SAS; Molsheim, Francia) para obtener agua desionizada y tipo 1, respectivamente.



4.1.3 Preparación de la muestra

La extracción sólido-líquido es un proceso de separación bien conocido, cuyo rendimiento puede aumentarse con una etapa previa de deshidratación y una reducción del tamaño de partícula; además, en el caso particular de la extracción de compuestos bioactivos a partir de materiales vegetales, el proceso de secado evita la interferencia del agua en la liberación de polifenoles (Ahmad *et al.*, 2013a). Por estas razones, las hojas de moringa se liofilizaron por 18 h a $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 4.5 Pa usando un liofilizador de laboratorio (LABCONCO, FreeZone Mod. 7740060; Kansas City, Misuri, EE. UU.). Este método de secado se seleccionó para evitar la degradación de compuestos bioactivos por altas temperaturas. Las hojas secas se molieron usando un molino de café (160 W, KRUPS, Mod. GX410011; Parsippany-Troy Hills, NJ, EE. UU.), y posteriormente, se tamizaron para lograr un tamaño de partícula estándar $< 0.59\text{ mm}$ (malla metálica ASTM No. 30). Las muestras obtenidas se empacaron al vacío en bolsas laminadas y se almacenaron a $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta sus análisis posteriores.

4.1.4 Extracción asistida por ultrasonido

Para la cuantificación del ácido gálico y para los ensayos DPPH, ABTS y Folin-Ciocalteu, se realizó una extracción sólido-líquido. Las muestras de hojas liofilizadas se extrajeron con una mezcla 80:20 (p/p) de etanol:agua. Los extractos etanólicos de hojas de moringa se obtuvieron usando una proporción de 0.01 (g de muestra)/(mL de disolvente) y 30 minutos en baño ultrasónico (Westprime Systems, Cat. No. B90-055H; Chino, California, EE. UU. Potencia de ultrasonido: 100 W, frecuencia: 45 kHz). Estas condiciones de operación se establecieron en un trabajo previo realizado en el laboratorio, donde se evaluaron las cinéticas de extracción a diferentes proporciones (g de muestra)/(mL de disolvente) para determinar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio entre las fases y la relación (g de muestra)/(mL de disolvente) necesaria para obtener los rendimientos más altos de sólidos, contenido de fenoles totales y actividad antirradical (ensayos DPPH y ABTS). El agua en el baño ultrasónico se mantuvo a nivel con la superficie del disolvente en los matraces Erlenmeyer, y se reguló a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar un aumento de la temperatura provocado por la cavitación. Después de la extracción, los extractos se filtraron con papel de filtro Whatman No. 4. Todos los extractos se mantuvieron a $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta análisis adicionales. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

4.1.4.1 Determinación de actividad antirradical por ensayo DPPH

La actividad antioxidante de los extractos de hojas liofilizadas de moringa sobre radicales DPPH se midió en términos de capacidad de donación de hidrógeno o de eliminación de radicales de acuerdo con el método descrito por Siddhuraju y Becker (2003). Se añadieron 0.1 mL de extracto a

MATERIALES Y MÉTODOS

3.9 mL de solución metanólica de DPPH (0.025 g/L). La mezcla se dejó incubar en oscuridad durante 90 min a 25 ± 1 °C. La disminución en la absorbancia a 517 nm se determinó con un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, Mod. Genesys 10S; Waltham, MA, EE. UU.). La solución de referencia se preparó con 0.1 mL del disolvente de extracción y 3.9 mL de solución de DPPH. El porcentaje de actividad antirradical (AAR) se calculó con la siguiente ecuación:

$$AAR(\%) = \frac{A_R - A_S}{A_R} 100 \quad (4.1)$$

donde A_S es la absorbancia de las muestras y A_R es la absorbancia de la referencia. Los resultados se expresaron como equivalentes de trolox (ET) en gramos por 100 g de base seca (g ET/100 g bs). La curva de calibración (Apéndice A) se realizó con una solución stock de trolox (1 mg/mL) con el disolvente de extracción, que se diluyó para dar 0.200, 0.100, 0.050, 0.025 y 0.010 mg/mL.

4.1.4.2 Determinación de actividad antirradical por ensayo ABTS

La actividad de captación de radicales ABTS del extracto de hojas liofilizadas de moringa se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito previamente por Re *et al.* (1999). Para la formación del catión radical ABTS ($ABTS^{+\bullet}$), a una solución acuosa de persulfato de potasio (0.0066 g en 5 mL) se adicionó una solución de ABTS (0.0384 g en 5 mL de agua) y se dejó en oscuridad durante 16 h a 25 ± 1 °C. Esta solución se diluyó con etanol absoluto para generar una absorbancia de 0.70 ± 0.05 a 734 nm, generalmente en una proporción $ABTS^{+\bullet}$:etanol absoluto de 1:100. La mezcla de reacción final (1 mL) se preparó a partir de 980 μ L de la solución etanólica de $ABTS^{+\bullet}$ y 20 μ L de la muestra. Esta mezcla de reacción se agitó en vórtex durante 10 s, y después de 7 min, la absorbancia se registró a 734 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis. La solución de referencia se obtuvo añadiendo 20 μ L del disolvente de extracción en lugar del extracto. El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la ecuación (4.1). Los resultados se expresaron como equivalentes de trolox (ET) en gramos por 100 g de base seca (g ET/100 g bs). La curva de calibración (Apéndice A) se realizó con una solución stock de trolox (1 mg/mL) con el disolvente de extracción, que se diluyó para dar 0.200, 0.100, 0.050, 0.025 y 0.010 mg/mL.

4.1.4.3 Cuantificación de fenoles totales (CFT)

El contenido de fenoles totales (CFT) se determinó por el método Folin-Ciocalteu reportado por Chumark *et al.* (2008). Se transfirieron 100 μ L de extracto a un matraz volumétrico de 10 mL y se añadieron 6 mL de agua y 0.5 mL de reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu y posteriormente fueron mezclados en vortex por 10 s. Después de 5 minutos, se añadieron 1.5 mL de solución de carbonato de sodio (20% p/v). La mezcla de reacción se aforó a 10 mL con agua y se agitó nuevamente en



MATERIALES Y MÉTODOS

vortex por 10 s. La solución se mantuvo en oscuridad durante 2 h a 25 ± 1 °C. La absorbancia se registró a 760 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. El CFT se expresó como equivalentes de ácido gálico en gramos por 100 g de base seca (g EAG/100 g bs). La curva de calibración (Apéndice A) se realizó con una solución madre de ácido gálico (1 mg/mL) con el disolvente de extracción, que se diluyó para dar 0.90, 0.80, 0.60, 0.40, 0.20, 0.10 y 0.05 mg/mL.

4.1.4.4 Cuantificación de ácido gálico por HPLC

La separación e identificación de ácido gálico se llevó a cabo en un equipo HPLC (Varian ProStar, Mod. 240; Markham, Ontario, Canada) acoplado a un detector UV-vis (Waters, Mod. 2487; Milford, MA, EE. UU.) ajustado a 260 nm. Antes de realizar las inyecciones, muestras de 2 mL de cada uno de los extractos etanólicos de hojas de moringa se filtraron a través de un filtro de jeringa de nylon de 0.22 μm . El volumen de inyección fue de 10 μL ó 20 μL , según la muestra analizada. La separación se realizó en una columna de fase reversa C18 (longitud: 150 mm; diámetro interno: 4.6 mm; tamaño de partícula: 5 μm) a 35 °C. La fase móvil consistió en agua con ácido acético al 1% (disolvente A) y metanol (disolvente B). El caudal se mantuvo a 1.3 mL·min⁻¹ utilizando una elución isocrática (60% del disolvente A y 40% del disolvente B) durante 25 min, seguido de 5 min de lavado. Los resultados cuantitativos (mg·g bs⁻¹) se obtuvieron por comparación de las áreas de los picos de las muestras con la del estándar puro a través de la curva de calibración correspondiente (Apéndice B).

4.1.5 Cuantificación de carotenoides totales

La extracción, separación y cuantificación de los carotenoides totales en las muestras se realizaron de acuerdo al método oficial 941.15 (AOAC, 2006) para plantas secas, con ligeras modificaciones basadas en los trabajos de Ranganna (1999) y Rodríguez (2001). Las técnicas se basan en que la mayoría de los carotenoides exhiben absorción en la región visible del espectro entre 400 y 500 nm, y obedecen a la ley de Lambert-Beer. Se extrajeron 0.5 g bs de la muestra con 20 mL de una mezcla 30:70 (v/v) de acetona:hexano. Todas las muestras se sometieron a extracción asistida por ultrasonido durante 5 minutos (potencia de ultrasonido: 100 W, frecuencia: 45 kHz) en un baño ultrasónico. Se realizaron lavados con agua en un embudo de decantación y se recogió el sobrenadante. Los sobrenadantes se llevaron a 20 mL con hexano. Finalmente, la separación de carotenoides se realizó por cromatografía en columna abierta. La columna se preparó de acuerdo con Ranganna (1999): 3 cm³ de una mezcla 1:2 (p/p) de óxido de magnesio:celite, 1 cm³ de una mezcla 1:4 (p/p) de óxido de magnesio:celite y 1 cm³ de sulfato de sodio anhidro en la parte superior. La mezcla de carotenoides se separó de la columna antes que todos los demás pigmentos, sólo se recolectó esta porción y se evitó la contaminación con las otras bandas. La absorbancia de cada



MATERIALES Y MÉTODOS

porción principal recolectada se midió a 450 nm en un espectrofotómetro UV-vis. El contenido de carotenoides totales (CT) se calculó con la ecuación (4.2), y los resultados se expresaron en miligramos por 100 g de base seca ($\text{mg}\cdot 100 \text{ g bs}^{-1}$).

$$CT (\mu\text{g/g bs}) = \frac{A_s \cdot V \cdot 1000}{A \cdot G} \quad (4.2)$$

donde A_s es la absorbancia de las muestras a 450 nm, V es el volumen total de extracto (mL), A es el coeficiente de absorción para una mezcla de carotenoides (2500) y G es el peso de la muestra (g bs).

4.1.6 Determinación del contenido de ácido ascórbico

La determinación del ácido ascórbico se llevó a cabo siguiendo el método oficial AOAC 967.21 (AOAC, 2006) (método de titulación con indofenol). Se homogeneizó 1 g de cada muestra en 35 mL de solución de ácido metafosfórico (15 g de ácido metafosfórico y 40 mL de ácido acético aforados a 500 mL con agua destilada). Las mezclas se colocaron en un baño ultrasónico (potencia de ultrasonido: 100 W, frecuencia: 45 kHz) por 5 min. Se titularon 7 mL de cada muestra con una solución de 2,6-diclorofenol-indofenol en presencia de bicarbonato de sodio (50 mg de 2,6-diclorofenol-indofenol y 42 mg de bicarbonato de sodio aforados a 200 mL con agua destilada) hasta alcanzar un punto final rosa. Los datos se compararon con una solución estándar de ácido ascórbico ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido ascórbico por cada 100 g bs ($\text{mg EAA}\cdot 100 \text{ g bs}^{-1}$).

4.1.7 Recolección de datos meteorológicos

Los factores climáticos (temperatura media, humedad relativa, precipitación, radiación solar y radiación UV) se registraron en un equipo Vantage Pro-2 (Davis Instruments; Hayward, CA, EE. UU.) ubicado dentro del campus del COLPOS. Se registraron datos promedio de 30 días antes de cada recolección, porque este período de tiempo considera la maduración completa de las hojas de moringa y los factores climáticos pueden mostrar un efecto en su desarrollo.

4.1.8 Análisis del suelo

Se recogieron 10 muestras de suelo en cada parcela experimental siguiendo un patrón en zigzag. Cada muestra de suelo de 0.5 kg se recuperó a una distancia de 30 cm del tallo del árbol y, a partir de ahí, a una profundidad de 15 cm. Las muestras correspondientes se combinaron, mezclaron y dividieron para producir tres muestras representativas de suelo de 1 kg, designadas como A, B y C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras recolectadas fueron enviadas al Laboratorio de Suelos, Plantas y Análisis de Agua del COLPOS, Campus Montecillo, Estado de México, Méx. Los análisis de composición del suelo se llevaron a cabo en septiembre de 2014 por personal del laboratorio citado. Para cada muestra de suelo se analizó: pH, capacidad de intercambio catiónico (CIC), conductividad eléctrica (CE), el contenido de materia orgánica (MO) y los niveles de K, P y NH_4^+ . El contenido de arcilla, limo y arena también fueron evaluados. Los métodos analíticos utilizados por el laboratorio externo se presentan en la Tabla 4.1.

TABLA 4.1 Variables evaluadas en tres tipos de suelos utilizados en este estudio y métodos analíticos realizados.

Variable evaluada	Métodos analíticos	Medición
pH	Relación 1:2 (p/v) de suelo:agua	Potenciómetro
Capacidad de intercambio de catiónico (CIC)	AS-12 con acetato de amonio	Titulación con HCl
Conductividad eléctrica (CE)	Medición electrolítica	Conductímetro
K	AS-12 con acetato de amonio	Fotómetro de flama
P	Olsen	Espectrofotómetro a 882 nm
NH_4^+	Micro-Kjeldahl	Titulación con H_2SO_4
Materia orgánica (MO)	Walkley y Black	Titulación con FeSO_4
Arcilla	Bouyoucos	Hidrómetro de Bouyoucos
Limos	Bouyoucos	Hidrómetro de Bouyoucos
Arena	Bouyoucos	Hidrómetro de Bouyoucos

Los métodos analíticos utilizados por el COLPOS, Campus Montecillo, Estado de México, Méx., se establecen en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000.

4.1.9 Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante el análisis de componentes principales (ACP) con la ayuda del software Minitab versión 14 (Minitab Inc.; State College, PA, EE. UU.). El ACP se utilizó para describir la estructura del conjunto de datos y para establecer la importancia relativa individual de cada una de las variables evaluadas. Se definieron un total de doce variables con respecto a los factores climáticos: temperatura promedio, humedad relativa, precipitación, radiación solar, radiación



MATERIALES Y MÉTODOS

UV; y características del material vegetal: edad del árbol, capacidad de captación de radicales DPPH y ABTS, y los contenidos de fenoles totales, ácido gálico, ácido ascórbico y carotenoides totales. Para evaluar la correlación de las características evaluadas del material vegetal con los parámetros físicos y químicos del suelo, se incluyeron diez variables más: pH, CIC, CE y niveles de arcilla, limo, arena, MO, K, P y NH_4^+ . Para eliminar las posibles distorsiones que surgen de las diferentes magnitudes de los valores numéricos de las observaciones evaluadas, todos los valores se estandarizaron restando el valor de la media y dividiendo por la desviación estándar.

Finalmente, las observaciones experimentales fueron mostradas como la media \pm la desviación estándar y se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA de una vía seguido por la prueba de pares de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas en el valor de probabilidad inferior al 5% ($p < 0.05$).

4.2 Determinación experimental de las propiedades de equilibrio en el sistema etanol:agua:moringa seca

Otro de los objetivos del proyecto fue la optimización del proceso de extracción de compuestos bioactivos a partir de hojas secas de moringa, por lo tanto; una vez caracterizados los cultivos y definida la parcela de moringa a explotar; se propuso generar información fundamental sobre las propiedades de transferencia de masa y estimar la distribución de concentración entre fases en el equilibrio a partir de cinéticas de extracción sólido-líquido en una sola etapa de hojas secas de moringa. Con esta información se resolvió el modelo teórico conceptualizado por Castillo-Santos *et al.* (2016) para definir el número de etapas y la cantidad de disolvente requeridos para producir el máximo rendimiento de extracción con la máxima concentración de extracto. A continuación se describe la determinación experimental de dichas propiedades para el sistema etanol:agua:moringa seca.

4.2.1 Materia prima, reactivos y disolventes

Se recolectó un lote de hojas frescas de moringa en una parcela experimental del Colegio de Postgraduados (COLPOS), campus de Veracruz (México), en septiembre de 2015. Las hojas maduras de moringa se recolectaron a mano aleatoriamente de las ramas medias del árbol de moringa. Las hojas se lavaron con agua destilada para eliminar la suciedad y se eliminó el exceso de agua. Las hojas frescas de moringa se almacenaron a $-32\text{ }^\circ\text{C}$ y se procesaron en menos de 72 h.

Los reactivos y disolventes que se usaron para esta parte del proyecto están descritos en la sección 4.1.2.

4.2.2 Preparación de la muestra

Las hojas de moringa se liofilizaron a $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 4.5 Pa usando un liofilizador de laboratorio por 18 h. Una parte de las muestras liofilizadas se molieron utilizando un molino de café y posteriormente se tamizaron para conseguir un tamaño de partícula estándar entre 0.59 mm (malla metálica ASTM No. 30) y 0.22 mm (malla metálica ASTM No. 70). Se utilizó otra porción de muestras liofilizadas como hojas enteras. Las hojas secas trituradas (HT) y las hojas enteras secas (HE) se almacenaron a $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta análisis posteriores.

4.2.3 Caracterización de las hojas de moringa

El modelo teórico desarrollado por Castillo-Santos *et al.* (2016) toma en cuenta la composición de la alimentación, por lo cual se realizó una caracterización completa de las hojas de moringa en términos de fracción másica de agua, fracción másica de sólidos extraíbles y fracción másica de sólidos no extraíbles.

4.2.3.1 Determinación del contenido de agua en hojas de moringa (x_{F_3})

La determinación del agua se llevó a cabo por diferencia de peso. Se colocaron 1 g de muestras en una estufa de vacío (Lab Line Instrument, Mod. 3818-1; Mansfield, Texas, EE. UU.) a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $6 \times 10^4\text{ Pa}$ hasta peso constante. El contenido de agua se expresó como fracción másica de agua en la alimentación (x_{F_3}) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$x_{F_3} = \frac{w_0 - w_f}{w_0} \quad (4.3)$$

donde w_0 y w_f son el peso inicial y final de la muestra, respectivamente. Los análisis se realizaron por triplicado.

4.2.3.2 Determinación del contenido de sólidos no extraíbles (x_{F_1}) y material extraíble (x_{F_2}) de las hojas de moringa

Se realizó extracción exhaustiva para determinar la fracción de sólidos no extraíbles y, por lo tanto, la fracción de sólidos extraíbles de hojas secas de moringa. Se extrajeron exhaustivamente 2 g de muestras en 100 g de disolvente a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ (HT y HE) y $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (sólo para HE). El disolvente utilizado fue una mezcla $80:20$ (p/p) de etanol:agua. Las muestras por triplicado se agitaron en un agitador orbital (Thermo Scientific, Mod. MaxQ 4450; Waltham, MA, EE. UU.) a 150 rpm (radio del orbital: 0.95

MATERIALES Y MÉTODOS

cm) con temperatura controlada. El tiempo para cada extracción exhaustiva fue el requerido para alcanzar la concentración de equilibrio en el extracto; este tiempo de equilibrio se estableció a partir de los resultados de las cinéticas de extracción. Al final del tiempo de equilibrio, el refinado (hojas de moringa con extracto) se separó del extracto (material extraíble y disolvente) por decantación y filtración. Posteriormente, el refinado se extrajo cuatro veces más en las mismas condiciones. Después de la quinta extracción, el residuo se colocó en una estufa de vacío a 60 °C y 6×10^4 Pa hasta alcanzar un peso constante. Los restos de sólidos son el material no extraíble en hojas de moringa y se expresaron en fracción másica (x_{F_1}):

$$x_{F_1} = \frac{w_0(1-x_{F_3})-w_l}{w_0} \quad (4.4)$$

w_0 y w_l son el peso inicial y final de la muestra, respectivamente. Entonces la fracción másica extraíble (x_{F_2}) se estimó por diferencia:

$$x_{F_2} = 1 - x_{F_1} - x_{F_3} \quad (4.5)$$

4.2.4 Cinéticas de extracción de hojas secas de moringa

Las cinéticas de extracción de HT y HE se realizaron para estimar las propiedades de equilibrio y transferencia de masa. Se colocaron 2 g de cada muestra (F) en diferentes matraces Erlenmeyer, luego en cada matraz se agregaron diferentes cantidades de disolvente (S : mezcla 80:20 (p/p) de etanol:agua) para obtener diferentes relaciones de (g hojas de moringa)/(g disolvente): 0.02, 0.03, 0.04 (este valor sólo para HE) y 0.1 (este valor sólo para HT). Ambas muestras de HT y HE se mantuvieron en un agitador orbital a 35 °C y 150 rpm (radio del orbital: 0.95 cm) hasta alcanzar el equilibrio; otra cinética de extracción se llevó a cabo a 55 °C y 150 rpm (radio del orbital: 0.95 cm) hasta alcanzar el equilibrio (sólo para HE). El refinado (R) a diferentes tiempos de contacto se separó cuidadosamente del extracto (E) por decantación y filtración, y entonces ambas fases se pesaron. Cada R se colocó en una estufa de vacío a 60 °C y 6×10^4 Pa hasta alcanzar el peso constante; el residuo seco de R obtenido se denominó como D . Cada cinética de extracción se replicó dos veces.

4.2.4.1 Estimación de parámetros de equilibrio

Los parámetros de equilibrio estimados fueron la relación de equilibrio termodinámico (K_{eq}) indicada en la ecuación (2.1) y la solución retenida específica por kg de sólidos no extraíbles en R (M); los cuales son los necesarios para resolver el modelo conceptualizado por Castillo-Santos *et al.* (2016).

MATERIALES Y MÉTODOS

K_{eq} se calculó por regresión lineal de la ecuación (2.1) a partir de las concentraciones experimentales en ambas fases cuando se alcanzó el equilibrio a las diferentes relaciones de (g de moringa)/(g disolvente). Se estableció la siguiente suposición: el material extraíble transferido al extracto (Ex_{E_2}) es la diferencia entre los sólidos totales en las hojas de moringa y D ,

$$Ex_{E_2} = Fx_{F_{12}} - D \quad (4.6)$$

donde $x_{F_{12}} = x_{F_1} + x_{F_2}$

Como F , E , D , x_{F_1} y x_{F_2} se evaluaron experimentalmente, se puede calcular la fracción másica de sólidos extraíbles presente en E (x_{E_2}).

También se asumió que D contiene una fase sólida (O) y algunos sólidos extraíbles que permanecen en R porque hay una solución retenida (L) que tiene la misma concentración del extracto (Lx_{E_2}),

$$D = O + Lx_{E_2} \quad (4.7)$$

y R está constituido por O y L ,

$$R = O + L \quad (4.8)$$

Como R , D y x_{E_2} se evaluaron experimentalmente; L puede calcularse con la combinación de las ecuaciones (4.7) y (4.8),

$$L = \frac{R-D}{1-x_{E_2}} \quad (4.9)$$

Como L se calculó y R se evaluó experimentalmente, O puede calcularse a partir de la ecuación (4.8). Además se asumió que O está formado por los sólidos no extraíbles de la alimentación (Fx_{F_1}) y los sólidos extraíbles que no fueron transferidos al extracto (Ox_{O_2}),

$$O = Fx_{F_1} + Ox_{O_2} \quad (4.10)$$

Entonces, la fracción másica sólida extraíble presente en O (x_{O_2}) se puede calcular fácilmente a partir de la ecuación (4.10) porque F y x_{F_1} se evaluaron experimentalmente y se calculó O . Cuando se alcanza el equilibrio en las diferentes concentraciones de extracto, con x_{E_2} y x_{O_2} es posible estimar la K_{eq} .

Finalmente, la solución retenida específica por kg de sólidos no extraíbles (M) puede calcularse a partir de

$$M = \frac{L}{Fx_{F_1}} \quad (4.11)$$

a diferentes concentraciones de extracto (las extracciones se desarrollaron en tres proporciones diferentes de (g de moringa)/(g de disolvente)).

4.2.5 Simulación de extracción por lote en etapas múltiples a contracorriente (EMC) de hojas de moringa

La solución de las 13N ecuaciones linealmente independientes mostradas en las ecuaciones (2.2.) – (2.14) se resolvió en la plataforma MatLab de acuerdo con la metodología detallada por Castillo-Santos *et al.* (2016), el cual consiste en la combinación de un problema de simulación junto con uno de optimización. La diferencia entre uno y otro es que mientras que para el primero se establecen todas las variables de entrada, en el segundo se establece una variable de salida deseada y una de las variables de servicio pasa a ser una variable a calcular. Dicho de otra forma:

$$\text{Fijar } w \in \mathbb{R}^4 = \{F, x_{F1}, x_{F2}, x_{F3}, x_{F4}\}, \mathbf{u}_2 \in \mathbb{R}^3 = \{x_{S4}, x_{S5}, N\} \text{ y } \mathbf{y} \in \mathbb{R}^1 = \{x_{E12}\}$$

Para calcular

$$x \in \mathbb{R}^{13N-1} = \{E_j: \forall j=1, \dots, N; R_j: \forall j=1, \dots, N; L_j: \forall j=1, \dots, N; O_j: \forall j=1, \dots, N; x_{Ej_i}: \forall j=1, \dots, N \wedge \forall i=2, \dots, 4 - (i=2 \wedge j=1); x_{Rj_i}: \forall j=1, \dots, N \wedge \forall i=1, \dots, 4; x_{Oj_i}: \forall j=1, \dots, N \wedge \forall i=1, 2\} \text{ y } \mathbf{u}_1 \in \mathbb{R}^1 = \{S\}$$

Debido a que el problema de solución del sistema no lineal de 13N ecuaciones puede ser muy complicado y puede tener multiplicidad de solución; a continuación se presenta la técnica de solución propuesta por Castillo-Santos *et al.* (2016), que se basa en el hecho de que la fracción másica debe estar entre [0,1]. El método consistió en la creación del siguiente problema de optimización:

$$\begin{aligned} \min f(x'_{E2_2}, x'_{E3_2}, \dots, x'_{EN_2}) & \quad (4.12) \\ \text{sujeto a } 0 \leq x'_{E2_2} \leq 1 & \\ 0 \leq x'_{E3_2} \leq 1 & \\ \vdots & \\ 0 \leq x'_{EN_2} \leq 1 & \end{aligned}$$

La función objetivo es la diferencia positiva:

$$f(x'_{E2_2}, x'_{E3_2}, \dots, x'_{EN_2}) = |x'_{E2_2} - x_{E2_2}| + |x'_{E3_2} - x_{E3_2}| + \dots + |x'_{EN_2} - x_{EN_2}| \quad (4.13)$$

La cantidad de disolvente y el rendimiento de extracción (η) para cada etapa j se consideraron como resultados principales para continuar con el procedimiento experimental. El η se definió como la

relación entre la concentración de sólidos extraíbles del extracto en la etapa j y la concentración inicial de sólidos extraíbles en F ,

$$\eta = \frac{E_j x_{Ej2}}{F x_{F2}} \quad (4.14)$$

4.2.6 Procedimiento experimental de la EMC

La EMC se llevó a cabo por lotes en un agitador orbital a 150 rpm (radio del orbital: 0.95 cm). El diagrama de flujo de la EMC se muestra en la Figura 4.2. Ambas muestras (HT y HE) se evaluaron en diferentes experimentos con su respectivo tiempo de equilibrio para cada etapa. Se usaron 2 g de hojas de moringa como F . La cantidad de disolvente se definió de acuerdo con la solución del modelo conceptualizado por Castillo-Santos *et al.* (2016). Se usó una mezcla 80:20 (p/p) de etanol:agua como disolvente. El proceso de extracción se realizó a 35 °C o 55 °C según el conjunto experimental. Cada R en la etapa de equilibrio j se separó cuidadosamente del E por decantación y filtración, y entonces ambas fases se pesaron. Cada R se colocó en una estufa de vacío a 60 °C y 6×10^4 Pa hasta alcanzar el peso constante para determinar D . Entonces $E x_{E2}$ se calculó con la ecuación (4.6) y el η en cada etapa j se calculó con la ecuación (4.14). Las muestras de cada extracto se mantuvieron a -32 °C hasta análisis posteriores (ensayos DPPH, ABTS y Folin-Ciocalteu, y determinación del contenido de sólidos). Los experimentos se realizaron por triplicado.

4.2.7 Validación del modelo

El criterio utilizado para evaluar el ajuste del modelo de EMC para la extracción de hojas secas de moringa fue el error relativo promedio (Erp) en porcentaje, que se definió como:

$$Erp (\%) = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|Me_i - Mp_i|}{Me_i} \quad (4.15)$$

donde Me_i y Mp_i son los valores experimentales y predichos del η , respectivamente, y N es el número de datos experimentales. Un modelo se considera aceptable si los valores P están por debajo del 10% (Kaymak-Ertekin y Sultanoğlu, 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

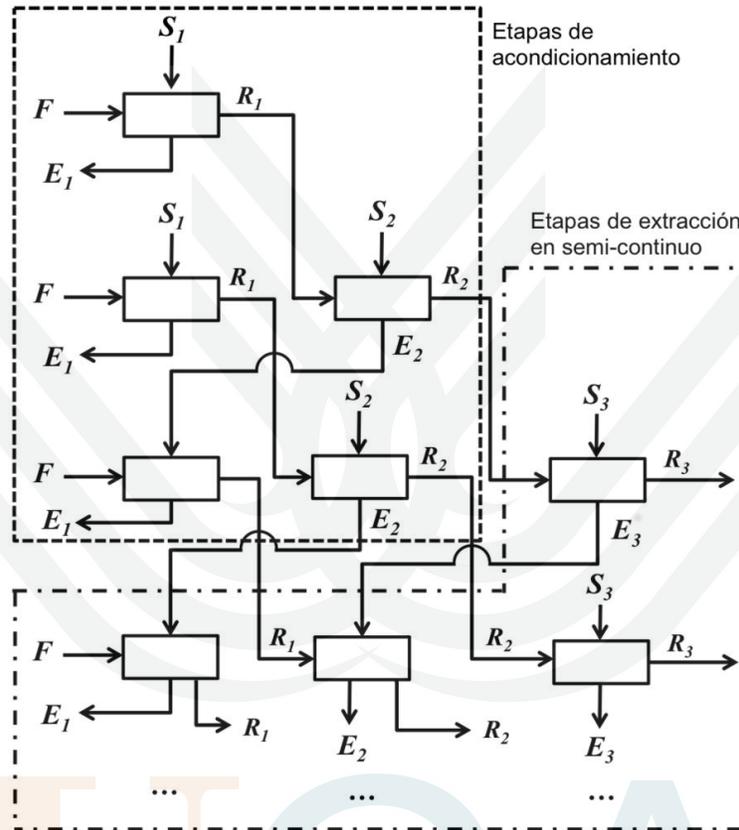


FIGURA 4.2 Representación del diagrama de flujo del proceso de extracción en tres etapas a contracorriente.

4.2.8 Comparación de la EMC con otros métodos de extracción

El extracto de moringa obtenido bajo condiciones óptimas de EMC fue comparado contra el método de extracción convencional Soxhlet y el método de extracción asistida por ultrasonido. La comparación se realizó en virtud de: concentración de sólidos extraíbles en E , actividad antirradical (ensayos DPPH y ABTS), contenido de fenoles totales (CFT), rendimiento del proceso (η), tiempo de contacto necesario para alcanzar el equilibrio entre las fases y la cantidad de disolvente necesaria. A continuación se detalla el procedimiento de cada método de extracción estudiado para fines de comparación.

4.2.8.1 Extracción Soxhlet (ES)

La extracción usando el método estándar Soxhlet se llevó a cabo usando 100 g de *S* (mezcla 80:20 (p/p) de etanol:agua). Se colocó 1 g de HE en un cartucho de celulosa. Los *E* se obtuvieron en diferentes tiempos de contacto: 2, 3 y 4 h. La potencia de calentamiento se estableció de tal forma que ocurriesen 3 ciclos por hora, de modo que se lograron 12 ciclos de extracción dentro de las 4 h del tiempo de extracción. Todos los extractos se colocaron en una condición de temperatura ambiente antes de pesarse gravimétricamente. Los cartuchos con las muestras se colocaron en un horno de vacío a 60 °C y 6×10^4 Pa hasta alcanzar peso constante. Entonces el η se calculó con la ecuación (4.14). Todos los extractos se mantuvieron a -32 °C hasta análisis posteriores: ensayos de DPPH, ABTS y Folin-Ciocalteu y determinación del contenido de sólidos. Los experimentos se realizaron por triplicado.

4.2.8.2 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

Las cinéticas de EAU en una sola etapa de HE se realizaron en un baño ultrasónico. El equipo de ultrasonido se operó a 45 kHz y 100 W. 2 g de HE se mezclaron con diferentes cantidades de *S* para obtener diferentes proporciones de (g hojas de moringa)/(g disolvente): 0.02, 0.03 y 0.04. El agua en el baño ultrasónico se mantuvo a nivel con la superficie del disolvente en los matraces Erlenmeyer, y se reguló a 55 °C. Cada cinética de extracción se replicó dos veces. El η se calculó con la ecuación (4.14) a diferentes tiempos de contacto. Todos los extractos se mantuvieron a -32 °C hasta análisis posteriores (ensayos de DPPH, ABTS y Folin-Ciocalteu, y determinación del contenido de sólidos).

4.2.9 Métodos analíticos

Los métodos analíticos citados a lo largo de la sección 4.2 se describen a continuación y corresponden a: determinación del contenido de sólidos de los extractos de moringa, de la actividad antirradical (ensayos DPPH y ABTS) y del contenido de fenoles totales (CFT).

4.2.9.1 Determinación del contenido de sólidos de los extractos de moringa

Alícuotas de 10 mL de cada *E* se concentraron y secaron con un evaporador rotatorio al vacío (Büchi, Mod. R-205; Flawil, Suiza) a 60 °C y 7.2×10^3 Pa. Finalmente, las muestras se colocaron en una estufa de vacío a 60 °C y 6×10^4 Pa hasta alcanzar peso constante. La fracción másica de sólidos extraíbles en *E* (x_{E_2} , base seca de *E*) se calculó por diferencia de peso de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$x_{E_2} = \frac{w_0 - w_f}{w_0} \quad (4.16)$$

donde w_0 y w_f son el peso inicial y final de la muestra, respectivamente. Los análisis se realizaron por triplicado.

4.2.9.2 Determinación de actividad antirradical por ensayos DPPH y ABTS

Antes de realizar los ensayos DPPH y ABTS, se disolvieron 0.5 mL de cada extracto crudo con el disolvente de extracción (mezcla 80:20 (p/p) de etanol:agua) hasta alcanzar un volumen de 10 mL. Con estas muestras diluidas se realizaron los procedimientos detallados en las secciones 4.1.4.1 y 4.1.4.2, en las cuales se describen los ensayos DPPH y ABTS, respectivamente.

4.2.9.3 Determinación del contenido de fenoles totales (CFT)

Con los mismos extractos diluidos mencionados en la sección 4.2.9.2 se siguieron los pasos indicados en la sección 4.1.4.3 para determinar el CFT.

4.2.10 Análisis estadístico

Los resultados experimentales se dieron como la media \pm desviación estándar y los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de pares de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas al valor de probabilidad inferior al 5% ($p < 0.05$).

4.3 Estudio del secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos de moringa

Como se ha mencionado en secciones anteriores, las variables del modelo de Aguirre-Alonso (2016) están directamente relacionadas con el consumo de energía y materia prima, y con la productividad y la humedad final del producto, pero no se correlacionan con la retención de compuestos bioactivos en el producto final. Para evaluar el efecto del secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado (SACC) sobre el contenido de compuestos fenólicos se decidió recurrir a modelos de ajuste obtenidos a partir de diseños experimentales. Por lo cual en esta etapa se engloba el desarrollo experimental del SACC del extracto de moringa obtenido mediante EMC bajo condiciones óptimas.



4.3.1 Materiales, reactivos y disolventes

Las hojas frescas de moringa se recolectaron en el Colegio de Postgraduados (COLPOS), Veracruz (México), durante la época que permitió la mayor expresión de compuestos fenólicos, según los resultados de la primera etapa del proyecto, los cuales se muestran en la sección 5.1. Las hojas maduras de moringa se recolectaron a mano aleatoriamente de las ramas medias del árbol de moringa. Las hojas se lavaron con agua destilada para eliminar la suciedad y se eliminó el exceso de agua. Las hojas frescas de moringa se almacenaron a 4 °C y se procesaron en menos de 72 h. Como material de soporte durante el SACC se empleó una mezcla 95:5 (p/p) de (maltodextrina DE-10):(sílice precipitada).

La maltodextrina (MD) y la sílice precipitada (SIPERNAT 22 S®, Evonik-Degussa Industries) se adquirieron en FAPSA (Toluca, México) y Química Anher (CDMX, México), respectivamente. El etanol de grado analítico se compró a Golden Bell Reagents, (CDMX, México). El ácido acético y el acetonitrilo de grado HPLC se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania). El agua se purificó con un sistema Milli-Q (Billerica, MA, EE. UU.). Los estándares de compuestos fenólicos se obtuvieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.).

4.3.2 Preparación de las hojas de moringa para su extracción

Las hojas frescas de moringa se secaron en un secador de lecho fluidizado (APEX Construction LTD., Mod. SSE 65; Gravesend, Kent, Reino Unido) operado a 55 °C y con flujo de aire de secado a 1.5 ms⁻¹ (humedad relativa media: 78%) hasta obtener una humedad final del producto de 5% base húmeda (bh) (alrededor de 40 min de secado). Estas condiciones fueron establecidas de acuerdo a los resultados obtenidos por Pérez-Landa (2013), quien para determinar el método de secado adecuado para hojas de moringa, investigó tres métodos considerando el secado en lecho fluidizado (35-65 °C), el secado a la sombra y el secado al sol. Pérez-Landa (2013) reporta que la mayor retención de compuestos bioactivos (ácido ascórbico, fenoles totales, carotenoides totales) y de actividad antirradical (ensayos DPPH y ABTS) se obtuvieron cuando las hojas de moringa fueron tratadas a temperaturas más altas que permitieron tiempos más bajos de proceso, consecuentemente a menor exposición de una corriente de aire que podría desencadenar reacciones de oxidación. El tratamiento a 55 °C no fue significativamente diferente ($p < 0.05$) al tratamiento a 65 °C.

4.3.3 Preparación de los extractos etanólicos de hojas secas de moringa

Una EMC se llevó a cabo para la extracción de compuestos fenólicos de hojas secas de moringa bajo las condiciones establecidas posterior al análisis del sistema etanol:agua:moringa seca y

MATERIALES Y MÉTODOS

la resolución del modelo mecanicista propuesto por Castillo-Santos *et al.* (2016) con las propiedades de equilibrio determinadas experimentalmente en el presente proyecto y con la caracterización de las hojas de moringa en términos de fracciones másicas de agua, sólidos extraíbles y sólidos no extraíbles. El tamaño de partícula, la temperatura de operación, las cantidades de disolvente necesarias para las etapas de acondicionamiento y la cantidad de disolvente para las etapas semi-continuas se reportan en la sección 5.2. El disolvente de extracción fue una mezcla 80:20 (p/p) de etanol:agua. Un diagrama esquemático del proceso de extracción llevado a cabo se muestra en la Figura 4.2. Los extractos etanólicos obtenidos de hojas secas de moringa se mantuvieron a 4 °C hasta que se realizó el secado por aspersión (en menos de 48 horas).

4.3.4 Preparación de la mezcla de alimentación

Las diferentes cantidades que se usaron de la mezcla 95:5 (p/p) de MD:SP empleada como material de soporte por cada gramo de sólidos de extracto alimentados se enumeran en la Tabla 4.2. La fracción másica de sólidos en el extracto de moringa se determinó experimentalmente según lo indicado en la sección 4.2.9.1. Antes de la preparación de la mezcla de alimentación, los extractos etanólicos de moringa se sacaron del almacenamiento en frío y se dejaron equilibrar con la temperatura ambiente (25 ± 1 °C). Las recomendaciones que fueron descritas por Ógáin *et al.* (2012) se siguieron para preparar las mezclas de alimentación. Esto consistió en disolver primero el material de soporte en agua (80 g en todos los casos) a 25 °C y 150 rpm (radio del orbital: 0.95 cm) en un agitador orbital durante 20 min, seguido de la adición directa de esta disolución al extracto etanólico de moringa (220 g en todos los casos), lo cual resultó en una precipitación que se mantuvo en dispersión mediante agitación magnética durante todo el proceso del SACC para evitar la sedimentación. Tanto la preparación de la mezcla de alimentación como el experimento de secado se llevaron a cabo el mismo día.

TABLA 4.2 Niveles evaluados de las variables del proceso de secado por aspersión en ciclo cerrado de extractos etanólicos de hojas de *Moringa oleifera*.

Variables de proceso	Niveles evaluados		
g de MS por cada g de sólidos de extracto alimentados (g/g)	2	3	4
Temperatura del nitrógeno de entrada (°C)	130	140	150
Temperatura del nitrógeno de salida (°C)	50	60	70

MS: material de soporte.



4.3.5 Secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado (SACC) de extractos etanólicos de hojas de moringa

Para realizar el proceso de SACC se utilizó un secador por aspersión a escala laboratorio (Büchi, Mod. B-290; Flawil, Suiza) (Figura 4.3), el cual funciona bajo el mismo principio de un atomizador de flujo a co-corriente, esto es, la aspersión de la mezcla de alimentación y el flujo de gas de secado ocurren en la misma dirección. El Büchi B-290 se acopló a una bomba de calor (Büchi, Mod. B-295; Flawil, Suiza) y un deshumidificador (Büchi, Mod. B-296; Flawil, Suiza), ver la Figura 4.3. Se usó una boquilla de diámetro estándar de 0.7 mm y un tapón de rosca de boquilla de 1.5 mm de diámetro. Se usó nitrógeno seco (pureza $\geq 99.0\%$) como gas de secado. En todos los casos, el flujo de nitrógeno se mantuvo fijo a 35 mm en el indicador rotámetro de gas, lo cual corresponde a 538 Lh^{-1} según las especificaciones del fabricante. La presión de atomización fue de $6 \times 10^5 \text{ Pa}$. La tasa de aspiración se mantuvo al 100% de la capacidad operativa ($35 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$ de acuerdo a las especificaciones del fabricante). La temperatura del nitrógeno de entrada (T_{ent}) y la temperatura del nitrógeno de salida (T_{sal}) para el secador se mantuvieron en los valores que se muestran en la Tabla 4.2. Las mezclas de alimentación se alimentaron con una bomba peristáltica con caudal variable para controlar la respectiva T_{sal} . El tiempo total de secado para cada experimento fue variable dependiendo de las condiciones de operación, y el rango de flujo de alimentación estuvo entre 5.0 y $16.5 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$. Los extractos secos obtenidos se almacenaron en bolsas laminadas selladas al vacío y se mantuvieron a $-32 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

4.3.6 Determinación del contenido de humedad de los extractos secos

La fracción másica de agua de los extractos secos obtenidos se determinó según lo detallado en la sección 4.2.3.1. El contenido de agua se expresó como porcentaje de humedad en base húmeda (% H_{bh}).

4.3.7 Determinación del rendimiento del proceso de SACC

El rendimiento del proceso de SACC (η_{SA}) se calculó como la relación entre la masa total del producto recuperado y los sólidos totales de la mezcla de alimentación, expresándose mediante la siguiente ecuación:

$$\eta_{SA} (\%) = \frac{(W_2 - W_1) - (W_2 - W_1) X_{we\beta}}{E X_{E_2} + M_{bs}} 100 \quad (4.17)$$

donde E es la masa del extracto etanólico alimentado (g), X_{E_2} es la fracción másica de sólidos extraíbles del extracto de moringa alimentado, M_{bs} es la masa seca del material de soporte (g), $X_{we\beta}$

MATERIALES Y MÉTODOS

es la fracción másica de humedad del extracto seco de moringa, mientras que W_1 y W_2 son el peso (g) del receptáculo de producto seco antes y después del SACC, respectivamente.

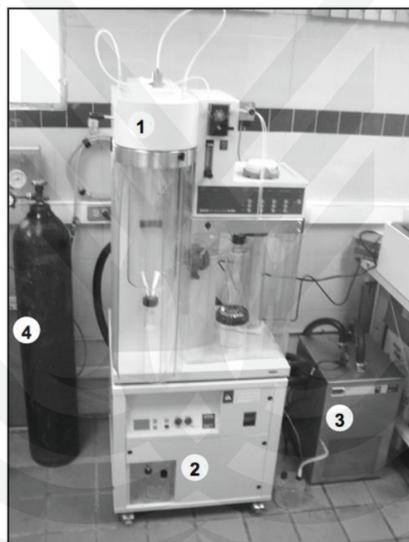


FIGURA 4.3 Secador por aspersión BÜCHI B-290 (1) acoplado a bomba de calor BÜCHI B-295 (2) y deshumidificador BÜCHI B-296 (3) alimentado con nitrógeno (4) como gas de secado.

4.3.8 Cuantificación de compuestos fenólicos por UHPLC

La cuantificación de los compuestos fenólicos seleccionados como referencia se realizó en el extracto alimentado al secador y en el extracto seco obtenido por SACC, con el fin de evaluar el efecto de las variables de proceso del SACC sobre las retenciones de compuestos fenólicos. Se extrajeron muestras de cada uno de los extractos secos de moringa (0.25 g) usando 25 mL de una mezcla 80:20 (v/v) de metanol:agua. Cada muestra se sonicó en un procesador ultrasónico (Hielscher Ultrasonics GmbH; mod. UP200S; Berlin, Alemania) operado a 200 W y 24 kHz durante 10 min a 30 °C. Todas las muestras obtenidas a partir del extracto seco, y una alícuota del extracto de moringa alimentado al secador, se filtraron a través de un filtro de jeringa de nylon de 0.2 μm (Membrane Solutions; Dallas, EE. UU.) en un vial y se analizaron 3.0 μL de cada muestra mediante un sistema UHPLC (Waters Corp., ACQUITY™, UHPLC™ H-Class; Milford, MA, EE. UU.) para el análisis cuantitativo de compuestos fenólicos. El sistema UHPLC estaba equipado con un sistema de bomba cuaternaria, un muestreador automático con control de temperatura ajustado a 15 °C, un horno de columna ajustado a 47 °C para la separación cromatográfica y un detector de matriz de fotodiodos (Waters Corp., PDA-

MATERIALES Y MÉTODOS

100; Milford, MA, EE. UU.). El software Empower3™ (Waters Corp.; Milford, MA, EE. UU.) se usó para controlar el equipo y para la adquisición de datos. La columna analítica fue una Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (100 mm de longitud, 2.1 mm de diámetro interno, 1.7 μm de tamaño de partícula). El detector PDA se estableció en el rango de longitud de onda de 200-400 nm para el escaneo 3D, con una tasa de recopilación de datos de 40 pts·s⁻¹ para la identificación de los compuestos. Para las integraciones de los picos y la cuantificación de los compuestos, el detector PDA se ajustó a 260 nm. Se empleó un método cromatográfico reportado previamente por Ruiz-Rodríguez *et al.* (2017). La fase móvil fue agua acidificada (ácido acético al 2%, disolvente A) y acetonitrilo acidificado (ácido acético al 2%, disolvente B), y se usó un flujo de disolvente de 0.6 mLmin⁻¹. El gradiente utilizado para la separación cromatográfica fue el siguiente (tiempo, disolvente B): 0 min, 0%; 3.0 min, 5%; 4.0 min, 10%; 4.5 min, 10%; 5.0 min, 20%; 7.0 min, 20%; 8.0 min, 30%; 10.0 min, 30%; seguido de un lavado de la columna de 5 min con 100% de B. La identificación de compuestos fenólicos en las muestras se logró inicialmente comparando los tiempos de retención y los espectros de absorción UV-Vis con los del estándar. Los compuestos fenólicos individuales (quercetina-3-rutinósido y kaempferol-3-glucósido) se cuantificaron basándose en el área detectada del pico de las muestras frente a sus respectivas curvas de calibración del estándar puro (Apéndice C). Todas las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado.

4.3.9 Cálculo de retención de compuestos fenólicos

Las retenciones de compuestos fenólicos (R_{Cf_i}) se calcularon como la relación entre el contenido total del compuesto fenólico marcador (Cf_i) en los extractos secos de moringa y el contenido total del Cf_i en las mezclas de alimentación,

$$R_{Cf_i}(\%) = \frac{\text{mg de } Cf_i \text{ en extracto seco}}{\text{mg de } Cf_i \text{ en la mezcla de alimentación}} 100 \quad (4.18)$$

4.3.10 Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizó un diseño factorial 3³ para evaluar el efecto del SACC de extractos de hojas secas de moringa, con dos repeticiones para cada tratamiento evaluado. Las relaciones de sólidos de material de soporte-sólidos de extracto, y las temperaturas de entrada y de salida del gas de secado (nitrógeno) se evaluaron en tres niveles (Tabla 4.2). Estas variables, y sus niveles, fueron seleccionadas considerando aquellas utilizadas en un estudio previo (Vázquez, 2013), en el cual se obtuvo mayor porcentaje de retención de fenoles totales (reportados como equivalentes de ácido gálico) utilizando maltodextrina DE-10 como material de soporte y mayor rendimiento del proceso con



MATERIALES Y MÉTODOS

sílíce precipitada. Las variables de respuesta (y_i) se ajustaron al siguiente modelo donde se incluyeron los términos lineales, cuadráticos y de interacción:

$$y_i = \beta_{i0} + \beta_{i1}x_{i1} + \beta_{i2}x_{i2} + \beta_{i3}x_{i3} + \beta_{i12}x_{i1}x_{i2} + \beta_{i13}x_{i1}x_{i3} + \beta_{i23}x_{i2}x_{i3} + \beta_{i11}x_{i1}^2 + \beta_{i22}x_{i2}^2 + \beta_{i33}x_{i3}^2 \quad (4.19)$$

donde β_{ij} son los coeficientes de regresión; x_{i1} , x_{i2} y x_{i3} son las variables independientes codificadas; y_i es la variable de respuesta i . Los β_{ij} se calcularon con regresión lineal multivariable. Los términos significantes ($p < 0.05$) en el modelo para cada variable de respuesta i fueron determinados por análisis de varianza multivariado (MANOVA). Las variables independientes evaluadas fueron la temperatura de entrada del nitrógeno (Tent, x_{i1}), la temperatura de salida del nitrógeno (Tsal, x_{i2}) y los g de material de soporte (MS) por g de sólidos de extracto (SE) en la alimentación (g MS/g SE; x_{i3}). Las variables de respuestas evaluadas fueron las retenciones de quercetina-3-rutinósido (y_1) y kaempferol-3-glucósido (y_2), el rendimiento del proceso (y_3) y el contenido de humedad (y_4) del extracto seco de moringa.

4.4 Simulación del proceso de secado por aspersión en ciclo cerrado de extractos de moringa

La mayoría de las propiedades utilizadas para la solución del modelo propuesto por Aguirre-Alonso (2016) se enumeran en la Tabla 4.3. Dichas propiedades térmicas fueron obtenidas de fuentes bibliográficas (Palencia *et al.*, 2002; Geankoplis, 2003). Se asumió que los valores de Cp_{wv} , Cp_v , Cp_β y de la difusividad del agua en el interior de las gotas ($D_{w\beta}$) están en el orden de magnitud de alimentos en general (Mujumdar, 2006).

Asumiendo una geometría esférica para las gotas generadas en el secador por aspersión, el área específica (a) fue relacionada a la fracción del volumen del gas de secado en el secador (ε) y al diámetro de las gotas (D) por (Geankoplis, 2003):

$$a = \frac{6(1-\varepsilon)}{D} \quad (4.20)$$

TABLA 4.3 Propiedades utilizadas para la solución del modelo mecanicista propuesto por Aguirre-Alonso (2016).

Propiedad	Valor	Propiedad	Valor
Cp_γ	$1000 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$	$D_{w\beta}$	$6.67 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$
Cp_β	$1657 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$	H_{wv} (a 273 K)	$2501 \times 10^3 \text{ J kg}^{-1}$
Cp_w	$4185 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$	k_γ	$0.03113 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$
Cp_e	$2832 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$	μ_γ	$2.15 \times 10^{-5} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Cp_{wv}	$1800 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$	ρ_β	100 kg m^{-3}
Cp_{ev}	$1608 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$	ε	$0.95 - 0.99$

El valor de ε se estimó como la relación entre las fases dispersa y continua en flujos de entrada volumétricos ($(\text{m}^3 \text{ de la mezcla de alimentación}) \cdot (\text{m}^{-3} \text{ de gas de secado})$). Debido a que las trayectorias de las gotas no se conocen, se estimó el valor de ε que representara la dinámica del SACC de extractos de moringa. Como el sistema fue operado en ciclo cerrado, el valor de G_γ también fue estimado, se tomó como valor base aquel reportado por Aguirre-Alonso (2016) para SACC de extractos etanólicos de vainilla: $0.0135 \text{ kg} \cdot \text{s}^{-1}$.

Para representar las interacciones termodinámicas de los sólidos de la alimentación se partió de la isoterma de sorción utilizada por Palencia *et al.* (2002) y por Aguirre-Alonso (2016) para la resolución de sus modelos, entonces a partir de la ecuación (2.48) se tiene:

$$a_{we} = 1 - \exp(-1.71T_\beta^{0.3} X_{ew\beta}^{1.013}) \quad (4.21)$$

El sistema de ecuaciones propuesto por Aguirre-Alonso (2016) (discutido en la sección 2.5.3) fue resuelto por el método de Runge-Kutta de cuarto orden por medio del software de programación matemática Matlab. Con fines de validación y para determinar las condiciones de SACC que permitieran el menor consumo de energía, los valores de las variables de estado iniciales fueron aquellos del desarrollo experimental descrito en la sección 4.3.5, evaluando así el comportamiento termodinámico del proceso de SACC de extractos etanólicos de moringa. Con dichos valores de estado iniciales se resolvió el modelo hasta que se alcanzó el estado estacionario. En estado estacionario las derivadas de las ecuaciones (2.22) - (2.27) son cero, y por lo tanto, el modelo predice los valores estables de las variables de salida.

El criterio utilizado para evaluar el ajuste del modelo de SACC en función de $T_{\gamma 1}$ para la obtención de extractos secos de moringa fue el error relativo promedio (Erp) que se describió en la



MATERIALES Y MÉTODOS

ecuación (4.15). Una vez definidos los valores de ε y G_y que mejor representaran los datos experimentales del SACC de extractos de moringa, se realizaron simulaciones con las isotermas de sorción generadas para sólidos de extracto de moringa según lo detallado en la sección 4.4.1 para evaluar su efecto sobre la descripción termodinámica del sistema.

4.4.1 Obtención de datos de adsorción de extractos secos de moringa

El modelo mecanicista del SACC propuesto por Aguirre-Alonso (2016), al igual que el modelo conceptualizado por Palencia *et al.* (2002), considera que el fenómeno de difusión dentro de las partículas no gobierna la transferencia de masa y define que la concentración de agua en la interfase de ambos lados (fase dispersa y fase continua) está dado por el equilibrio de masas. Esta relación termodinámica la representaron con la ecuación (2.47), donde a_{we} está en función del contenido de agua y etanol del producto (fase dispersa) y la temperatura en la interfase gas de secado-producto. La función que relaciona la a_{we} de la fase dispersa con el contenido de agua a una temperatura determinada, es conocida como isoterma de sorción (Al-Muhtaseb *et al.*, 2002).

Es evidente que la determinación de los datos de sorción del extracto seco de moringa es necesaria para representar la termodinámica de los sólidos de la alimentación y resolver el modelo de Aguirre-Alonso (2016). Por ello, a continuación se describe el desarrollo experimental para la obtención de los datos de adsorción de extractos secos de moringa.

4.4.1.1 Obtención y preparación de las muestras

Las muestras utilizadas para la determinación del comportamiento de adsorción de agua se obtuvieron mediante las condiciones de SACC que permitieron obtener las más altas retenciones de compuestos fenólicos con cada material de soporte evaluado.

4.4.1.2 Generación de las isotermas de adsorción

Se utilizó un equipo AquaLab Vapor Sorption Analyzer (Decagon Devices, Inc., AquaLab VSA; Pullman, WA, EE. UU.) para la generación de las isotermas de adsorción. Este equipo se operó bajo el principio del método gravimétrico en un sistema dinámico continuo. Las pruebas se realizaron por duplicado a temperaturas de 25 y 50 °C.

4.4.1.3 Representación matemática de las isothermas de adsorción

Existen diferentes modelos matemáticos para describir las isothermas de sorción de materiales alimenticios. Los criterios utilizados para seleccionar el modelo de sorción más apropiado son el grado de ajuste a los datos experimentales y la simplicidad del modelo. Kaymak-Ertekin y Sultanoğlu (2001) y Al-Muhtaseb *et al.* (2002), citan que las ecuaciones de GAB y BET constituyen los modelos más representativos y ofrecen una adecuada descripción del comportamiento de sorción de la mayoría de los alimentos. Por ello, además del modelo representado en la ecuación (2.48), estos dos modelos de isothermas mostrados en las ecuaciones (4.22) y (4.23), fueron propuestos para ajustar los datos de sorción experimentales. Los parámetros de los modelos fueron estimados a partir de los resultados experimentales utilizando el análisis de regresión no lineal, que minimiza la suma residual de cuadrados.

$$\text{Ecuación Brunauer-Emmett-Teller (BET)} \quad M = \frac{M_0 C a_w}{(1-a_w)(1-a_w+Ca_w)} \quad (4.22)$$

$$\text{Ecuación Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB)} \quad M = \frac{M_0 C K a_w}{(1-Ka_w)(1-Ka_w+CKa_w)} \quad (4.23)$$

donde C y K son constantes de los modelos de las isothermas de sorción, a_w es la actividad de agua, M es el contenido de humedad (kg/kg sólido seco) y M_0 es el contenido de humedad en la monocapa (kg/kg sólido seco).

El criterio utilizado para evaluar el ajuste de cada modelo fue el error relativo promedio ($Errp$) definido en la ecuación (4.15).

4.5 Estudio de estabilidad del extracto seco de moringa durante su almacenamiento

Una vez definidas las condiciones del SACC de extractos etanólicos de moringa que permitieron el mayor rendimiento del proceso con la mayor retención de compuestos fenólicos de referencia y el menor consumo de energía, se realizó el estudio de estabilidad del extracto seco de moringa obtenido bajo dichas condiciones. La prueba de estabilidad se realizó en función de la evaluación del contenido de compuestos fenólicos de referencia.

4.5.1 Materiales evaluados y reactivos utilizados

Además de las partículas secas de extracto etanólico de moringa en donde se usó la mezcla 95:5 (p/p) de MD:SP como material de soporte, se decidió evaluar la estabilidad de extractos secos de moringa utilizando por separado maltodextrina DE-10 (MD) y sílice precipitada (SP) como materiales de soporte (Tabla 4.4), en estos casos las cantidades de material de soporte adicionado corresponden

MATERIALES Y MÉTODOS

a los tratamientos con los cuales se obtuvieron las mayores retenciones de compuestos bioactivos de referencia y el mayor rendimiento del proceso en el trabajo de Vázquez (2013).

TABLA 4.4 Extractos secos de moringa evaluados en el presente estudio de estabilidad.

Material de soporte (MS)	(g de MS)/(g de SE)*	Clave de identificación
Maltodextrina DE-10 (MD)	2.0	MD
Sílice precipitada (SP)	0.5	SP
Mezcla 95:5 (p/p) de MD:SP	3.0	MSP3

*g de material de soporte por cada g de sólidos de extracto alimentado.

El yoduro de sodio y el cloruro de sodio fueron adquiridos en VWR CHEMICALS (Linars del Vallés, España) y Merck KgaA (Darmstadt, Alemania), respectivamente. El bromuro de sodio, el fluoruro de potasio, el nitrato de magnesio, el metanol y el acetonitrilo fueron adquiridos en AppliChem PanReac (Barcelona, España). Todos los disolventes utilizados en este estudio fueron de grado analítico o grado HPLC, según el caso. Los estándares de compuestos fenólicos fueron adquiridos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.).

4.5.2 Preparación de las muestras para iniciar las pruebas de estabilidad

Se pesaron 0.25 g de extractos secos de moringa en frascos de vidrio de 20 mL de peso conocido. Las muestras se pesaron en balanza analítica (Mettler Toledo, Mod. AB204-S; Greifensee, Suiza). Los frascos con muestras se colocaron en cámaras herméticas que contenían soluciones saturadas de sal para obtener las distintas humedades relativas (HR) de estudio (Tabla 4.5). Las sales fueron seleccionadas de acuerdo a lo reportado por Greenspan (1977). Las cámaras herméticas con las muestras fueron colocadas dentro de una cámara de temperatura controlada (Ibercex, Serie F; Madrid, España). En todos los casos se asumió que el equilibrio entre las muestras y la atmósfera alrededor fue alcanzado, por lo tanto, la actividad de agua de cada muestra fue considerada igual a la correspondiente HR/100. El pesado de las muestras, la preparación de las soluciones saturadas de sales y la introducción de las muestras en la cámara de temperatura controlada se llevaron a cabo el mismo día.



MATERIALES Y MÉTODOS

TABLA 4.5 Atmósferas modificadas evaluadas durante el presente estudio de estabilidad de extractos secos de moringa.

Clave del tratamiento	Sales	Humedad relativa (%)	Temperatura (°C)
30-25	Fluoruro de potasio	30.85 ± 1.30	25
50-25	Nitrato de magnesio	52.89 ± 0.22	
75-25	Cloruro de sodio	75.29 ± 0.12	
30-50	Yoduro de sodio	29.21 ± 0.40	50
50-50	Bromuro de sodio	50.93 ± 0.55	
75-50	Cloruro de sodio	74.43 ± 0.19	

Los datos de humedad relativa al equilibrio de las soluciones saturadas de sal a 25 y 50 °C se tomaron de Greenspan (1977).

4.5.3 Cinéticas de estabilidad de extractos secos de moringa

Las muestras se mantuvieron dentro de las cámaras herméticas bajo las condiciones de HR y temperaturas de estudio (Tabla 4.5) y se analizaron a diferentes tiempos. Cada punto de la cinética corresponde a una muestra destructiva. De acuerdo a la deformación observada de las partículas del extracto seco de moringa en pruebas preliminares, se determinó realizar el muestreo de la siguiente manera: para condiciones drásticas de HR y temperatura (75% HR - 50 °C, 75% HR - 25 °C, 50% HR - 50 °C, 50% HR - 25 °C) el muestreo se realizó diariamente y para las condiciones de 25% HR - 50 °C y 25% HR - 25 °C los análisis se realizaron cada 72 horas. La toma de muestras se realizó por duplicado. En cada muestra se determinó el contenido de compuestos fenólicos de referencia. La toma de muestras se detuvo hasta que las partículas perdieron la característica física de extracto seco de libre flujo.

4.5.3.1 Preparación de las muestras para su análisis UHPLC

Para el análisis UHPLC es necesario reconstituir la muestra generalmente en disolventes orgánicos, además de emplear técnicas que permitan la ruptura de las microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión para permitir la completa transferencia de los CB al disolvente. Después de realizar unas pruebas preliminares, se decidió emplear una mezcla 80:20 (v/v) de metanol:agua como disolvente de extracción. Para obtener el contenido inicial de compuestos fenólicos de referencia en extractos secos, se pesaron 0.25 g de muestra en tubos Falcón de 50 mL y se adicionaron 25 mL del disolvente de extracción. Para las cinéticas de estabilidad, después de pesar



MATERIALES Y MÉTODOS

cada frasco con muestra para determinar el % *H bh*, se transfirió toda la muestra a tubos Falcón de 50 mL, con 25 mL del disolvente de extracción se realizaron lavados del frasco de vidrio que contenía la muestra y se transferían posteriormente al tubo Falcón con la muestra. Ambos tipos de muestras se sonicaron en un procesador ultrasónico (Hielscher Ultrasonics GmbH; mod. UP200S; Berlin, Alemania) operado a 200 W y 24 kHz durante 10 min. La temperatura se reguló a 30 °C con una unidad de refrigeración (PolyScience, Mod. MX07R-20; Niles, Illinois, EE. UU.). Cada extracto reconstituido obtenido se filtró a través de un filtro de jeringa de nylon de 0.2 µm sobre un vial. Los viales se mantuvieron en refrigeración (4 °C) hasta su posterior análisis mediante UHPLC.

4.5.3.2 Cuantificación de compuestos fenólicos usando UHPLC

La cuantificación de los compuestos fenólicos seleccionados como referencia se realizó según el procedimiento detallado en la sección 4.3.8.

4.5.4 Análisis estadístico

Las variables de respuesta (y_i) de las cinéticas de estabilidad se ajustaron al siguiente modelo donde se incluyeron los términos lineales y de interacción:

$$y_i = \beta_{i0}z_1 + \beta_{i0}z_2 + \beta_{i0}z_3 + \beta_{i1}x_1z_1 + \beta_{i2}x_2z_1 + \beta_{i3}x_3z_1 + \beta_{i12}x_1x_2z_1 + \beta_{i13}x_1x_3z_1 + \beta_{i23}x_2x_3z_1 + \beta_{i11}x_1^2z_1 + \beta_{i1}x_1z_2 + \beta_{i2}x_2z_2 + \beta_{i3}x_3z_2 + \beta_{i12}x_1x_2z_2 + \beta_{i13}x_1x_3z_2 + \beta_{i23}x_2x_3z_2 + \beta_{i11}x_1^2z_2 + \beta_{i1}x_1z_3 + \beta_{i2}x_2z_3 + \beta_{i3}x_3z_3 + \beta_{i12}x_1x_2z_3 + \beta_{i13}x_1x_3z_3 + \beta_{i23}x_2x_3z_3 + \beta_{i11}x_1^2z_3 \quad (4.24)$$

donde β_{ij} son los coeficientes de regresión; x_{i1} , x_{i2} y x_{i3} son las variables independientes codificadas; y_i es la variable de respuesta i ; z_1 , z_2 y z_3 son las variables Booleanas que definen los tipos de materiales de soporte evaluados: MSP3 (z_1), MD (z_2) y SP (z_3), (ver códigos en la Tabla 4.4). Los β_{ij} se calcularon por regresión lineal multivariable. Los términos significantes ($p < 0.05$) en el modelo para cada variable de respuesta i fueron determinados por análisis de varianza multivariado (MANOVA). Las variables independientes evaluadas fueron la humedad relativa (HR, x_{i1}), la temperatura de almacenamiento (x_{i2}) y el tiempo de almacenamiento (x_{i3}). Las variables de respuestas evaluadas fueron las concentraciones de quercetina-3-rutinósido (y_1) y kaempferol-3-glucósido (y_2) de los extractos secos de moringa.



5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo contempló el estudio del proceso de obtención de extractos secos de moringa, con énfasis en la recolección del material vegetal, la extracción sólido-líquido a partir de hojas de moringa y el secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos alcohólicos de moringa. Se evaluó el efecto de cada etapa citada sobre la cantidad de compuestos bioactivos seleccionados como referencia. A continuación, se discuten los resultados obtenidos.

5.1 Variación en compuestos bioactivos y actividad antirradical de hojas de *Moringa oleifera*: influencia de factores climáticos, edad del árbol y parámetros del suelo

La Tabla 5.1 muestra los datos climáticos registrados durante el tiempo experimental. Los resultados del análisis de suelos realizado en septiembre de 2014 se muestran en la Tabla 5.2. Las variaciones en los contenidos de compuestos bioactivos de referencia (fenoles totales, ácido gálico, ácido ascórbico y carotenoides totales) y en la actividad antirradical (ensayos DPPH y ABTS) de extractos de hojas de moringa de diferentes suelos y fechas de recolección se presentan en la Tabla 5.3. Los resultados fueron publicados en una revista indexada (Apéndice D). A fin de no repetir información, a continuación sólo se realiza la discusión de los resultados obtenidos.

A partir del análisis estadístico es posible inferir que el contenido de compuestos bioactivos de referencia (ácido gálico, compuestos fenólicos totales y, en menor medida, carotenoides totales y ácido ascórbico) está estrechamente relacionado con la capacidad de capturar los radicales ABTS y DPPH: a mayor contenido de compuestos bioactivos, mayor actividad antirradical (Tabla 5.3). Este fenómeno ha sido ampliamente reportado por otros autores (Moyer *et al.*, 2001; Camire *et al.*, 2002; Siddhuraju y Becker, 2003; Fazaeli *et al.*, 2012), quienes correlacionaron positivamente el contenido de compuestos bioactivos antioxidantes obtenidos a partir de diferentes materiales vegetales (*Morus nigra*, *Vaccinium* spp. L., *Rubus* spp. L., *Ribes* spp. L. y *Moringa oleifera* Lam.) con su capacidad de inhibir radicales.

Tesis Doctoral



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TABLA 5.1 Datos climáticos y fechas de recolección en el sitio de producción de árboles de *Moringa oleifera* investigado en el presente estudio.

Fecha de recolección	Junio 2014	Julio 2014	Septiembre 2014	Enero 2015	Mayo 2015
Temperatura diaria promedio (°C)	26.71 ± 1.66 ^a	26.83 ± 1.18 ^a	26.81 ± 0.78 ^a	21.52 ± 1.86 ^b	27.41 ± 2.37 ^a
*Precipitación acumulada total (mm)	41.20	897.00	964.80	13.80	25.80
Humedad relativa diaria promedio (% HR)	79.96 ± 6.45 ^b	87.42 ± 2.59 ^a	86.54 ± 3.05 ^a	84.92 ± 4.32 ^a	80.64 ± 4.58 ^b
Radiación solar diaria promedio (kWh·m ⁻² ·día ⁻¹)	6.07 ± 0.91 ^a	5.54 ± 1.76 ^{ab}	5.39 ± 1.20 ^{ab}	2.70 ± 0.98 ^c	5.04 ± 1.54 ^b
Radiación UV diaria promedio (kWh·m ⁻² ·día ⁻¹)	3.68 ± 0.78 ^b	4.54 ± 1.72 ^b	4.62 ± 1.62 ^b	0.99 ± 1.35 ^c	6.64 ± 1.87 ^a
Sitio de producción	Altitud	30 msnm			
	Latitud	19°11'46.19"N			
	Longitud	96°20'17.50"O			

Los valores de las variables que se muestran en la tabla representan el promedio diario o acumulado* de 30 días antes de cada recolección. En la misma fila, los valores que comparten letras del alfabeto no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

TABLA 5.2 Parámetros evaluados en septiembre (2014) de tres tipos de suelos utilizados en el presente estudio para el cultivo de árboles de *Moringa oleifera*.

Variables evaluadas	Tipos de suelo		
	A	B	C
pH	6.49 ± 0.03 ^b	6.65 ± 0.04 ^a	6.43 ± 0.01 ^b
Capacidad de intercambio catiónico (meq/100 g)	26.52 ± 0.06 ^b	25.56 ± 0.03 ^c	31.16 ± 0.04 ^a
Conductividad eléctrica (dS/m)	0.12 ± 0.01 ^b	0.20 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.03 ^b
K (meq/100 g)	0.41 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.01 ^b	0.21 ± 0.01 ^b
P (ppm)	16.62 ± 0.06 ^a	9.02 ± 0.09 ^b	3.80 ± 0.04 ^c
NH ₄ ⁺ (ppm)	65.80 ± 0.21 ^a	61.60 ± 0.35 ^b	47.60 ± 0.42 ^c
Materia orgánica (%)	5.47 ± 0.07 ^a	5.47 ± 0.04 ^a	2.73 ± 0.07 ^b
Arcilla (%)	46.72 ± 0.11 ^b	44.72 ± 0.26 ^c	48.72 ± 0.11 ^a
Limo (%)	23.64 ± 0.17 ^b	22.64 ± 0.11 ^c	27.64 ± 0.14 ^a
Arena (%)	29.64 ± 0.20 ^b	32.64 ± 0.14 ^a	23.64 ± 0.21 ^c

Los valores son las medias de los duplicados ± desviaciones estándar. En la misma fila, los valores que comparten letras del alfabeto no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TABLA 5.3 Variaciones en compuestos bioactivos y actividad antirradical de hojas de *Moringa oleifera* cultivadas en tres tipos de suelo y cosechadas en diferentes meses.

Tipos de suelo	Meses de recolección	Edad del árbol (días)	Actividad antirradical (gET/100 g bs)		Fenoles totales (gEAG/100 g bs)	Ácido gálico (mg/g bs)	Ácido ascórbico (mg/100 g bs)	Carotenoides totales (mg/100 g bs)
			Ensayo DPPH	Ensayo ABTS				
A	Junio-14	608	4.07 ± 0.06 ^b	4.13 ± 0.38 ^{cde}	3.15 ± 0.10 ^c	6.33 ± 0.14 ^{efg}	38.35 ± 0.53	86.49 ± 0.74 ^{de}
	Julio-14	641	4.11 ± 0.29 ^b	4.74 ± 0.38 ^c	2.49 ± 0.03 ^e	7.53 ± 0.07 ^{def}	107.68 ± 0.47	137.30 ± 2.37 ^a
	Septiembre-14	706	6.47 ± 0.03 ^a	8.54 ± 0.15 ^a	4.18 ± 0.11 ^a	12.65 ± 0.17 ^a	142.89 ± 0.56 ^b	132.13 ± 1.68 ^a
	Enero-15	831	2.51 ± 0.08 ^c	2.80 ± 0.16 ^g	2.01 ± 0.03 ^f	9.10 ± 0.71 ^{bcd}	168.17 ± 5.71	93.11 ± 3.56 ^{cd}
	Mayo-15	949	3.41 ± 0.07 ^{bc}	3.14 ± 0.10 ^{efg}	2.87 ± 0.10 ^d	9.08 ± 0.59 ^{bcd}	132.13 ± 0.71 ^c	65.78 ± 5.23 ^{gh}
B	Junio-14	458	3.40 ± 0.50 ^{bc}	3.25 ± 0.35 ^{defg}	2.31 ± 0.03 ^e	5.07 ± 0.10 ^g	80.76 ± 0.94	70.04 ± 3.18 ^{fg}
	Julio-14	491	3.66 ± 0.69 ^{bc}	4.29 ± 0.25 ^{cd}	2.58 ± 0.02 ^e	9.46 ± 0.39 ^{bcd}	143.07 ± 0.49 ^b	106.97 ± 1.59 ^b
	Septiembre-14	556	7.63 ± 0.33 ^a	5.08 ± 0.06 ^c	3.67 ± 0.06 ^b	10.76 ± 0.28 ^{ab}	180.47 ± 0.76 ^a	105.01 ± 3.27 ^{bc}
	Enero-15	681	3.32 ± 0.10 ^{bc}	3.23 ± 0.01 ^{defg}	2.43 ± 0.00 ^e	8.28 ± 0.85 ^{cde}	98.78 ± 0.87	51.41 ± 5.84 ⁱ
	Mayo-15	799	4.52 ± 0.02 ^b	4.20 ± 0.65 ^{cde}	3.74 ± 0.11 ^b	12.93 ± 1.10 ^a	180.87 ± 2.68 ^a	70.18 ± 3.50 ^{fg}
C	Junio-14	276	4.57 ± 0.25 ^b	4.26 ± 0.32 ^{cd}	3.20 ± 0.03 ^c	5.32 ± 0.28 ^{fg}	71.01 ± 0.89	56.80 ± 1.12 ^{hi}
	Julio-14	309	3.50 ± 0.14 ^{bc}	2.69 ± 0.12 ^g	3.08 ± 0.01 ^{cd}	5.57 ± 0.15 ^{fg}	140.69 ± 0.84 ^b	77.92 ± 1.24 ^{ef}
	Septiembre-14	374	4.28 ± 0.85 ^b	6.69 ± 0.25 ^b	3.69 ± 0.08 ^b	10.29 ± 1.27 ^{bc}	190.13 ± 1.90 ^a	66.35 ± 3.30 ^{fgh}
	Enero-15	499	3.34 ± 0.04 ^{bc}	2.97 ± 0.10 ^{fg}	2.49 ± 0.03 ^e	6.71 ± 0.42 ^{efg}	117.44 ± 0.83	92.57 ± 0.92 ^d
	Mayo-15	617	4.69 ± 0.10 ^b	4.04 ± 0.05 ^{cdef}	3.32 ± 0.10 ^c	10.84 ± 0.03 ^{ab}	138.62 ± 0.21 ^{bc}	69.42 ± 0.88 ^{fg}

Los valores son las medias de los duplicados ± desviaciones estándar. En la misma columna, los valores que comparten letras del alfabeto no son significativamente diferentes ($p < 0.05$). ET: equivalente de trolox; EAG: equivalente de ácido gálico; bs: base seca.

5.1.1 Efecto de los factores climáticos y la edad del árbol sobre el contenido de compuestos bioactivos y la actividad antirradical de extractos de hojas de *Moringa oleifera*

El análisis estadístico que se muestra en las Tablas 5.1 y 5.3, confirma que hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las variables analizadas en las diferentes fechas de recolección. Los datos climáticos (Tabla 5.1) muestran que entre junio de 2014 y mayo de 2015 no hay diferencia significativa ($p < 0.05$) en los valores de temperatura y humedad relativa. Entre septiembre de 2014 y mayo de 2015, hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores de precipitación, humedad relativa y radiación UV. Enero de 2015 difirió de todos los demás meses de recolección por sus temperaturas más bajas, radiación y precipitación (Tabla 5.1). A partir de las Tablas 5.1 y 5.3 se puede resumir el siguiente comportamiento: (1) De junio a julio de 2014, se incrementó la expresión de compuestos bioactivos y la actividad antirradical; también fueron más altas la precipitación y la humedad relativa; pero la temperatura media, la radiación solar y la radiación UV se mantuvieron estables. (2) En septiembre de 2014 se obtuvieron los mayores valores de actividad antirradical, fenoles totales, ácido gálico y carotenoides totales, junto con la precipitación, la humedad relativa y la radiación solar más altas. (3) En enero de 2015 se presentaron los valores menores de todas las variables evaluadas, a excepción del ácido ascórbico y la humedad relativa. (4) De enero a mayo de 2015 se registró un aumento de la temperatura media, la precipitación, la radiación UV y la radiación solar, así como un aumento de la expresión de compuestos bioactivos y la actividad antirradical.

A partir del análisis estadístico es posible inferir que mientras aumentan la radiación solar, la temperatura media, la radiación UV y la precipitación, también los valores de compuestos bioactivos y actividad antirradical en las hojas de moringa aumentan significativamente (Tablas 5.1 y 5.3). Estos resultados sugieren que temperaturas y radiación más altas estresaron los árboles. La exposición de las plantas al estrés resulta en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO tienden a oxidar varias moléculas celulares como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, un proceso que amenaza la existencia del núcleo celular. Para evitar la acumulación de estas ERO y mantener su propia supervivencia, las plantas han desarrollado un intrincado sistema de defensa antioxidante. Este sistema comprende varias moléculas enzimáticas y no enzimáticas producidas para contrarrestar los efectos adversos del estrés ambiental (Bartwal *et al.*, 2013). Esta expresión de metabolitos secundarios antioxidantes permite explicar los resultados en esta investigación, y es consistente con otros resultados obtenidos por diferentes autores que correlacionan positivamente el contenido de compuestos bioactivos con condiciones de estrés ambiental a las cuales las plantas evaluadas (*Plantago lanceolata* L., *Nepeta cataria* L. *f. citriodora*, *Melissa officinalis* L., *Salvia officinalis* L., *Solanum melongena* L., *Ananas comosus* L. Merr.) fueron sometidas (Tamura y Nishibe, 2002; Manukyan, 2013; García-Salas *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2015).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio confirma que las radiaciones solar y UV son factores externos importantes que afectan la producción de compuestos bioactivos en las hojas de moringa. Los resultados mostraron que cuando el nivel de radiación aumenta, la productividad de fenoles totales y ácido gálico se vio afectada positivamente; y en menor proporción, los contenidos de ácido ascórbico y carotenoides totales también se vieron afectados (Tablas 5.1 y 5.3). Al mismo tiempo, y como está relacionado con el contenido de compuestos bioactivos (discutido en la sección previa), la actividad antirradical también aumentó. La biosíntesis intensiva de ciertos compuestos bioactivos en las plantas son una parte esencial de la adaptación de la planta al estrés ambiental, como la radiación solar y la radiación UV (Manukyan, 2013).

Manukyan (2013) informó que el impacto de la radiación UV en la biosíntesis de compuestos farmacéuticos en plantas medicinales podría describirse como positivo, negativo o neutro dependiendo del compuesto bioactivo tomado como referencia en la planta estudiada. Por ejemplo, menciona que dosis intensivas de radiación UV-B ($2.5 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$) son favorables para la síntesis de aceites esenciales en las plantas estudiadas, mientras que la radiación UV-B a dosis bajas ($1 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$) favoreció el aumento del contenido de polifenoles en el caso de tres especies evaluadas: *Nepeta cataria* L. f. *citriodora*, *Melissa officinalis* L. y *Salvia officinalis* L. Se ha informado que ciertos compuestos flavonoides también pueden funcionar como agentes protectores de las plantas contra la radiación intensa, principalmente derivados del kaempferol (Croteau *et al.*, 2000), cuya presencia en las hojas de moringa ha sido corroborada (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2015). Esto explica el aumento de fenoles totales en las hojas de moringa con la radiación en la presente investigación.

El ácido ascórbico y los compuestos fenólicos se consideran los compuestos bioactivos más importantes en las hojas de moringa y son los principales responsables de su capacidad antioxidante. Los resultados de esta investigación sugieren que la fracción de ácido ascórbico también está relacionada con la intensidad de radiación: de enero a mayo de 2015 se observó un incremento en el contenido de ácido ascórbico y de radiación (Tablas 5.1 y 5.3). Crespo *et al.* (2010) encontraron resultados similares con el contenido de ácido cítrico de las fresas siendo influenciado positivamente por la radiación y el número de horas de sol.

La composición de carotenoides en las hojas verdes es bastante constante, mientras que en los frutos se observa una notable variabilidad cualitativa y cuantitativa (Coria-Cayupan *et al.*, 2009). Sin embargo, diferencias en el contenido de carotenoides en hojas de vegetales son reportadas por Azevedo-Meleiro y Rodríguez-Amaya (2005), quienes informan que el contenido de carotenoides en la endibia (*Cichorium endivia*) y la espinaca de Nueva Zelanda (*Tetragonia expansa*) fue significativamente mayor en el verano que en invierno, reflejando los efectos estacionales. En las plantas, los carotenoides desempeñan tres funciones protectoras esenciales en el aparato fotosintético: el primer papel protector de los carotenoides es su capacidad de extinguir moléculas en estado triplete y retornarlas al estado basal. La segunda función es extinguir la energía de excitación



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

del oxígeno en estado excitado simple (altamente destructivo), devolviéndolo a su estado triplete normal. La tercera función protectora es la extinción de los centros de reacción de los fotosistemas cuando están sobreexcitados por la radiación intensa. En este caso, los carotenoides protegen las hojas de la radiación excesiva debido a su capacidad para extinguir o disipar la energía de excitación de otras moléculas en forma de calor para evitar dañar la célula de la planta (Ramel *et al.*, 2013; Hongbo *et al.*, 2015). Esto explica los resultados obtenidos en este trabajo: cuando se produjeron radiaciones solar y UV excesivas durante julio y septiembre de 2014, la síntesis de carotenoides en las hojas de moringa se incrementó (Tablas 5.1 y 5.3) para proporcionar protección contra las ERO generadas por el estrés causado por las condiciones climáticas. De esta forma las hojas pueden continuar con el trabajo fotosintético.

Es posible inferir a través de los datos y el análisis estadístico mostrados en las Tablas 5.1 y 5.3, que la expresión de metabolitos secundarios aumenta cuando los valores de la temperatura media y la precipitación aumentan, lo que indica un posible estado de estrés hídrico en la planta. El estrés en los árboles de moringa debido a la variación en las temperaturas medias y la precipitación está relacionado con el transporte nutricional y las características fisiológicas del árbol. Cuando la temperatura media aumenta, la absorción de K se modifica y prácticamente permanece inmóvil, por lo cual la capacidad funcional de la planta disminuye. Por otro lado, cuando la precipitación y/o la humedad relativa son altas, la planta reduce la evaporación del agua a través de las hojas, entonces las raíces no absorben agua a través del suelo y esta acción reduce significativamente la absorción de nutrientes que viajan con el agua (Alcántar-González y Trejo-Téllez, 2009). Por lo tanto, la expresión de compuestos bioactivos se vería favorecida por la sinergia entre la temperatura media y la precipitación.

Sreelatha y Padma (2009) indican que el contenido de antioxidantes y la actividad antirradical varían con la etapa de madurez de las hojas de moringa, sus resultados indican que la expresión de compuestos bioactivos es más alta en la etapa madura que en la etapa tierna. Por lo tanto, en el presente estudio se decidió trabajar con hojas de moringa en etapa madura, pero la recolección se llevó a cabo en árboles de diferentes edades. Los cambios en el contenido de compuestos bioactivos con respecto a la edad del árbol de moringa no se han reportado anteriormente. Los resultados de este trabajo sugieren que la expresión de metabolitos secundarios con actividad antirradical fue independiente de la edad del árbol cuando las hojas de moringa se cosechan en la etapa madura (Tabla 5.3); las diferencias observadas en la expresión de compuestos bioactivos de hojas de moringa dependió principalmente de los factores climáticos.



5.1.2 Efecto de los parámetros del suelo y la edad del árbol sobre el contenido de compuestos bioactivos y la actividad antirradical de extractos de hojas de *Moringa oleífera*

Como se discutió, los factores climáticos tienen un efecto significativo sobre el contenido de compuestos bioactivos y la actividad antirradical en las parcelas de moringa evaluadas; sin embargo, las variaciones en los parámetros fisicoquímicos del suelo también pueden afectar el contenido de compuestos bioactivos en los vegetales (Reimberg *et al.*, 2009). La comprensión de la relación entre el contenido de compuestos bioactivos, la actividad antirradical y la composición del suelo puede ser crítica para aumentar la productividad de cultivos de árboles de moringa con un contenido significativo de fitoquímicos para garantizar los efectos sobre la salud humana a través del consumo de sus productos; por lo tanto, en este estudio se evaluaron tres parcelas de moringa de diferentes edades cultivadas en tres tipos de suelos, a las que se hará referencia en lo sucesivo como A, B y C. El estudio se llevó a cabo en septiembre de 2014 cuando la expresión de compuestos bioactivos con actividad antirradical fue mayor (Tabla 5.3). Como las muestras de moringa se cultivaron igualmente en esta etapa, las diferencias debidas a factores climáticos se descartan; se supuso que los valores de las variables estudiadas en las hojas de moringa mostraron cambios atribuidos exclusivamente a los parámetros del suelo y la edad del árbol.

En la Tabla 5.3 se confirma que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos con respecto a las características evaluadas en las hojas de moringa cosechadas en septiembre de 2014. A partir de los datos mostrados en las Tablas 5.2 y 5.3 se puede citar lo siguiente: (1) en el suelo A se registraron los valores más altos de materia orgánica (MO), NH_4^+ , P, K, edad del árbol, fenoles totales, ácido gálico, carotenoides totales y actividad antirradical (ensayo ABTS); los valores menores de ácido ascórbico, capacidad de intercambio catiónico (CIC), conductividad eléctrica (CE) y pH se registraron en este suelo. (2) El suelo B presentó los valores más altos de CE, pH, arena, actividad antirradical (ensayo DPPH) y MO; así como valores menores de CIC, limo, arcilla y valores medios del resto de las variables evaluadas. (3) El suelo C tiene los valores menores de edad del árbol, fenoles totales, actividad antirradical (ensayo DPPH), MO, NH_4^+ , P, K, pH y CE, pero tiene los valores más altos de limo, arcilla, CIC y ácido ascórbico.

En los suelos A y B con mayor contenido de NH_4^+ , MO, P y K con respecto al suelo C (Tabla 5.2), principalmente el contenido de carotenoides totales y la capacidad de capturar radicales libres de DPPH tienden a aumentar (Tabla 5.3). El P forma parte de los ácidos nucleicos, participa en la síntesis de proteínas y también está involucrado en todos los procesos metabólicos de transferencia de energía. Mientras que el K es el cofactor o activador de más de 50 enzimas que metabolizan carbohidratos y proteínas, también participa en el equilibrio iónico y la regulación osmótica (Alcántar-González y Trejo-Téllez, 2009). De acuerdo con la comparación de los resultados obtenidos del

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

análisis del suelo con la literatura (Alcántar-González y Trejo-Téllez, 2009), el suelo A muestra niveles medios de K y P, mientras que los suelos B y C muestran bajos niveles de estos nutrientes (Tabla 5.2). De acuerdo con esto, es evidente que un déficit en P y K tiene un efecto negativo en el metabolismo de la planta, y por lo tanto tienen un impacto en el rendimiento del cultivo y en el contenido de compuestos bioactivos (Alcántar-González y Trejo-Téllez, 2009). Este estrés al que la planta está sometida por un déficit en P y K, podría explicar la mayor expresión de carotenoides totales (relacionado principalmente con el contenido de P), fenoles totales (relacionado principalmente con el contenido de K) y ácido gálico, como resultado de la estrategia de defensa de los árboles de moringa, al menos en el rango evaluado.

De acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 (Norma-Oficial-Mexicana, 2002), los valores de MO y NH_4^+ de los suelos evaluados (Tabla 5.2) se encontraron en niveles de fertilidad media (suelo C) y alta (suelos A y B). Algunos autores informan que los contenidos de NH_4^+ y de MO se correlacionan positivamente con la productividad de los cultivos porque participan en todas las reacciones enzimáticas y procesos metabólicos (síntesis de proteínas, respiración, fotosíntesis) (Alcántar-González y Trejo-Téllez, 2009; Coria-Cayupan *et al.*, 2009). A partir del análisis estadístico mostrado en las Tablas 5.2 y 5.3, se puede inferir que los altos niveles de MO y NH_4^+ de los suelos evaluados no son completamente adecuados para la síntesis de compuestos fenólicos, pero sí para la expresión de carotenoides totales. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chludil *et al.* (2008), quienes reportaron que en suelos deteriorados se incrementó el contenido de flavonoides en quinoa (*Chenopodium album*), en particular los compuestos derivados de quercetina y kaempferol. Coria-Cayupan *et al.* (2009) informaron un comportamiento similar en muestras de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivadas en suelos con diferentes tratamientos de fertilización; informan que el nitrógeno en el suelo afecta adversamente la síntesis de compuestos fenólicos, además, sus resultados muestran que el contenido de carotenoides en la lechuga fue mayor en todos los suelos fertilizados que en el suelo no tratado; concluyeron que la biosíntesis de carotenoides depende básicamente del suministro de nitrógeno.

Con respecto a la edad del árbol, los resultados muestran que cuando aumenta la edad del árbol, aumenta el contenido de carotenoides (ver en la Tabla 5.3 los valores de estas variables analizadas en muestras cosechadas en septiembre de 2014). En este contexto, Azevedo-Meleiro y Rodríguez-Amaya (2005) también informaron una dependencia entre los niveles de carotenoides con la madurez de la escarola (*Cichorium endivia*) y la lechuga (*Lactuca sativa*), sus resultados muestran que la concentración de carotenoides era de dos a cuatro veces mayor en las hojas maduras en comparación con las hojas tiernas. La maduración en frutas y verduras generalmente va acompañada de un aumento en la carotenogénesis, este fenómeno se ha atribuido a una regulación positiva de la



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

expresión génica de los carotenoides con la maduración (Azevedo-Meleiro y Rodriguez-Amaya, 2005; Campbell *et al.*, 2013). Una ruta similar podría explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo, considerando que las hojas de moringa se recolectaron como hojas maduras pero en árboles de diferentes edades.

Hallazgos opuestos se mostraron para el contenido de ácido ascórbico de las hojas de moringa. El contenido de ácido ascórbico es predominante en el desarrollo inicial del árbol, pero disminuye con el aumento de la edad del árbol (ver en la Tabla 5.3 los valores de estas variables analizadas en muestras cosechadas en septiembre de 2014). Se reporta que el contenido de ácido L-ascórbico en las plantas cambia con la luz, la hora de recolección, la edad, el tejido vegetal y el compartimento celular. Teóricamente, todos estos cambios deberían explicarse por el funcionamiento de una red metabólica completa de biosíntesis, catabolismo y reciclaje de ácido L-ascórbico (Valpuesta y Botella, 2004). La literatura informa que el ácido ascórbico se sintetiza rápidamente durante la germinación de la semilla (Loewus, 1999) y la división celular (Davey *et al.*, 2000), y continúa produciéndose en regiones de crecimiento activo durante toda la vida de la planta. Sin embargo, se podría argumentar que en ciertos tejidos y/o órganos de plantas como las hojas, la degradación metabólica del ácido ascórbico no puede mantener el ritmo de la biosíntesis, o las actividades enzimáticas clave para tales procesos se pierden o se inhiben (Loewus, 1999). Por ejemplo, los estudios sobre el centro quiescente de la raíz de maíz, que comprende células que no se dividen, han demostrado que contiene altos niveles de ascorbato oxidasa y esto se correlaciona con niveles bajos o indetectables de ácido L-ascórbico (Davey *et al.*, 2000). Es evidente que la ruta biosintética del ácido L-ascórbico en las plantas es muy compleja y dependiente del desarrollo del árbol.

Como se muestra en la Tabla 5.2. los valores de pH oscilaron entre 6.43 y 6.65. Estos valores de pH son aceptables para el correcto desarrollo de las plantas porque en este rango la solubilidad de la mayoría de los nutrientes en el suelo es apropiada para facilitar su absorción por las plantas (Alcántar-González y Trejo-Téllez, 2009; Coria-Cayupan *et al.*, 2009). La CE expresa la concentración de sales solubles totales en el suelo (sodio, magnesio, calcio, cloruro, sulfato y bicarbonato principalmente), que en altas concentraciones ($> 45 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$, es decir: valores de CE $> 4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$) podrían causar marchitamiento y muerte de la planta. Las condiciones salinas suprimen el crecimiento de las plantas porque los iones sodio y cloruro reducen la disponibilidad de agua debido a la alta presión osmótica del medio externo y restringen la disponibilidad, movilidad y transporte de iones de potasio y calcio a las partes en crecimiento de las plantas, afectando la calidad de los órganos tanto vegetativos como reproductivos y, en consecuencia, reduce el rendimiento y la calidad del cultivo (Coria-Cayupan *et al.*, 2009). Alcántar-González y Trejo-Téllez (2009) informan que los valores de CE entre 0 y $2 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ corresponden a concentraciones de sal de entre 0 y $20 \text{ meq}\cdot\text{L}^{-1}$; en este rango, el efecto sobre el cultivo se considera insignificante.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 5.2, los valores de CE en los suelos evaluados fueron inferiores a $0.2 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$. Por lo tanto, estos suelos se consideran adecuados para prácticas de cultivo. La CIC indica la capacidad de un suelo para retener y liberar iones positivos, y se correlaciona positivamente con el contenido de arcilla del suelo, lo cual es consistente con nuestros resultados (Tabla 5.2). Los valores de CIC de los suelos evaluados oscilaron entre $25.56 \text{ meq}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ y $31.16 \text{ meq}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (Tabla 5.2), valores típicos de suelos arcillosos. Estos suelos tienen la característica de retener adecuadamente los nutrientes, por lo cual se mantiene la disponibilidad de nutrientes del suelo para que la planta pueda usarlos (Alcántar-González y Trejo-Téllez, 2009). Dado lo anterior, se puede argumentar que el pH, la CE, la CIC y el contenido de arcilla de los suelos evaluados se encuentran dentro de niveles que permiten que los nutrientes esenciales sean absorbidos por las raíces de las plantas para permitir su desarrollo.

Está claro que se requieren más estudios bajo condiciones controladas para evaluar el efecto de los parámetros del suelo sobre la expresión de compuestos bioactivos y la actividad antirradical de hojas de moringa que ayudaría a los investigadores y productores agrícolas a entender cómo la síntesis de metabolitos secundarios bioactivos podría mejorarse en los cultivos de moringa. Los resultados de este trabajo permiten ampliar la perspectiva para el cultivo eficiente de árboles de moringa en regiones tropicales y subtropicales. Para la siguiente etapa del proyecto, se decidió trabajar con hojas cosechadas en el suelo A, el cual permitió la mayor expresión de fenoles totales. La recolección se realizó en el mes de septiembre de 2015 cuando las condiciones climáticas permitieron los mayores valores de actividad antirradical, fenoles totales y carotenoides totales.

5.2 Optimización de la extracción por lote en etapas múltiples a contracorriente de compuestos fenólicos de hojas de *Moringa oleifera* utilizando un modelo mecanicista

Debido al creciente interés en la obtención de compuestos bioactivos a partir de plantas, es necesaria una mejor comprensión del equilibrio entre las fases de los compuestos bioactivos y su papel en el diseño del proceso de extracción. En el presente proyecto se decidió resolver numéricamente el modelo teórico conceptualizado por Castillo-Santos *et al.* (2016) para definir el número de etapas y la cantidad de disolvente requeridos para producir el máximo rendimiento de extracción con la máxima concentración de extracto. El modelo considera una mezcla de etanol:agua 80:20 (p/p) como disolvente, y dos relaciones de equilibrio necesarias para la descripción del sistema: ecuaciones (2.13)-(2.14). A continuación se presentan los resultados obtenidos.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2.1 Composición inicial de la alimentación

La mayoría de los trabajos en extracción sólido-líquido informan el rendimiento (η) en función de la fracción másica de sólidos totales en la alimentación ($x_{F_{12}}$), ver ejemplos en las referencias de la Tabla 2.2. Sin embargo, está presente una fracción másica de sólidos no extraíbles en la alimentación (x_{F_1}), por lo tanto, si el η se calcula en función de $x_{F_{12}}$ se realizará una subestimación de este valor. Una caracterización completa de la alimentación en el campo de la extracción sólido-líquido implica la evaluación de la fracción másica de sólidos no extraíbles (x_{F_1}), fracción másica de sólidos extraíbles (x_{F_2}) y fracción másica de agua (x_{F_3}). La caracterización experimental de las hojas de moringa utilizadas para la extracción con etanol al 80% (p/p) en agua se detalla en la Tabla 5.4. Los valores de los componentes se representan como fracciones másica porque el modelo conceptualizado por Castillo-Santos *et al.* (2016) es un modelo mecanicista expresado en términos de balances de masa cuando se ha alcanzado el equilibrio. Los resultados indican que $x_{F_1} > x_{F_2}$ para hojas de moringa (Tabla 5.4). Los materiales vegetales contienen generalmente sólo una pequeña cantidad de compuestos activos, pero la mayoría de las veces con un alto valor agregado que justifica el desarrollo de procesos de separación de alto rendimiento (Romdhane y Gourdon, 2002), por ejemplo, el uso de EMC. En general, ambas fracciones (x_{F_1} y x_{F_2}) son componentes clave para definir ecuaciones en el modelo de Castillo-Santos *et al.* (2016): x_{F_1} es necesario para definir M y x_{F_2} para calcular el η .

TABLA 5.4 Caracterización de las hojas de moringa.

Componente	Hojas secas trituradas	Hojas secas enteras
Sólidos no extraíbles (x_{F_1})	0.555 ± 0.001	0.579 ± 0.008
Sólidos extraíbles (x_{F_2})	0.391 ± 0.001	0.368 ± 0.008
Agua (x_{F_3})	0.054 ± 0.001	0.053 ± 0.002

Los valores son las medias ± desviaciones estándar ($n = 3$).

5.2.2 Determinación experimental de los parámetros de equilibrio

El estudio de procesos de extracción sólido-líquido requiere un conocimiento exacto de las fases en equilibrio. A partir de cinéticas de extracción a diferentes proporciones alimentación:disolvente es posible determinar el tiempo de equilibrio y entonces realizar la determinación de los parámetros de equilibrio. El tiempo para alcanzar el equilibrio entre las fases se estimó en 150 minutos cuando las hojas trituradas (HT) de moringa se usaron como F a diferentes proporciones en el proceso de extracción a 35 °C (Figura 5.1). Cuando se representó x_{E_2} versus M



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(Figura 5.2), se observó que la solución retenida específica es constante en un valor de $M = 6.86$ (kg de solución retenida)/(kg de sólidos no extraíbles) ± 0.19 , al menos en las proporciones (g alimentación)/(g disolvente) de estudio. En otras palabras, independientemente de las concentraciones de productos obtenidas, la misma cantidad de extracto se retiene en el material vegetal después de la separación de fases. Por lo tanto, se puede considerar que este valor no cambiará de una etapa a otra. Sin embargo, este valor de M es más alto que el obtenido por Castillo-Santos *et al.* (2016) quienes estudiaron el proceso de extracción sólido-líquido a contracorriente de vainilla: $M = 2.8$ (kg de solución retenida)/(kg de sólidos no extraíbles) ± 0.2 . Comparando ambos resultados es posible inferir que la eficiencia de separación de la fase líquida de la fase sólida por sedimentación por gravedad y decantación se vio afectada por las características físicas del material vegetal, en particular por el tamaño de las partículas. Las vainas de vainilla se cortaron en pedazos de 1 cm y las hojas de moringa se trituraron y tamizaron para lograr un tamaño de partícula estándar comprendido entre 0.59 mm y 0.22 mm. Por lo tanto, independientemente de su naturaleza, es posible inferir que las piezas de vainilla estaban lo suficientemente separadas para que su sedimentación se llevara a cabo libremente (Perry *et al.*, 1984), y por lo tanto la separación de fases por decantación se realizó fácilmente. Es importante señalar que la extracción sólido-líquido es sólo una de las operaciones unitarias en un proceso de separación y que la separación de fases depende en gran medida de cómo se obtuvo el extracto. Para demostrar que el tamaño de las partículas afectó la eficacia de la separación, y por lo tanto el valor de M , se realizaron cinéticas de extracción con hojas enteras (HE) de moringa.

Una diferencia importante cuando se usaron HE como F fue la cantidad de disolvente mínima requerida para cubrir totalmente las muestras. Una relación de 0.10 (g alimentación)/(g disolvente) no fue factible y por lo tanto fue reemplazada por 0.04 (g alimentación)/(g disolvente) en el conjunto experimental. El valor de M disminuyó significativamente ($p < 0.05$) a 5.68 (kg de solución retenida)/(kg de sólidos no extraíbles) ± 0.21 cuando se usaron HE como F a diferentes proporciones en el proceso de extracción a 35 °C (Figura 5.2 y Tabla 5.5). Sin embargo, el tiempo requerido para alcanzar la concentración de equilibrio en el extracto fue de 240 minutos (Figura 5.3). Es evidente que los tamaños de las partículas deben ser adecuados para garantizar la eficacia de la difusión, pero no deben ser tan pequeños como para aumentar M . Además de la reducción del tamaño de partícula, un incremento de la temperatura de operación reduce el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio entre ambas fases (Aguilera, 2003; Vetal *et al.*, 2012; Wijngaard *et al.*, 2012) porque las temperaturas más altas generalmente implican: i) un aumento en la capacidad de los disolventes para solubilizar solutos, ii) un aumento en las velocidades de difusión, iii) una mejor disrupción de los enlaces soluto-matriz, iv) una disminución de la viscosidad del disolvente y v) una disminución de la tensión superficial (Richter *et al.*, 1996; Wijngaard *et al.*, 2012). Bajo estas consideraciones, se seleccionó una temperatura de 55 °C para repetir la cinética de extracción con HE.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

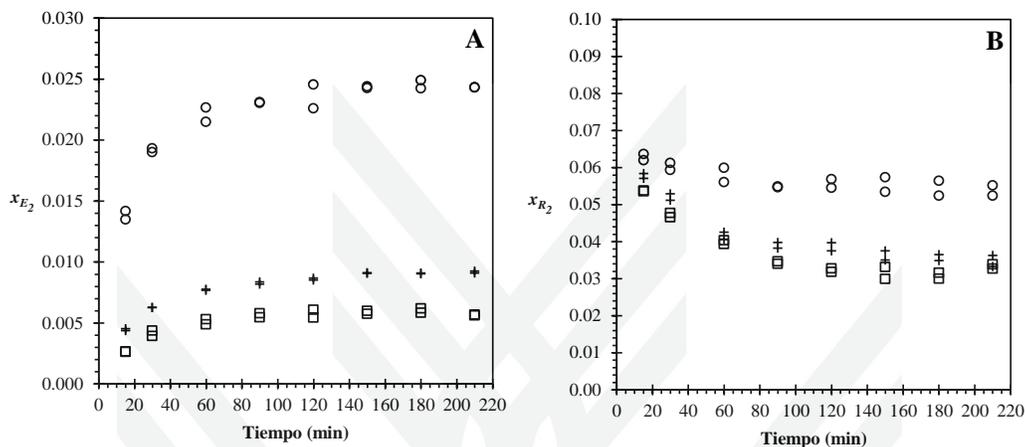


FIGURA 5.1 Evolución de la fracción mássica de sólidos extraíbles en el extracto (x_{E_2}) (A) y en el refinado (x_{R_2}) (B). Alimentación: hojas trituradas de moringa. Proporciones (g muestra)/(g disolvente): 0.02 (□), 0.03 (+) y 0.10 (○). Disolvente: etanol:agua 80:20 (p/p). Temperatura: 35 °C. Los valores por duplicado están representados en las figuras.

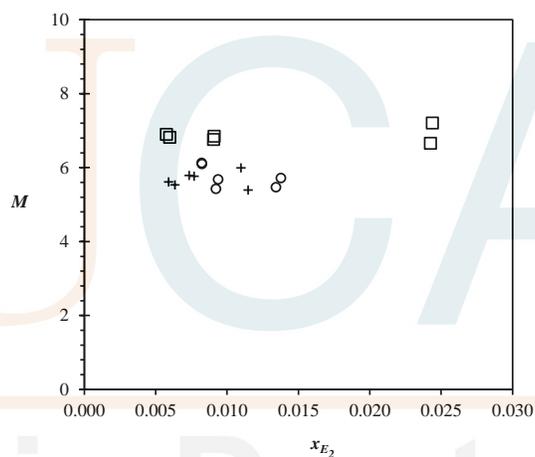


FIGURA 5.2 Solución retenida específica (kg de solución retenida por kg de sólidos no extraíbles: M) obtenida experimentalmente para extractos de moringa usando diferentes proporciones (g muestra)/(g disolvente). Alimentación - temperatura de operación: hojas trituradas - 35 °C (□), hojas enteras - 35 °C (+) y hojas enteras - 55 °C (○). Disolvente: etanol:agua 80:20 (p/p). Los valores por duplicado están representados en la figura.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TABLA 5.5 Comparación entre los valores de M obtenidos experimentalmente en el presente trabajo.

Muestras	Hojas secas trituradas	Hojas secas enteras	Hojas secas enteras
M^*	6.86 ± 0.19^a	5.68 ± 0.21^b	5.75 ± 0.30^b
Temperatura (°C)	35	35	55
Tiempo de equilibrio (min)	150	240	120

* $(\text{kg de solución retenida})/(\text{kg de sólidos no extraíbles})$. Los valores son las medias \pm desviaciones estándar ($n = 2$). Valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

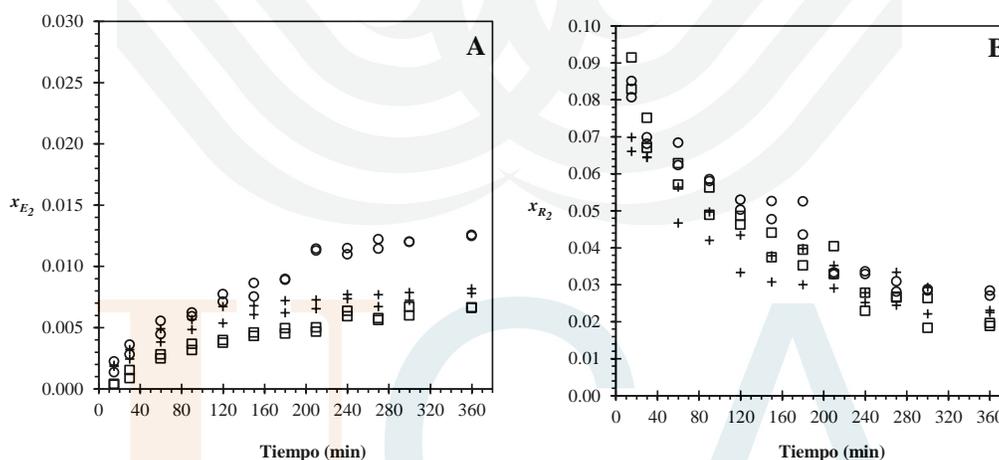


FIGURA 5.3 Evolución de la fracción mássica de sólidos extraíbles en el extracto (x_{E_2}) (A) y en el refinado (x_{R_2}) (B). Alimentación: hojas enteras de moringa. Proporciones (g muestra)/(g disolvente): 0.02 (□), 0.03 (+) y 0.04 (○). Disolvente: etanol:agua 80:20 (p/p). Temperatura: 35 °C. Los valores por duplicado están representados en las figuras.

Cuando se utilizaron HE como F en diferentes proporciones en el proceso de extracción a 55 °C, el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio entre ambas fases fue de 120 min (Figura 5.4) y M fue constante en un valor de 5.75 (kg de solución retenida)/(kg de sólidos no extraíbles) \pm 0.30 (Figura 5.2) y no fue significativamente diferente ($p < 0.05$) al valor de M previamente estimado a 35 °C para HE (Tabla 5.5).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

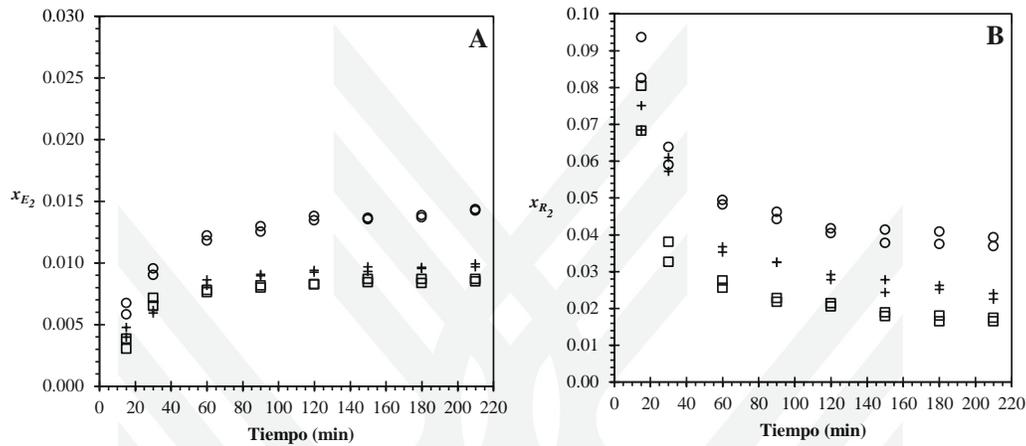


FIGURA 5.4 Evolución de la fracción másica de sólidos extraíbles en el extracto (x_{E_2}) (A) y en el refinado (x_{R_2}) (B). Alimentación: hojas enteras de moringa. Proporciones (g muestra)/(g disolvente): 0.02 (\square), 0.03 (+) y 0.04 (O). Disolvente: etanol:agua 80:20 (p/p). Temperatura: 55 °C. Los valores por duplicado están representados en las figuras.

Las concentraciones de equilibrio obtenidas por duplicado en ambas fases a diferentes relaciones (g alimentación)/(g disolvente) mostraron el comportamiento lineal representado en la Figura 5.5 cuando se usaron HT y HE como F a 35 y 55 °C. Este comportamiento lineal confirma la Ec. (2.1), por lo tanto, las pendientes de las relaciones lineales son las relaciones de equilibrio termodinámico entre las fases (K_{eq}). Los valores de las pendientes se calcularon mediante regresión lineal sin intersección (sección 4.2.4.1). Cuando se utilizaron HE como F a 35 °C, se observó una dispersión en las concentraciones obtenidas con diferentes proporciones de (g alimentación)/(g de disolvente) (Figura 5.3), esto se debe a que se asumió que los valores de x_{F_2} (Tabla 5.4) fueron iguales en cada F , lo que es necesario porque las muestras para la extracción exhaustiva fueron diferentes de las utilizadas para las cinéticas de extracción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

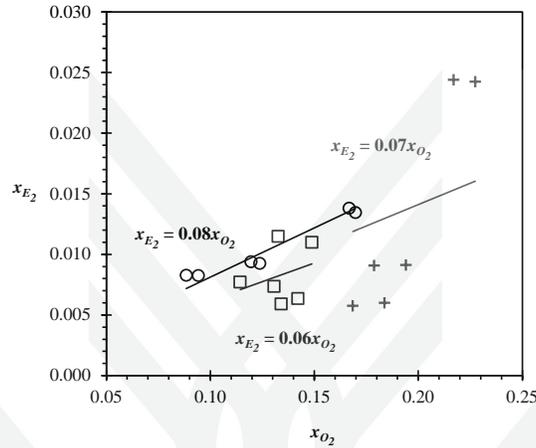


FIGURA 5.5 Relación de equilibrio termodinámico (K_{eq}) obtenida experimentalmente para extractos de moringa usando diferentes proporciones (g alimentación)/(g disolvente). Alimentación - temperatura de operación: hojas trituradas - 35 °C (\square), hojas enteras - 35 °C ($+$) y hojas enteras - 55 °C (\circ). Disolvente: etanol:agua 80:20 (p/p). Los valores por duplicado están representados en la figura.

5.2.3 Resultados de la simulación de extracción por lote en etapas múltiples a contracorriente (EMC) de hojas de moringa

Teniendo en cuenta la composición inicial de la alimentación y los parámetros de equilibrio obtenidos experimentalmente de las cinéticas de extracción sólido-líquido en una sola etapa de las hojas secas de moringa, el modelo mecanicista conceptualizado por (Castillo-Santos *et al.*, 2016) se resolvió para definir el η en cada etapa de extracción j , los valores obtenidos se muestran en la Figura 5.6. Cuando se usó HE como F a 35 y 55 °C, se obtuvo un valor de η alrededor del 95% con tres etapas, la diferencia entre ambos procesos radica en el tiempo necesario para que cada sistema alcance el equilibrio en cada etapa j (Tabla 5.5). Mientras que una etapa más debe ser necesaria para alcanzar el mismo valor de η si se utiliza HT como F a 35 °C (Figura 5.6). Por esta razón, es importante considerar estrategias para disminuir el valor de M .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

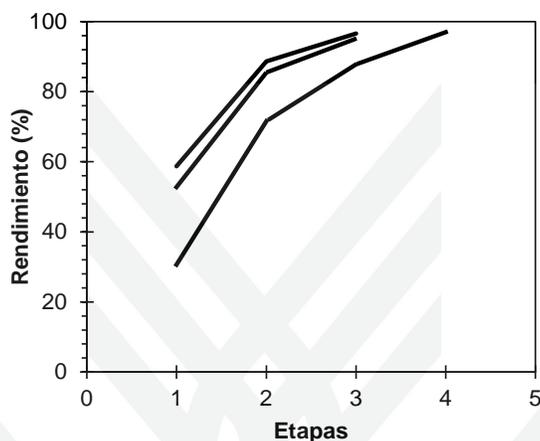


FIGURA 5.6 Simulación de extracciones por lote en etapas múltiples a contracorriente de hojas secas de moringa. Alimentación – temperatura de operación: hojas trituradas - 35 °C (—), hojas enteras - 35 °C (—) y hojas enteras - 50 °C (—). Disolvente: etanol:agua 80:20 (p/p).

5.2.4 Resultados experimentales de extracción por lote en etapas múltiples a contracorriente (EMC) de hojas de moringa

Para validar el modelo mecanicista, se decidió trabajar con HE como F a 35 y 55 °C porque sólo se necesitan 3 etapas para alcanzar el 95% de η . Los valores de S para cada etapa j se calcularon a partir del modelo mecanicista propuesto por Castillo-Santos *et al.* (2016), los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 5.6 y 5.7 para 35 y 55 °C, respectivamente. Se observó un buen ajuste entre los valores experimentales y predichos de η . De hecho, el error relativo promedio (Erp) fue inferior al 10% para ambos sistemas evaluados (Tablas 5.6 y 5.7). Como se trata de una predicción pura, es decir sin ajustes, la descripción del sistema etanol-agua-moringa se consideró aceptable utilizando el modelo desarrollado por Castillo-Santos *et al.* (2016) y los parámetros de equilibrio determinados experimentalmente en el presente trabajo para la extracción de hojas de moringa.

Tesis Doctoral

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TABLA 5.6 Variables de proceso para extracción a 35 °C por lote en etapas múltiples a contracorriente de hojas de moringa. Alimentación: 1 kg de hojas enteras. Disolvente: etanol:agua 80:20 (p/p). Concentración de extracto final $x_{E12} = 0.011$.

Etapas j	S_j (kg)	E_1 (kg)	η (%)		Erp^{**} (%)
			Predichos	Experimentales*	
1	20.0	17.00	52.77	54.26 ± 2.44 ^a	4.31
2	30.5	27.60	85.50	89.03 ± 0.68 ^b	3.96
3	33.6	30.72	95.16	98.50 ± 0.09 ^c	3.39

*Los valores son las medias ± desviaciones estándar ($n = 2$).

**Error relativo promedio.

Valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

TABLA 5.7 Variables de proceso para extracción a 55 °C por lote en etapas múltiples a contracorriente de hojas de moringa. Alimentación: 1 kg de hojas enteras. Disolvente: etanol:agua 80:20 (p/p). Concentración de extracto final $x_{E12} = 0.013$.

Etapas j	S_j (kg)	E_1 (kg)	η (%)		Erp^{**} (%)
			Predichos	Experimentales*	
1	20.0	16.98	58.73	63.61 ± 2.33 ^a	7.59
2	28.6	25.69	88.64	91.43 ± 2.24 ^b	3.01
3	30.9	27.98	96.56	97.10 ± 1.76 ^c	1.18

*Los valores son las medias ± desviaciones estándar ($n = 2$).

**Error relativo promedio.

Valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En el campo de la extracción de compuestos bioactivos, la temperatura de operación es una variable importante porque la mayoría de los componentes químicos de las plantas son sensibles al calor y la estabilidad de los compuestos bioactivos puede verse afectada (Vetal *et al.*, 2012). Por lo tanto, se decidió evaluar en cada etapa j el contenido de fenoles totales y la actividad antirradical (mediante ensayos DPPH y ABTS) en ambos sistemas (35 y 55 °C). Los resultados obtenidos mostraron que no hay evidencia estadística que indique la degradación de fenoles totales y la actividad antirradical en cada etapa a 35 o 55 °C (Tabla 5.8). Se ha reportado que un amplio rango de temperaturas de operación (35-100 °C) es adecuado para la extracción de fenoles a partir de



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

productos de origen vegetal. Sin embargo, la mayoría de los autores informan que las temperaturas entre 40 y 60 °C son las óptimas para evitar la posible degradación de compuestos fenólicos y alcanzar el máximo rendimiento (Wijngaard *et al.*, 2012). Por lo tanto, se seleccionó 55 °C como temperatura de operación y, además, el tiempo requerido por cada etapa para alcanzar el equilibrio entre ambas fases a esta temperatura es menor que el de otros sistemas evaluados (Tabla 5.5).

TABLA 5.8 Comparación del contenido de fenoles totales y la actividad antirradical en las etapas de extracción a diferentes temperaturas de operación.

Temperatura (°C)	Etapa <i>j</i>	Fenoles totales (mg EAG/g bs)	Actividad antirradical (mg ET/g bs)	
			Ensayo DPPH	Ensayo ABTS
35	1	88.12 ± 5.15 ^a	120.23 ± 7.61 ^a	116.74 ± 15.16 ^a
	2	78.61 ± 4.97 ^a	113.56 ± 1.19 ^a	106.33 ± 9.71 ^a
	3	80.93 ± 3.73 ^a	119.69 ± 6.84 ^a	105.01 ± 1.69 ^a
55	1	78.29 ± 1.79 ^a	118.54 ± 7.13 ^a	98.28 ± 4.00 ^a
	2	86.06 ± 4.96 ^a	119.23 ± 4.36 ^a	103.84 ± 4.99 ^a
	3	81.28 ± 1.41 ^a	118.80 ± 1.67 ^a	100.29 ± 3.64 ^a

Los valores son las medias ± desviaciones estándar ($n = 3$).

En la misma columna, valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Alimentación: hojas enteras de moringa. Disolvente: etanol:agua 80:20 (p/p).

TABLA 5.9 Comparación de las variables evaluadas a diferentes tiempos de contacto durante la extracción Soxhlet de hojas de moringa.

Tiempo (h)	η (%)	Fenoles totales (mg EAG/g bs)	Actividad antirradical (mg ET/g bs)	
			Ensayo DPPH	Ensayo ABTS
2	74.40 ± 0.85 ^c	129.25 ± 5.20 ^a	121.67 ± 3.73 ^a	125.99 ± 1.37 ^a
3	90.05 ± 0.33 ^b	133.69 ± 0.52 ^a	114.76 ± 1.06 ^a	124.96 ± 6.43 ^a
4	95.65 ± 0.17 ^a	139.03 ± 5.84 ^a	96.01 ± 3.95 ^b	97.57 ± 8.35 ^b

Los valores son las medias ± desviaciones estándar ($n = 3$).

En la misma columna, valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Alimentación: hojas enteras de moringa. Disolvente: etanol:agua 80:20 (p/p). Temperatura de operación: 81 °C.



5.2.5 Extracción Soxhlet (ES) de hojas de moringa

La extracción de compuestos bioactivos a partir de materiales vegetales puede realizarse mediante diversos procedimientos de extracción, pero en un número sustancial de informes científicos, la ES todavía se considera como uno de los métodos de referencia para comparar la eficacia de metodología recientemente desarrollada (Luque de Castro y García-Ayuso, 1998; Wang y Weller, 2006; Azmir *et al.*, 2013). En el presente trabajo, se decidió evaluar el efecto de la ES a diferentes tiempos de contacto sobre el η , el contenido de fenoles totales y la actividad antirradical (ensayos DPPH y ABTS) de extractos de HE usando etanol al 80% (p/p) en agua como disolvente. Basado en los resultados obtenidos con ES, el η de extracción fue mayor ($95.65 \pm 0.17\%$) con una operación de 4 h (Tabla 5.9), por lo que para la extracción exhaustiva puede ser necesario sólo 5 h, y no una operación de 20 h como informó Vongsak *et al.* (2013). Estos autores obtuvieron valores de rendimiento de 34 a 36% (% de peso seco) usando etanol al 50 y 70% en agua como disolvente (Tabla 2.2). Es importante señalar que estos valores de rendimiento son similares a x_{F_2} obtenidos en el presente trabajo (Tabla 5.4), por lo que pueden corresponder a una extracción exhaustiva obtenida por ES de sus muestras de moringa.

El contenido de fenoles totales fue similar en cada tiempo de contacto evaluado durante ES. Sin embargo, la actividad antirradical disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en la operación de 4 h (Tabla 5.9). Estos resultados sugieren una degradación de compuestos bioactivos con actividad antirradical en el extracto. Cabe señalar que la ES sólo funciona en los puntos de ebullición de los disolventes, y la temperatura alcanzada en el presente trabajo fue de 81 °C. Por lo tanto, los sólidos extraíbles permanecieron en el matraz receptor a esta temperatura. Es posible que tiempos de operación más largos en ES permitan una extracción más completa del material vegetal, pero no se puede ignorar la descomposición térmica de los compuestos bioactivos (Luque de Castro y García-Ayuso, 1998; Wang y Weller, 2006). Para asegurar un alto rendimiento ($90.05 \pm 0.33\%$) sin disminuir la actividad antirradical de los extractos de moringa, una ES de 3 h es suficiente bajo las condiciones estudiadas en el presente trabajo (Tabla 5.9).

5.2.6 Extracción asistida por ultrasonido (EAU) de hojas de moringa

Con respecto a tecnologías emergentes, hay varios trabajos que utilizan la EAU para la extracción de compuestos bioactivos a partir de materiales vegetales (Vinatoru, 2001; Wijngaard *et al.*, 2012; Azmir *et al.*, 2013), habiéndose utilizado como una alternativa a la maceración convencional y la extracción Soxhlet (Wang y Weller, 2006; Ahmad-Qasem *et al.*, 2013). En el presente trabajo, se estudió el efecto de la EAU a 55 °C sobre el η , el contenido de fenoles totales y la actividad antirradical (ensayos DPPH y ABTS) de extractos de HE de moringa usando etanol:agua 80:20 (p/p)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

como S . La relación de alimentación:disolvente se investigó en el rango de 0.02-0.04 g/g. En general, antes de alcanzar el equilibrio entre ambas fases, el rendimiento de extracción incrementa al aumentar el tiempo de extracción. Los resultados mostraron que el rendimiento no es significativamente diferente ($p < 0.05$) a través del tiempo (20-60 min) para cada relación evaluada (Tabla 5.10). Esto sugiere que la EAU permite la extracción eficiente de sólidos de HE desde los primeros minutos, de hecho después de 30 min, el rendimiento de extracción aumentó lentamente en las condiciones evaluadas (Tabla 5.10). Dong *et al.* (2010) y Zhao *et al.* (2007) obtuvieron resultados similares y sostienen que el rendimiento de extracción aumenta rápidamente dentro de los primeros 25-30 min.

Junto con el aumento del tiempo de extracción, todas las células de la planta están completamente agrietadas por efecto de la cavitación acústica, por lo que algunas impurezas como sustancias insolubles o inertes pueden transferirse al extracto (Dong *et al.*, 2010) y consecuentemente pueden ser una fracción importante de los sólidos transferidos al extracto. Esto puede explicar la disminución del contenido de fenoles totales observado en todas las relaciones evaluadas (Tabla 5.10), es decir, probablemente se esté produciendo un efecto de dilución debido a la presencia significativa de otros sólidos.

También se observó una disminución de la actividad antirradical durante el tiempo de extracción. Annegowda *et al.* (2010) evaluaron la influencia de la EAU sobre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de extractos de *Terminalia catappa* L. y reportaron un comportamiento similar. Los resultados pueden estar relacionados con la degradación de compuestos bioactivos capaces de eliminar radicales libres, causados por el tiempo prolongado de exposición a ondas de ultrasonido (Wang *et al.*, 2008). Por lo tanto, no es necesario un mayor tiempo de extracción después de alcanzar el máximo rendimiento de extracción o el tiempo de equilibrio entre ambas fases.

Bajo las condiciones evaluadas, 30 min es el tiempo suficiente para la extracción de fenoles de HE de moringa con actividad antirradical significativa para todas las relaciones evaluadas. Como se muestra en la Tabla 5.10, a los 30 min se promovió el rendimiento de extracción cuando la relación de alimentación:disolvente se redujo de 0.04 a 0.03 g/g, pero no hay evidencia estadística que indique una diferencia entre el rendimiento obtenido por las relaciones 0.03 y 0.02 g/g. Como la cantidad de disolvente es menor con la proporción de 0.03 (g de hojas de moringa)/(g de disolvente), esta relación se seleccionó para obtener el mayor rendimiento de extracción mediante EAU.

Tesis Doctoral



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TABLA 5.10 Comparación de las variables evaluadas a diferentes tiempos de contacto durante la extracción asistida por ultrasonido de hojas de moringa.

(g alimentación)/ (g disolvente)	Tiempo (min)	η (%)	Fenoles totales (mg EAG/g bs)	Actividad antirradical (mg ET/g bs)	
				Ensayo DPPH	Ensayo ABTS
0.02	5	37.38 ± 0.72 ^h	164.41 ± 2.74 ^{ab}	149.10 ± 4.34 ^{bc}	125.97 ± 1.47 ^b
	10	64.01 ± 6.36 ^g	136.16 ± 1.76 ^{cdefgh}	133.17 ± 1.22 ^{cde}	101.92 ± 7.40 ^{cd}
	20	79.76 ± 2.48 ^{bcd}	139.21 ± 1.92 ^{cdefg}	137.71 ± 8.66 ^{cde}	97.37 ± 8.67 ^{cde}
	30	87.42 ± 0.34 ^{abcd}	132.75 ± 8.14 ^{cdefgh}	135.84 ± 1.22 ^{cde}	85.27 ± 1.56 ^{efgh}
	40	87.28 ± 0.64 ^{abcd}	144.38 ± 3.23 ^{cde}	134.28 ± 4.47 ^{cde}	73.75 ± 1.65 ^h
	50	89.76 ± 2.85 ^{ab}	132.12 ± 8.09 ^{defgh}	146.00 ± 4.20 ^{bcd}	74.15 ± 2.12 ^h
	60	92.36 ± 1.13 ^a	111.98 ± 7.54 ⁱ	136.48 ± 2.35 ^{cde}	71.16 ± 1.56 ^{hi}
0.03	5	35.95 ± 1.67 ^h	182.12 ± 1.42 ^a	185.78 ± 7.39 ^a	141.85 ± 1.89 ^a
	10	66.41 ± 0.67 ^{fg}	146.45 ± 3.66 ^{bcd}	165.94 ± 0.32 ^{ab}	93.83 ± 2.30 ^{cdef}
	20	75.49 ± 4.21 ^{cdefg}	137.15 ± 4.19 ^{cdefgh}	118.55 ± 3.59 ^{efg}	90.57 ± 1.88 ^{defg}
	30	80.25 ± 1.27 ^{abcde}	140.64 ± 6.19 ^{cdef}	105.02 ± 5.17 ^{ghi}	79.37 ± 5.74 ^{fgh}
	40	82.65 ± 1.22 ^{abcde}	138.71 ± 7.58 ^{cdefg}	100.99 ± 5.57 ^{ghij}	78.52 ± 2.27 ^{fgh}
	50	82.83 ± 0.75 ^{abcde}	128.63 ± 3.41 ^{defghi}	128.77 ± 2.49 ^{def}	79.48 ± 1.06 ^{fgh}
	60	87.70 ± 3.36 ^{abc}	144.36 ± 5.61 ^{cde}	130.74 ± 3.11 ^{cdef}	77.36 ± 1.12 ^{gh}
0.04	5	37.95 ± 7.57 ^h	150.63 ± 3.74 ^{bc}	112.62 ± 3.23 ^{fgh}	106.22 ± 6.49 ^c
	10	65.16 ± 1.27 ^{fg}	130.74 ± 1.66 ^{defgh}	83.00 ± 7.84 ^{jk}	73.73 ± 7.87 ^h
	20	71.67 ± 0.71 ^{efg}	124.82 ± 3.83 ^{fghi}	89.85 ± 5.12 ^{ijk}	56.45 ± 0.77 ^{ij}
	30	72.68 ± 4.65 ^{efg}	126.89 ± 1.74 ^{efghi}	89.37 ± 9.13 ^{ijk}	54.57 ± 1.61 ^j
	40	74.66 ± 1.88 ^{efg}	121.28 ± 0.83 ^{ghi}	86.29 ± 7.25 ^{ijk}	53.17 ± 1.47 ^j
	50	76.46 ± 3.04 ^{cdef}	119.53 ± 2.39 ^{hi}	80.35 ± 1.66 ^k	53.62 ± 0.71 ^j
	60	75.09 ± 3.14 ^{defg}	122.05 ± 3.10 ^{ghi}	92.49 ± 1.98 ^{hijk}	56.13 ± 0.52 ^{ij}

Los valores son las medias ± desviaciones estándar ($n = 2$).

En la misma columna, valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Alimentación: hojas enteras de moringa. Disolvente: etanol:agua 80:20 (p/p). Temperatura de operación: 55 °C.

5.2.7 Comparación entre los métodos de extracción evaluados

Un estudio de comparación entre diferentes métodos de extracción es especialmente importante para la determinación de la eficiencia de extracción de soluto a partir de matrices complejas tales como los materiales vegetales. En este trabajo, la comparación se realizó entre la extracción Soxhlet (ES), la extracción asistida por ultrasonido (EAU) y la extracción en etapas múltiples a contracorriente (EMC). Hay diferentes variables involucradas en cada método evaluado; por ello no se puede hacer una comparación directa entre los métodos. Por lo tanto, se decidió realizar la comparación basándose en la relación (g alimentación)/(g disolvente), tiempo de extracción,



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

rendimientos, x_{E_2} , contenido de fenoles totales y la actividad antirradical (ensayos DPPH y ABTS) como se muestra en la Tabla 5.11. Basado en los resultados obtenidos, fue mayor la recuperación de fenoles totales y la actividad antirradical con la ES, pero las desventajas de la ES incluyen el alto consumo de disolvente, el prolongado tiempo de extracción y la elevada temperatura de operación en comparación con los otros métodos evaluados (Tabla 5.11).

TABLA 5.11 Comparación de los diferentes métodos de extracción de hojas de moringa.

Método de extracción	EMC ^{1*}	ES ²	EAU ³
Temperatura de operación (°C)	55	81	55
(g alimentación)/(g disolvente)	0.03	0.01	0.03
Tiempo de contacto (min)	120	180	30
x_{E_2} (%)	1.40 ± 0.01 ^a	0.56 ± 0.07 ^b	1.34 ± 0.07 ^a
η (%)	97.10 ± 1.76 ^a	90.05 ± 0.33 ^b	80.25 ± 1.27 ^c
Fenoles totales (mg EAG/g bs)	81.28 ± 1.41 ^b	133.69 ± 0.52 ^a	140.64 ± 6.19 ^a
Actividad antirradical (mg ET/g bs)	Ensayo DPPH	118.80 ± 1.67 ^a	105.02 ± 5.17 ^b
	Ensayo ABTS	100.29 ± 3.64 ^b	124.96 ± 6.43 ^a

¹Extracción por lote en etapas múltiples a contracorriente. ²Extracción Soxhlet. ³Extracción asistida por ultrasonido. *Condiciones de operación correspondientes a las etapas de extracción en régimen semi-continuo. En la misma columna, valores que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Alimentación: hojas enteras de moringa. Disolvente: etanol:agua 80:20 (p/p).

La EAU proporciona un contenido de fenoles totales similar a lo obtenido por ES y un tiempo de extracción más corto, alcanzando un rendimiento de 80.25 ± 1.27% con EAU en sólo 30 min de tiempo de contacto (Tabla 5.11). Sin embargo, los resultados indican que el uso de EAU conduce a una disminución significativa de la actividad antirradical del extracto de moringa en comparación con ES y EMC, aunque fue operado a 55 °C que es menor a la temperatura de operación de ES. Esto puede explicarse por el hecho de que las ondas de ultrasonido pueden inducir la formación de radicales libres en el medio líquido y favorecer las reacciones de polimerización/despolimerización, provocando la oxidación y degradación de compuestos bioactivos (M'hiri *et al.*, 2015). Además, la EAU involucra un alto coste energético y de escalamiento. Estos criterios dan como resultado la limitada aplicación industrial y comercial de la EAU en la industria herbolaria (Wang *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2012). Para evitar estas desventajas, se propuso el uso de EMC para la extracción de compuestos bioactivos a partir de hojas de moringa en el presente trabajo. Como se muestra en la Tabla 5.11, el contenido de fenoles totales fue menor que los otros métodos de extracción evaluados cuando se usó



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EMC, pero los resultados demostraron que la EMC podría producir un extracto de moringa con mayor x_{E_2} y la misma actividad antirradical que los extractos obtenidos por ES y alcanzar el mayor rendimiento del proceso. Lo que significa un ahorro considerable en cantidad de disolvente, en costos por consumo de energía y tiempo de operación.

Las condiciones de extracción óptimas para EMC de hojas de moringa y con las cuales se obtuvieron los extractos para la siguiente etapa del proyecto fueron: una alimentación como hojas secas enteras para disminuir la solución retenida, temperatura de extracción de 55 °C, un tiempo de extracción de 120 min por cada etapa de extracción y relación de (g alimentación)/(g disolvente) de 0.03 g/g cuando se ha alcanzado el régimen semi-continuo. Las relaciones (g alimentación)/(g disolvente) para las etapas de acondicionamiento (Figura 4.2) se muestran en la Tabla 5.7.

5.3 Secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos etanólicos de moringa

Se preparó mayor cantidad de extracto etanólico de moringa bajo las condiciones de extracción seleccionadas en la sección anterior. A fin de evitar la pérdida de compuestos bioactivos, la etapa de evaporación del disolvente orgánico de los extractos de moringa no se llevó a cabo antes del proceso de secado por aspersión. En este trabajo, se estudió el secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado (SACC) para obtener partículas secas de extractos etanólicos de moringa. Los valores de las condiciones de las variables de operación para cada experimento de SACC se enumeran en la Tabla 5.12. Se calcularon los coeficientes de regresión (β_{ij}) del modelo propuesto (Ecuación (4.19)) para cada variable de respuesta (y_i) (Tablas 5.15) y se determinaron las condiciones estudiadas de SACC que afectaron significativamente ($p < 0.05$) a las variables de respuesta (Tabla 5.14). Para visualizar los efectos combinados de las variables de proceso estudiadas sobre las respuestas, se generaron las superficies de respuesta para cada uno de los modelos ajustados como la función de dos variables independientes: temperatura de entrada del nitrógeno (T_{ent}) y temperatura de salida del nitrógeno (T_{sal}). En el mismo gráfico se generó una superficie de respuesta por cada concentración de material de soporte (MS) utilizada en la mezcla de alimentación (Figuras 5.9-5.11). Los efectos de las condiciones estudiadas de SACC sobre las variables de respuesta se discutieron mediante la evaluación de estas gráficas y el análisis estadístico.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TABLA 5.12 Condiciones experimentales del secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos etanólicos de moringa.

Número de tratamiento	Tent (°C) ^a	Tsal (°C) ^b	g MS/g SE ^c
1	150	70	4
2	150	70	3
3	150	70	2
4	150	60	4
5	150	60	3
6	150	60	2
7	150	50	4
8	150	50	3
9	150	50	2
10	140	70	4
11	140	70	3
12	140	70	2
13	140	60	4
14	140	60	3
15	140	60	2
16	140	50	4
17	140	50	3
18	140	50	2
19	130	70	4
20	130	70	3
21	130	70	2
22	130	60	4
23	130	60	3
24	130	60	2
25	130	50	4
26	130	50	3
27	130	50	2

^aTemperatura de entrada del nitrógeno. ^bTemperatura de salida del nitrógeno. ^cg de material de soporte por g de sólidos de extracto.

Tesis Doctoral



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TABLA 5.13 Coeficientes de regresión para cada variable de respuesta evaluada durante el secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos etanólicos de moringa.

CR*	Rendimiento del proceso	Retención de quercetina-3-rutinósido	Retención de kaempferol-3-glucósido
β_{i0}	55.57	75.04	69.76
β_{i1}	-1.39	-3.23	-2.98
β_{i2}	1.03	1.20	1.23
β_{i3}	1.53	7.42	6.80
β_{i12}	1.82	2.75	2.52
β_{i13}	0.49	1.87	1.58
β_{i23}	0.56	-0.68	-0.61
β_{i11}	-0.96	-3.50	-3.76
β_{i22}	-5.92	-11.70	-11.29
β_{i33}	-2.33	-2.19	-2.04

*CR: coeficiente de regresión del modelo propuesto (Ecuación (4.19)). β_{ij} : es el CR que relaciona el factor j con cada respuesta i ($j = 1$: Tent; 2 : Tsal; 3 : g de MS por g de SE).

TABLA 5.14 Valores de p de las variables independientes evaluadas durante el secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos etanólicos de moringa.

Variable independiente	Valores de p		
	Rendimiento del proceso	Retención de quercetina-3-rutinósido	Retención de kaempferol-3-glucósido
Temperatura de entrada del nitrógeno	< 0.001	< 0.001	0.003
Temperatura de salida del nitrógeno	< 0.001	< 0.001	< 0.001
g de material de soporte por g de sólidos de extracto	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Los términos se consideraron estadísticamente significantes en los valores de p inferiores al 5% ($p < 0.05$).



5.3.1 Rendimiento del proceso de secado por aspersión de extractos etanólicos de moringa

Las partículas secas de extractos de moringa se recuperaron del contenedor ubicado al final del ciclón y se descartaron las partículas depositadas en la cámara de secado y las paredes del ciclón. Cuando no se añadió material de soporte en la alimentación, el secado por aspersión de los extractos etanólicos de moringa no fue viable, debido a que las partículas producidas eran muy pegajosas y se depositaron en las paredes de la cámara de secado y mayoritariamente en el ciclón, por lo cual no pudieron recuperarse. Este fenómeno ha sido reportado por otros autores y se asocia al bajo peso molecular de los compuestos presentes en los extractos vegetales (Jäger y Kilbride, 1997; Souza y Oliveira, 2006; Sollohub y Cal, 2010; Karaaslan y Dalgıç, 2012), por esta razón se emplean materiales de soporte como coadyuvantes del secado.

La cantidad de material de soporte en la mezcla de alimentación mostró un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el rendimiento del proceso (Tabla 5.14): se observó un aumento en el rendimiento cuando la relación MS/SE se incrementó de 2 a 3 g/g, sin un aumento evidente del rendimiento cuando se incrementó de 3 a 4 g/g (Figura 5.7). Los menores rendimientos obtenidos cuando se ocupó una relación de MS/SE de 2 g/g se asocia a una disminución en el contenido de sólidos en la mezcla de alimentación (Şahin-Nadeem *et al.*, 2013; Rajabi *et al.*, 2015; Nambiar *et al.*, 2017). Se reporta que el tamaño de las gotas producidas son mayores conforme se disminuye la cantidad de material de soporte, en consecuencia la cohesión entre partículas se incrementa y terminan impactándose contra las paredes de la cámara de secado (Nambiar *et al.*, 2017). La pérdida de producto también se asocia a la naturaleza físico-química del producto a secar. Bajas cantidades de material de soporte pueden ser insuficientes para evitar que los compuestos de bajo peso molecular presentes en el extracto formen productos gomosos, los cuales se acumulan en las paredes del ciclón (Souza y Oliveira, 2006; Fernandes *et al.*, 2012). El incremento en el contenido de sólidos en la alimentación implica una menor cantidad de fase líquida a evaporar y una mayor eficiencia en la encapsulación de los compuestos de bajo peso molecular, lo que conduce a un mayor rendimiento del proceso de secado por aspersión (Fernandes *et al.*, 2012; Nambiar *et al.*, 2017), sin embargo, aumentar la cantidad de material de soporte más allá del nivel óptimo causa una disminución en el rendimiento debido a las dificultades de alimentación y de formación de gotas (Nambiar *et al.*, 2017), como ocurrió en este trabajo al emplear la relación de MS/SE de 4 g/g. Rajabi *et al.* (2015) también observaron una disminución en el rendimiento del proceso con el incremento de la cantidad de sólidos en la alimentación. En nuestro caso particular, el manejo de disolvente orgánico limita la selección y adición de materiales de soporte, que en su mayoría se encuentran comercialmente disponibles como materiales hidrosolubles. Cuando la relación de MS/SE se incrementó de 3 a 4 g/g, el manejo de la mezcla de alimentación representó un problema técnico debido a dos causas: mayor precipitación de los sólidos de material de soporte y adherencia de sólidos a las paredes del contenedor de la mezcla

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de alimentación. Materiales de soporte porosos y/o de bajo tamaño de partícula, como la sílice precipitada, podrían representar una opción para estos sistemas, debido a que presentan una mejor dispersión en disolventes orgánicos y una reducción en las interacciones entre las partículas en comparación con las partículas no porosas (Müller *et al.*, 2008; Ógáin *et al.*, 2012; Evonik, 2015). En el presente trabajo se propuso la mezcla 95:5 (p/p) de (maltodextrina DE-10):(sílice precipitada) como material de soporte, esperando incrementar el rendimiento del proceso con la adición de sílice precipitada, sin embargo, los resultados obtenidos están en el orden de magnitud reportado por Vázquez (2013) cuando se empleó maltodextrina DE-10 como material de soporte. El diseño y/o formulación de materiales de soporte que puedan añadirse sin dificultad a extractos orgánicos representa un nicho de oportunidad.

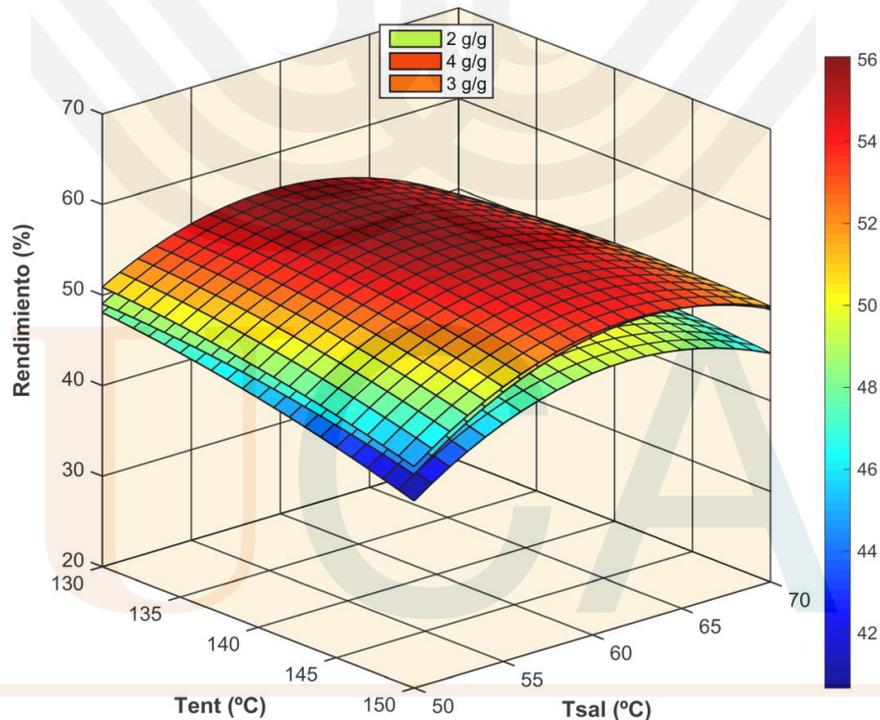


FIGURA 5.7 Secado por aspersión en ciclo cerrado de extractos etanólicos de moringa: efecto de las variables independientes sobre el rendimiento del proceso. Relaciones evaluadas de material de soporte/sólidos de extracto: 2, 3 y 4 g/g.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis estadístico de los datos indicó que las Tent y las Tsal evaluadas mostraron efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el rendimiento del proceso (Tabla 5.14). Se observó un incremento en el rendimiento del proceso cuando la Tsal aumentó de 50 a 60 °C y una disminución cuando la Tsal se ajustó a 70 °C (Figura 5.7). A medida que se incrementa la Tent o la Tsal, la humedad del producto final disminuye, reduciéndose la posibilidad de deposiciones en las paredes del secador. Sin embargo, la deposición de partículas gomosas también es impulsada por el calentamiento de las paredes del ciclón (Woo *et al.*, 2007), como claramente se observó en el presente trabajo al incrementar la Tsal de 60 a 70 °C en todas las Tent evaluadas (Figura 5.7). Se considera que un rendimiento $\geq 50\%$ es un criterio para definir un proceso eficiente de secado por aspersion (Bhandari *et al.*, 1997; Fang y Bhandari, 2011). Por lo tanto, los rendimientos obtenidos en este trabajo con las relaciones MS/SE de 3 y 4 g/g pueden considerarse satisfactorios, excepto los tratamientos con diferenciales amplios entre la Tent y Tsal (ΔT : 100 °C; Tent: 150 °C; Tsal: 50 °C) (Figura 5.7). En este caso, la pérdida de material se atribuye principalmente a la formación de depósitos en las paredes de la cámara de secado, causados por gotas que no están lo suficientemente secas y que en consecuencia se impactan sobre las paredes del equipo, esto ocurre debido a que bajo estas condiciones de ΔT se requieren flujos de alimentación elevados para fijar la Tsal de operación (Şahin-Nadeem *et al.*, 2013). La disminución del rendimiento del proceso al aumentar el ΔT también fue reportada por Şahin *et al.* (2011).

5.3.2 Retención de compuestos fenólicos de referencia durante el secado por aspersion de extractos etanólicos de moringa

La presencia de los compuestos seleccionados como referencias en este trabajo han sido reportados previamente en hojas de moringa y están asociados con propiedades antioxidantes, hipoglucemiantes, hipotensoras, antidislipidémicas, anticancerígenas y antiinflamatorias (Verma *et al.*, 2009; Vongsak *et al.*, 2013; Yassa y Tohamy, 2014; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2015). Por lo tanto, es deseable que se reduzca la degradación de estos compuestos durante el secado por aspersion a fin de preservar la actividad biológica de los extractos secos de moringa. La Figura 5.8 muestra un ejemplo de cromatograma UHPLC de extracto seco de moringa. Los componentes bioactivos de referencia se identificaron por medio del tiempo de retención y los espectros UV del estándar puro respectivo (quercetina-3-rutinósido y kaempferol-3-glucósido). Los espectros UV de los compuestos de referencia coincidieron con el respectivo espectro UV del compuesto estándar (Figura 5.9).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

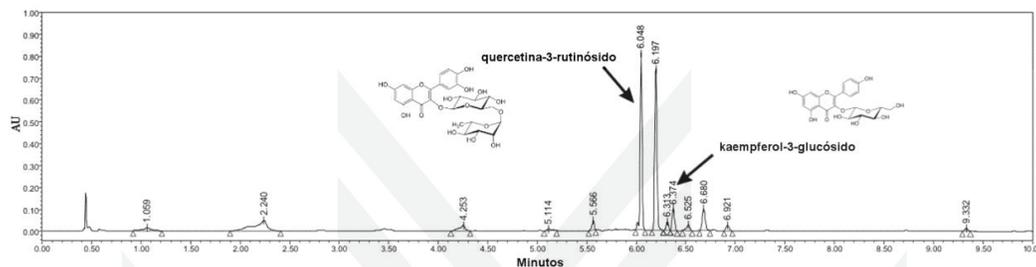


FIGURA 5.8 Cromatograma UHPLC de extracto seco de moringa usando 3 g de material de soporte por cada g de sólidos de extracto.

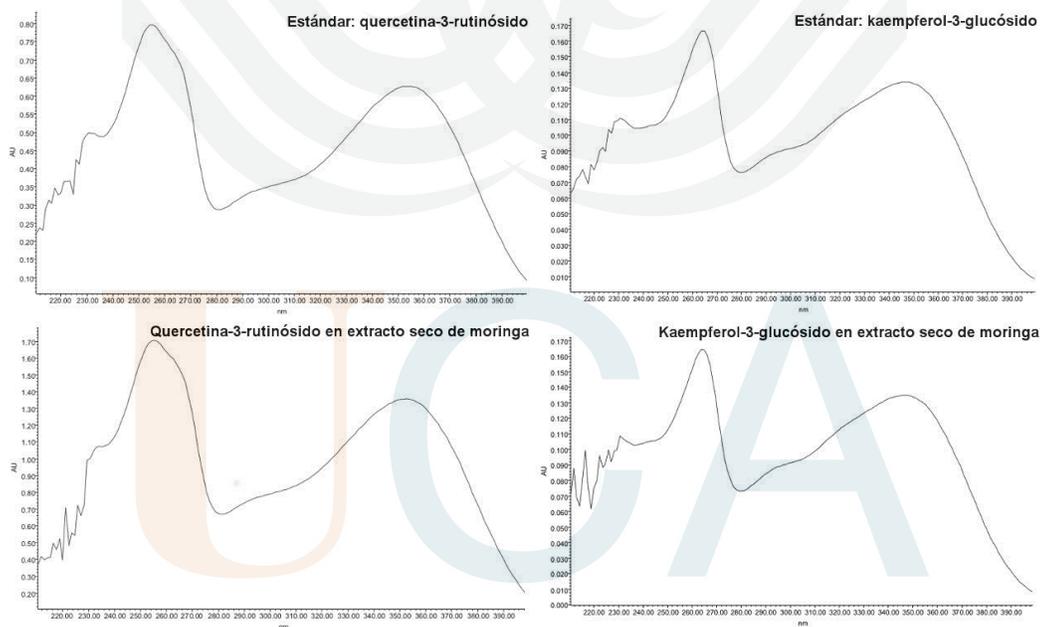


FIGURA 5.9 Espectros UV de kaempferol-3-glucósido y quercetina-3-rutinósido obtenidos a partir de extracto seco de moringa y de estándares puros.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las retenciones de quercetina-3-rutinósido y kaempferol-3-glucósido se vieron afectadas significativamente ($p < 0.05$) por las variables independientes evaluadas (Tabla 5.14). El valor del coeficiente de regresión asociado a la cantidad de material de soporte adicionado explica en mayor medida el comportamiento de estas variables de respuesta (Tabla 5.13). El efecto de la cantidad de material de soporte en la mezcla de alimentación ha recibido una considerable atención por parte de numerosos autores (Kha *et al.*, 2010; Fazaeli *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2012; Pang *et al.*, 2014). Además de aumentar el rendimiento del proceso, los materiales de soporte utilizados en secado por aspersión pueden cumplir con una función protectora para los compuestos bioactivos (Fazaeli *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el incremento de cantidad de material de soporte en la mezcla de alimentación aumenta la retención de los compuestos fenólicos de referencia (Figuras 5.10 y 5.11). Este fenómeno está asociado principalmente a que entre mayor sea el contenido de material de soporte, más rápida y eficientemente se formará una pared alrededor del compuesto bioactivo, protegiendo a éste del daño térmico (Reineccius, 2004; Fernandes *et al.*, 2012).

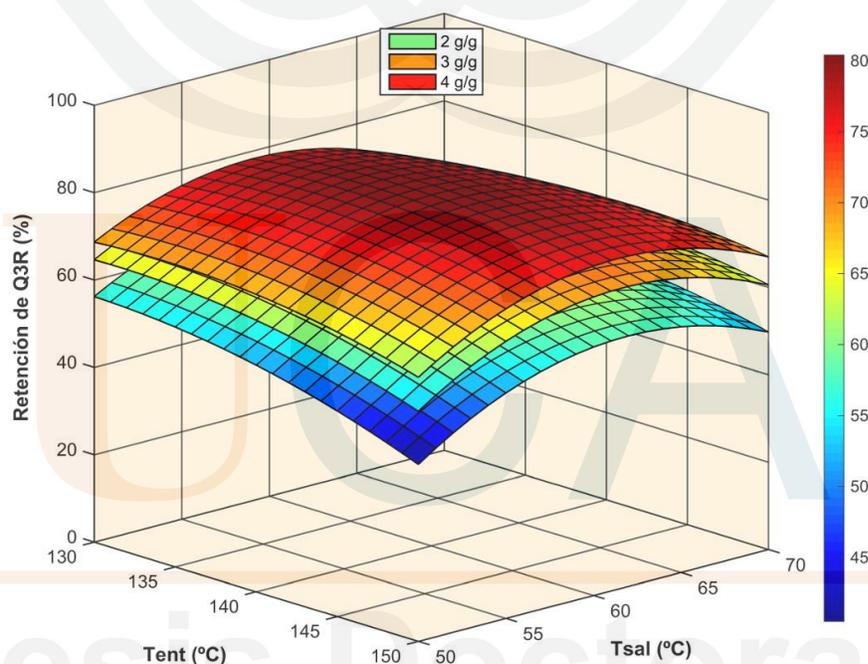


FIGURA 5.10 Retención de quercetina-3-rutinósido (Q3R) durante el secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos etanólicos de moringa. Relaciones evaluadas de material de soporte/sólidos de extracto: 2, 3 y 4 g/g.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

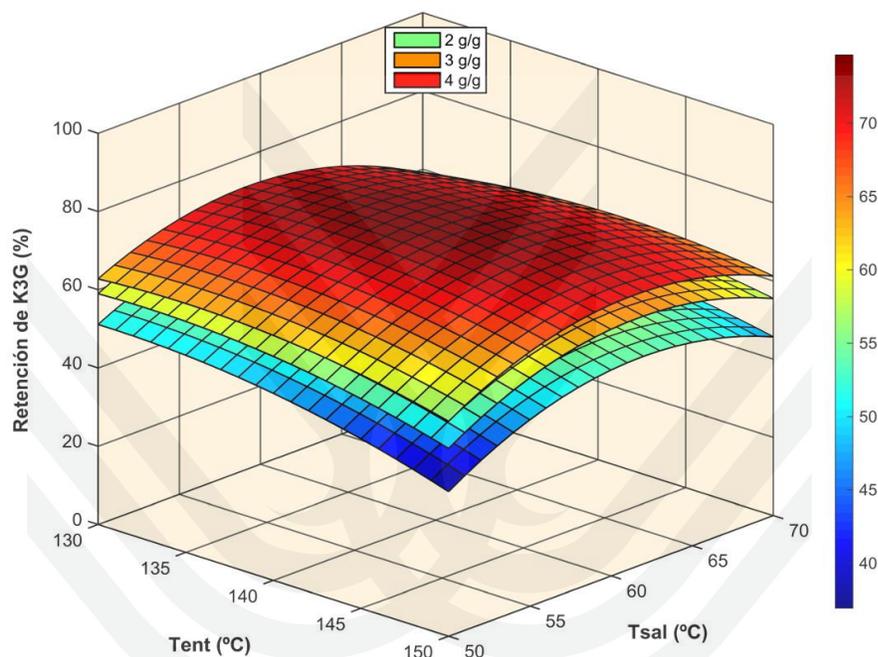


FIGURA 5.11 Retención de kaempferol-3-glucósido (K3G) durante el secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos etanólicos de moringa. Relaciones evaluadas de material de soporte/sólidos de extracto: 2, 3 y 4 g/g.

El aumento de la Tent de 60 a 70 °C redujo la retención de los compuestos de referencia (Figuras 5.10 y 5.11), esto sugiere una posible degradación térmica de los compuestos fenólicos. Georgetti *et al.* (2008) obtuvieron resultados similares con aire como gas de secado, los autores discuten que la degradación de los compuestos fenólicos bajo estas condiciones puede estar asociada a reacciones de oxidación inducidas por el calor. La degradación por disponibilidad de oxígeno se descarta en este trabajo porque el secado por aspersión de los extractos etanólicos de moringa se realizó bajo atmósfera inerte: el nitrógeno se usó como gas de secado.

El valor del coeficiente de regresión asociado a la Tent indica un efecto negativo de esta variable independiente sobre la retención de los compuestos de referencia (Tabla 5.13). Es decir, conforme se aumentó la Tent se disminuyó la retención de quercetina-3-rutinósido y kaempferol-3-glucósido. Esto está asociado al rendimiento del proceso, debido a que a Tent de 150 °C precisamente se obtienen los rendimientos más bajos, lo cual condiciona la probabilidad de perder compuestos bioactivos por incrustación de producto en las paredes del secador.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4 Representación dinámica del secado por aspersion con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos etanólicos de moringa

Para representar la dinámica del secado por aspersion con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos etanólicos de moringa se resolvió el modelo propuesto por Aguirre-Alonso (2016). Se tomaron como valores iniciales de las variables de estado los correspondientes al conjunto experimental desarrollado en el presente trabajo. El secador por aspersion en ciclo cerrado se hizo funcionar hasta que se alcanzó el estado estacionario. En total se desarrollaron experimentalmente 27 conjuntos de dinámicas de secado por duplicado bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 5.15.

TABLA 5.15 Variables de estado estables para el funcionamiento del secador por aspersion en ciclo cerrado.

Número de tratamiento	$X_{w\beta 0}$ (kg·kg ⁻¹)	$X_{e\beta 0}$ (kg·kg ⁻¹)	G_{β} (kg·s ⁻¹)	Tent (°C)	Tsal (°C)
1	8.03	11.28	1.09E-05	150	70
2	9.98	14.01	8.45E-06	150	70
3	13.31	18.69	6.44E-06	150	70
4	8.03	11.28	1.49E-05	150	60
5	9.98	14.01	1.21E-05	150	60
6	13.31	18.69	8.59E-06	150	60
7	8.03	11.28	1.82E-05	150	50
8	9.98	14.01	1.47E-05	150	50
9	13.31	18.69	1.10E-05	150	50
10	8.03	11.28	9.00E-06	140	70
11	9.98	14.01	7.51E-06	140	70
12	13.31	18.69	5.63E-06	140	70
13	8.03	11.28	1.39E-05	140	60
14	9.98	14.01	1.06E-05	140	60
15	13.31	18.69	7.94E-06	140	60
16	8.03	11.28	1.66E-05	140	50
17	9.98	14.01	1.33E-05	140	50
18	13.31	18.69	1.07E-05	140	50
19	8.03	11.28	6.53E-06	130	70
20	9.98	14.01	4.50E-06	130	70
21	13.31	18.69	3.82E-06	130	70
22	8.03	11.28	1.07E-05	130	60
23	9.98	14.01	8.78E-06	130	60
24	13.31	18.69	6.58E-06	130	60
25	8.03	11.28	1.47E-05	130	50
26	9.98	14.01	1.18E-05	130	50
27	13.31	18.69	8.85E-06	130	50

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1 Comportamiento dinámico de la temperatura de salida de la fase continua usando las variables del conjunto experimental a diferentes ε y G_γ

El valor de ε describe la fracción de la fase continua ocupada en la cámara de secado, sin embargo, las trayectorias de las gotas dentro del secador no se conocen. Por esta razón se decidió estimar el valor de ε que representara la dinámica del secado por aspersión de extractos etanólicos de moringa. Para ello se resolvió el modelo de Aguirre-Alonso (2016) a diferentes valores de ε y bajo las variables de estado iniciales de la Tabla 5.15. El valor de G_γ se fijó a $0.0135 \text{ kg}\cdot\text{s}^{-1}$ según lo reportado por Aguirre-Alonso (2016). La Figura 5.12 muestra la dinámica experimental y simulada del secado por aspersión en función de la T_{sal} de la fase continua a diferentes ε .

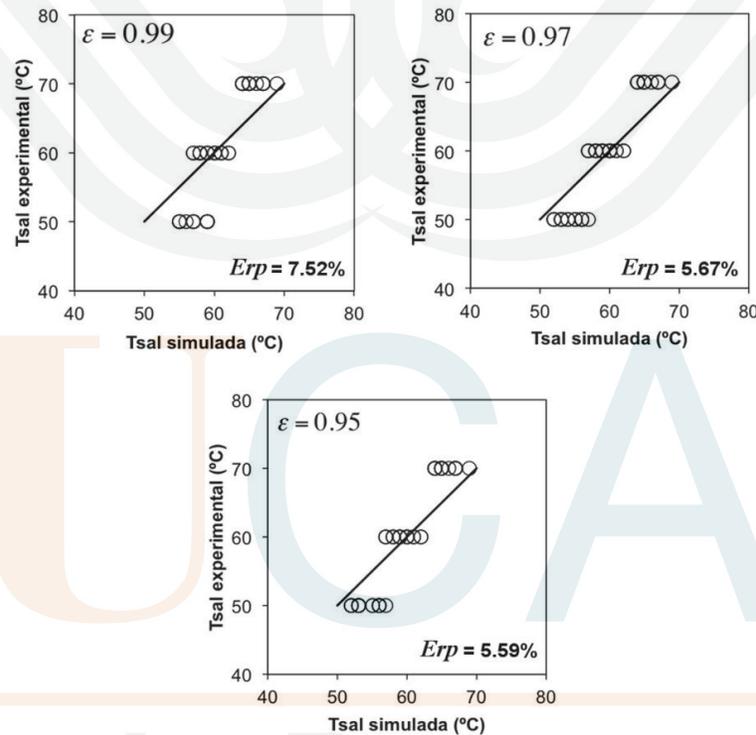


FIGURA 5.12 Valores experimentales versus simulados de la temperatura de salida de la fase continua a diferentes ε . Variables de estado iniciales: Tabla 5.15. $G_\gamma = 0.0135 \text{ kg}\cdot\text{s}^{-1}$. Erp : error relativo promedio. La línea continua representa un ajuste exacto entre los valores simulados y experimentales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultó evidente el efecto del valor de ε sobre el comportamiento dinámico de la Tsal, sobre todo a 50 °C (Figura 5.12). Examinando la Figura 5.12 se puede concluir que la dinámica simulada con un valor de $\varepsilon = 0.95$ reproduce la dinámica experimental del secado por aspersión de extractos de moringa, con un error relativo promedio (Erp) de 5.59% en función del valor de la Tsal. El valor de ε de 0.95 nos indica que aproximadamente el 5% de la cámara de secado fue ocupado por la fase dispersa.

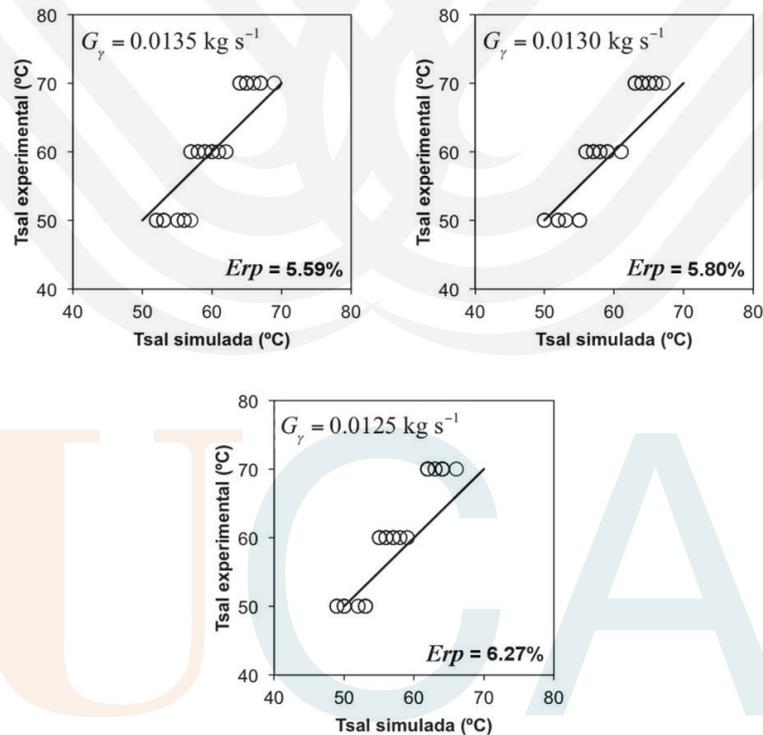


FIGURA 5.13 Valores experimentales versus simulados de la temperatura de salida de la fase continua a diferentes G_γ . Variables de estado iniciales: Tabla 5.15. $\varepsilon = 0.95$. Erp : error relativo promedio. La línea continua representa un ajuste exacto entre los valores simulados y experimentales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con un valor de ε de 0.95 se evaluaron diferentes G_y para evaluar su efecto sobre la dinámica del secado por aspersión de extractos etanólicos de moringa. La Figura 5.13 muestra la dinámica experimental y simulada en función de la Tsal a diferentes valores de G_y y bajo las variables de estado del conjunto experimental que se presenta en la Tabla 5.15. Se confirmó que el valor de $G_y = 0.0135 \text{ kg}\cdot\text{s}^{-1}$ estimado por Aguirre-Alonso (2016) reproduce adecuadamente la dinámica experimental del secado por aspersión de extractos etanólicos de moringa con un Erp de 5.59%. No se probaron valores mayores a $0.0135 \text{ kg}\cdot\text{s}^{-1}$ porque éste representa la capacidad máxima del secador por aspersión utilizado para llevar a cabo los experimentos en este trabajo.

5.4.2 Efecto de las interacciones termodinámicas de los sólidos de la alimentación sobre la humedad simulada del producto

Para representar la relación de masas de etanol y de agua en la interfase, Aguirre-Alonso (2016) partió de las ecuaciones generadas por Huesca-Osorio (2014) (Ecuaciones (2.39) y (2.40)), en las cuales para calcular la presión de vapor del etanol-agua se considera la a_{we} (Ecuación (2.47)) por el efecto de las propiedades coligativas de los sólidos de la mezcla de alimentación. Precisamente la Ecuación (2.48) representa las interacciones termodinámicas de los sólidos de la alimentación, con dicha expresión se predice la a_{we} en función del contenido de humedad ($X_{ew\beta} = X_{w\beta} + X_{e\beta}$) a una determinada temperatura (T_β). Para resolver su modelo, Aguirre-Alonso (2016) parte de la isoterma de sorción reportada por Palencia *et al.* (2002): Ecuación (4.21). Con dicha expresión Aguirre-Alonso (2016) logró representar la dinámica de secado por aspersión de extractos etanólicos de vainilla. Sin embargo, en el presente trabajo a pesar de obtener una adecuada representación dinámica del secado por aspersión de extractos etanólicos de moringa con $G_y = 0.0135 \text{ kg}\cdot\text{s}^{-1}$ y $\varepsilon = 0.95$, se observaron algunos valores simulados de la humedad del producto que no coinciden con los valores experimentales obtenidos (Figura 5.14), estas desviaciones se atribuyeron a la representación de las interacciones termodinámicas de los sólidos de la alimentación (Ecuación (4.21)), la cual debe ser específica para cada producto alimenticio (Al-Muhtaseb *et al.*, 2002).

Como no se cuenta con ningún dato que sustente la contribución del etanol a la función descrita en la Ecuación (2.48) y experimentalmente no es viable determinar dicha contribución, se asumió que ésta tiene la misma conducta que una isoterma convencional y se decidió expresar $a_{we} = a_w$. Bajo esta suposición, se decidió obtener los datos de la isoterma de adsorción para extractos secos de moringa y calcular las constantes de la Ecuación (2.48). Los datos de la isoterma (Figura 5.15) se obtuvieron a partir de partículas secas de extracto de moringa obtenidas con una proporción de MS/SE de 3 g/g, Tent de 140 °C y Tsal de 60 °C. Estas condiciones de operación se seleccionaron por representar los valores centrales de las variables independientes evaluadas.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

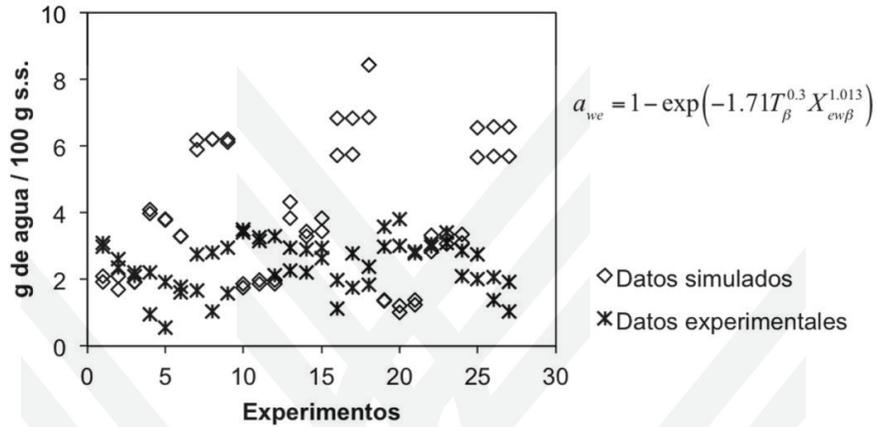


FIGURA 5.14 Valores experimentales y simulados de la humedad de extractos secos de moringa. Variables de estado iniciales: Tabla 5.15. $\varepsilon = 0.95$. $G_{\gamma} = 0.0135 \text{ kg}\cdot\text{s}^{-1}$. Representación de las interacciones termodinámicas de los sólidos de la alimentación: Ecuación (4.21).

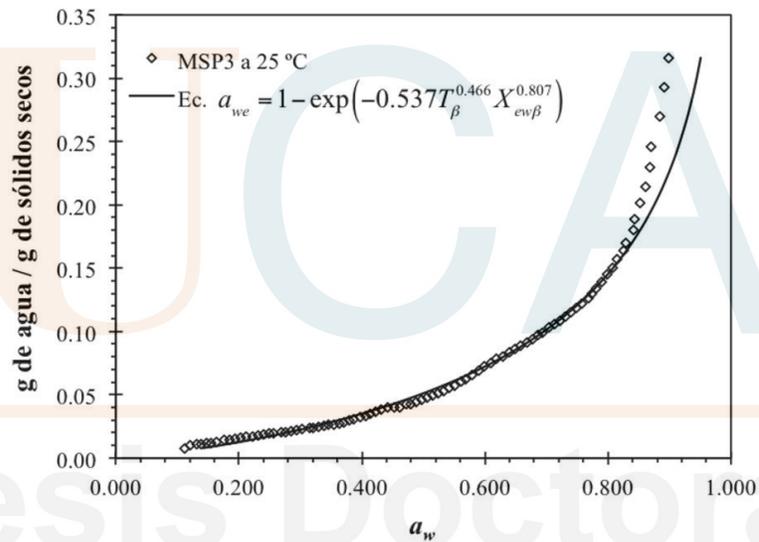


FIGURA 5.15 Isotherma de adsorción a 25 °C de extractos secos de moringa obtenidos con 3 g de material de soporte por cada g de sólidos de extracto (MSP3). Representación de los datos de adsorción: Ecuación (2.48).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los datos de adsorción obtenidos a 25 °C con partículas secas de moringa y a partir de la Ecuación (2.48) se obtuvo la siguiente expresión:

$$a_{we} = 1 - \exp(-0.537T_{\beta}^{0.466} X_{ew\beta}^{0.807}) \quad (5.1)$$

Al resolver el modelo de Aguirre-Alonso (2016) con las constantes de la Ecuación (5.1) se observó un mejor ajuste de los valores simulados de la humedad con los valores experimentales obtenidos (Figura 5.16). Además, el comportamiento dinámico de la temperatura de salida de la fase continua no se vio afectada (Figura 5.17).

En las Figuras 5.16 y 5.17 se pueden observar algunas desviaciones de la dinámica de simulación con respecto a la experimental. Esto puede deberse a que el modelo se resolvió en el modo más simplificado: manteniendo constantes todas las propiedades durante el proceso. De hecho, muchas de las propiedades más importantes como la transferencia de calor externa, la difusividad interna de la humedad de la fase dispersa, el radio de las gotas y la fracción de volumen de la fase continua (ε) pueden variar durante el secado por aspersión (Palencia *et al.*, 2002). Sin embargo, con un Erp de 5.62% se considera que el modelo de (Aguirre-Alonso, 2016) representa adecuadamente la dinámica del secado por aspersión en ciclo cerrado de extracto etanólicos de moringa.

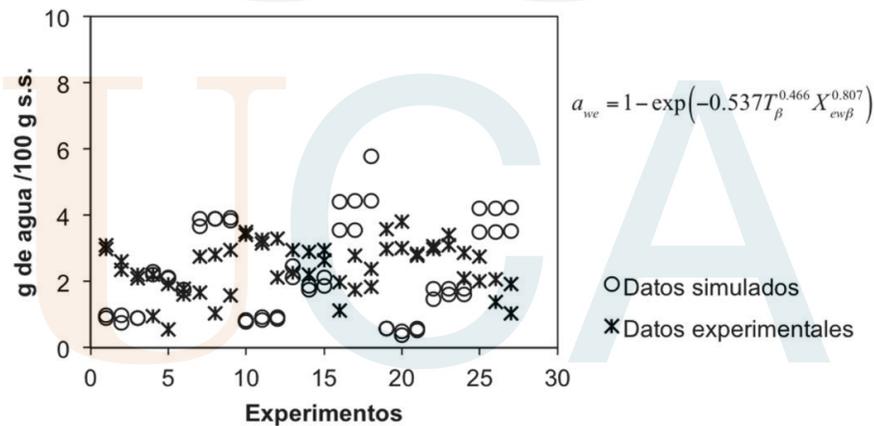


FIGURA 5.16 Valores experimentales y simulados de la humedad de extractos secos de moringa. Variables de estado iniciales: Tabla 5.15. $\varepsilon = 0.95$. $G_y = 0.0135 \text{ kg} \cdot \text{s}^{-1}$. Representación de las interacciones termodinámicas de los sólidos de la alimentación: Ecuación (5.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

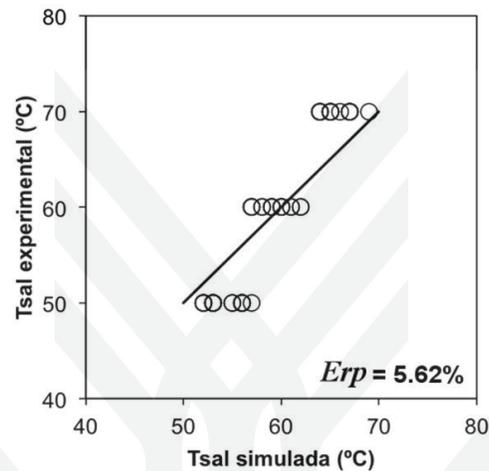


FIGURA 5.17 Valores experimentales versus simulados de la temperatura de salida de la fase continua. Variables de estado iniciales: Tabla 5.15. $\varepsilon = 0.95$. $G_y = 0.0135 \text{ kg}\cdot\text{s}^{-1}$. Representación de las interacciones termodinámicas de los sólidos de la alimentación: Ecuación (5.1). Erp : error relativo promedio. La línea continua representa un ajuste exacto entre los valores simulados y experimentales.

5.4.3 Consumo de energía durante el secado por aspersión de extractos etanólicos de moringa

Una vez validado el modelo de Aguirre-Alonso (2016), a partir de los resultados que arroja, se procedió a evaluar el consumo de energía por kg de extracto seco obtenido. En la Figura 5.18 se observa un grupo de tratamientos de bajo consumo de energía ($48.34 - 90.19 \text{ kW}\cdot\text{h}\cdot\text{kg}_{\text{ss}}^{-1}$) con respecto a los otros experimentos ($100.62 - 196.93 \text{ kW}\cdot\text{h}\cdot\text{kg}_{\text{ss}}^{-1}$). Sin embargo, algunos tratamientos de dicho grupo cuentan con bajo rendimiento de proceso ($< 50\%$), por lo cual fueron descartados: tratamientos 7-9, 16-18, 25-27. En la Tabla 5.12 se presentan las condiciones de operación de cada tratamiento. En el nuevo grupo conformado por los tratamientos 1, 4-5, 10-14, 22-23, al aplicar como criterios la retención de compuestos fenólicos de referencia (Figuras 5.10 y 5.11) y el consumo de material de soporte (Tabla 5.12), con el tratamiento 14 (Tent: $140 \text{ }^\circ\text{C}$; Tsal: $60 \text{ }^\circ\text{C}$; MS/SE: 3 g/g) se consigue el menor consumo de energía ($80 \text{ kW}\cdot\text{h}\cdot\text{kg}_{\text{ss}}^{-1}$), con la mayor retención de quercetina-3-rutinósido (71.3%) y kaempferol-3-glucósido (65.5%), el mayor rendimiento posible (57.8%) y la menor adición de material de soporte por g de sólidos de extracto (3 g/g).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

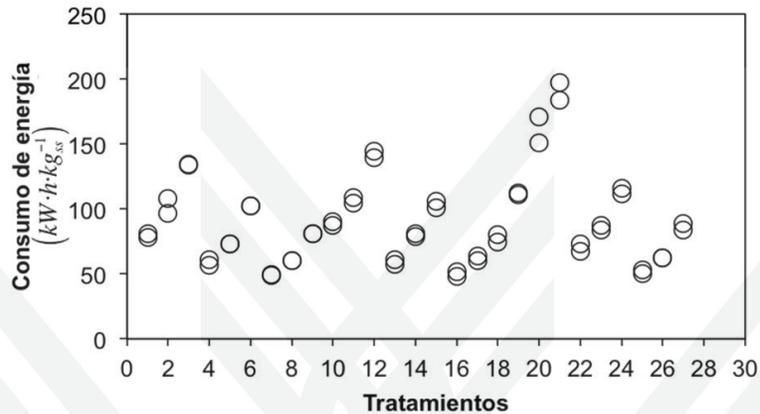


FIGURA 5.18 Consumo de energía durante el secado por aspersion de extractos etanólicos de moringa. Variables de estado iniciales: Tabla 5.15. $\varepsilon = 0.95$. $G_y = 0.0135 \text{ kg}\cdot\text{s}^{-1}$. Representación de las interacciones termodinámicas de los sólidos de la alimentación: Ecuación (5.1).

5.5 Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre la estabilidad de compuestos fenólicos de referencia en los extractos secos de moringa

Para considerar la utilidad de los extractos secos de moringa para aplicaciones alimentarias y/o farmacéuticas, es importante garantizar su estabilidad y funcionalidad durante el almacenamiento. En este contexto, en el presente trabajo se evaluó el cambio en la concentración de compuestos fenólicos de referencia durante el almacenamiento de las muestras y se usó como un indicador de la estabilidad de las partículas secas a diferentes condiciones de humedad relativa y temperatura.

En la Tabla 5.16 se reportan los coeficientes de regresión (β_{ij}) del modelo propuesto (Ecuación (4.24)) para cada variable de respuesta. Para visualizar los efectos combinados de las variables estudiadas sobre las respuestas, se generaron las superficies de respuesta para cada uno de los modelos ajustados como la función de dos variables independientes: tiempo de almacenamiento y humedad relativa. En el mismo gráfico se generó una superficie de respuesta por cada temperatura de almacenamiento (Figuras 5.19-5.20). Los efectos de las condiciones estudiadas sobre las variables de respuesta se discutieron a partir de estas gráficas y el análisis estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TABLA 5.16 Coeficientes de regresión para cada variable de respuesta evaluada durante la prueba de estabilidad de extractos secos de moringa.

MS ^a	CR ^b	Contenido de quercetina-3-rutinósido		Contenido de kaempferol-3-glucósido	
		Valor del CR	Valor de p	Valor del CR	Valor de p
95:5 (p/p) maltodextrina:sílice precipitada (z_1)	β_{i0}	22.192	< 0.001	4.992	< 0.001
	β_{i1}	-1.305	0.298	-0.074	0.780
	β_{i2}	0.780	0.239	0.015	0.913
	β_{i3}	-2.385	0.151	-0.305	0.388
	β_{i12}	1.234	0.065	0.336	0.018
	β_{i13}	1.009	0.588	0.480	0.226
	β_{i23}	2.029	0.052	0.481	0.031
	β_{i11}	4.395	< 0.001	0.421	0.090
Maltodextrina DE-10 (z_2)	β_{i0}	38.161	0.012	6.606	< 0.001
	β_{i1}	-10.519	< 0.001	-1.723	< 0.001
	β_{i2}	-4.093	< 0.001	-0.618	< 0.001
	β_{i3}	-5.284	0.002	-0.984	0.006
	β_{i12}	-7.055	< 0.001	-1.284	< 0.001
	β_{i13}	-4.038	0.031	-0.354	0.372
	β_{i23}	-3.053	0.004	-0.834	< 0.001
	β_{i11}	-10.074	< 0.001	-1.363	< 0.001
Sílice precipitada (z_3)	β_{i0}	45.786	< 0.001	8.839	< 0.001
	β_{i1}	-13.827	< 0.001	-2.939	< 0.001
	β_{i2}	-7.410	< 0.001	-1.593	< 0.001
	β_{i3}	-8.493	< 0.001	-1.720	< 0.001
	β_{i12}	-8.977	< 0.001	-1.958	< 0.001
	β_{i13}	-2.036	0.275	-0.545	0.170
	β_{i23}	-1.066	0.307	-1.012	< 0.001
	β_{i11}	-1.213	0.298	0.232	0.349
Tipo de MS		< 0.001		< 0.001	

^bMaterial de soporte. ^aCR: coeficiente de regresión del modelo propuesto (Ecuación (4.24)). β_{ij} : es el CR que relaciona el factor j con cada respuesta i ($j = 1$: humedad relativa; 2: temperatura; 3: tiempo). Los términos se consideraron estadísticamente significantes en los valores de p inferiores al 5% ($p < 0.05$).

Comparando el contenido de los compuestos fenólicos de referencia (Figuras 5.19-5.20) de los extractos secos de moringa, se puede observar que las muestras en cuya composición se usó 95:5 (p/p) maltodextrina:sílice precipitada, presentaron la menor cantidad de compuestos de referencia por



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

g de sólidos secos, lo cual puede explicarse por la cantidad de material de soporte utilizado por cada g de sólidos de extracto (g/g) durante el proceso de secado por aspersión, y que es mayor con maltodextrina:sílice precipitada (3.0 g/g) en comparación con los extractos secos de moringa con maltodextrina DE-10 (2.0 g/g) y sílice precipitada (0.5 g/g).

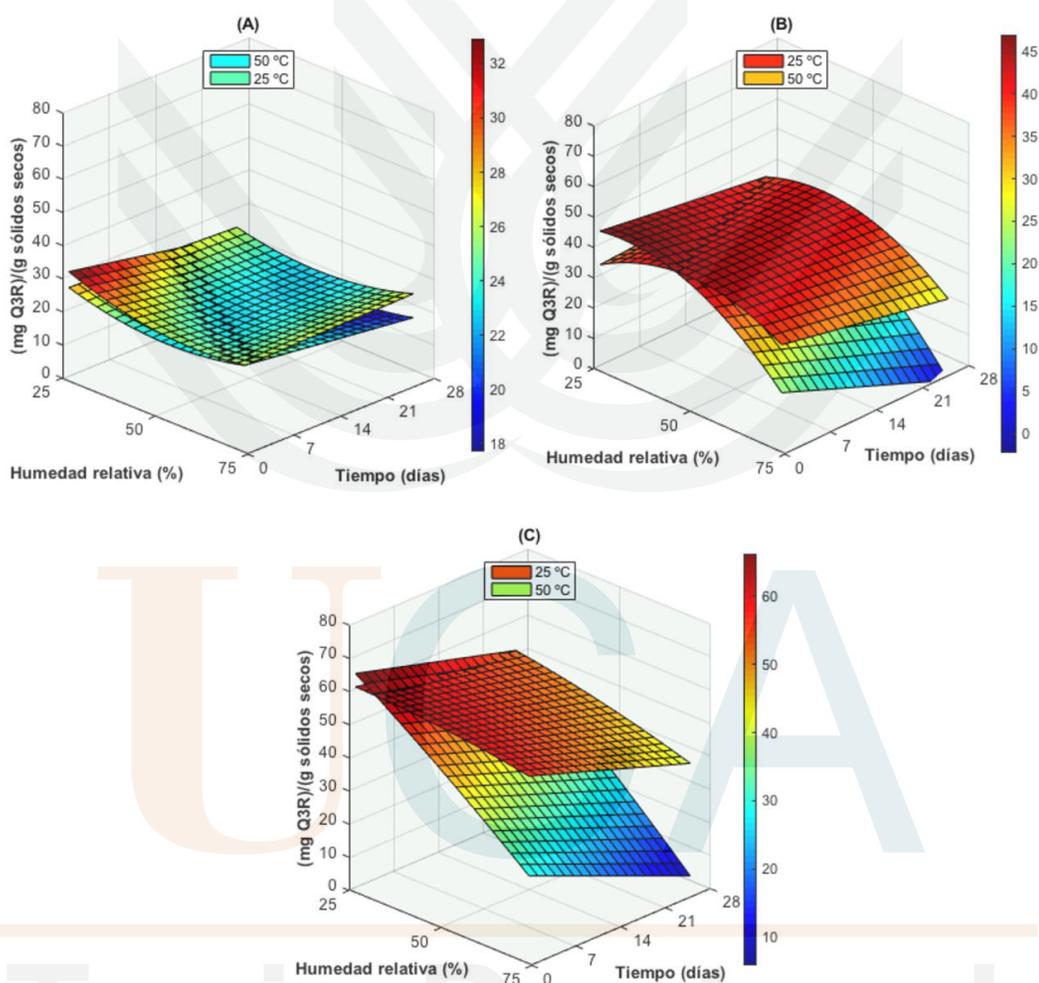


FIGURA 5.19 Efecto de la humedad relativa y la temperatura sobre el contenido de quercetina-3-rutinósido (Q3R) durante el almacenamiento de extractos secos de moringa. Materiales de soporte evaluados: 95:5 (p/p) maltodextrina:sílice precipitada (A), maltodextrina DE-10 (B) y sílice precipitada (C).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

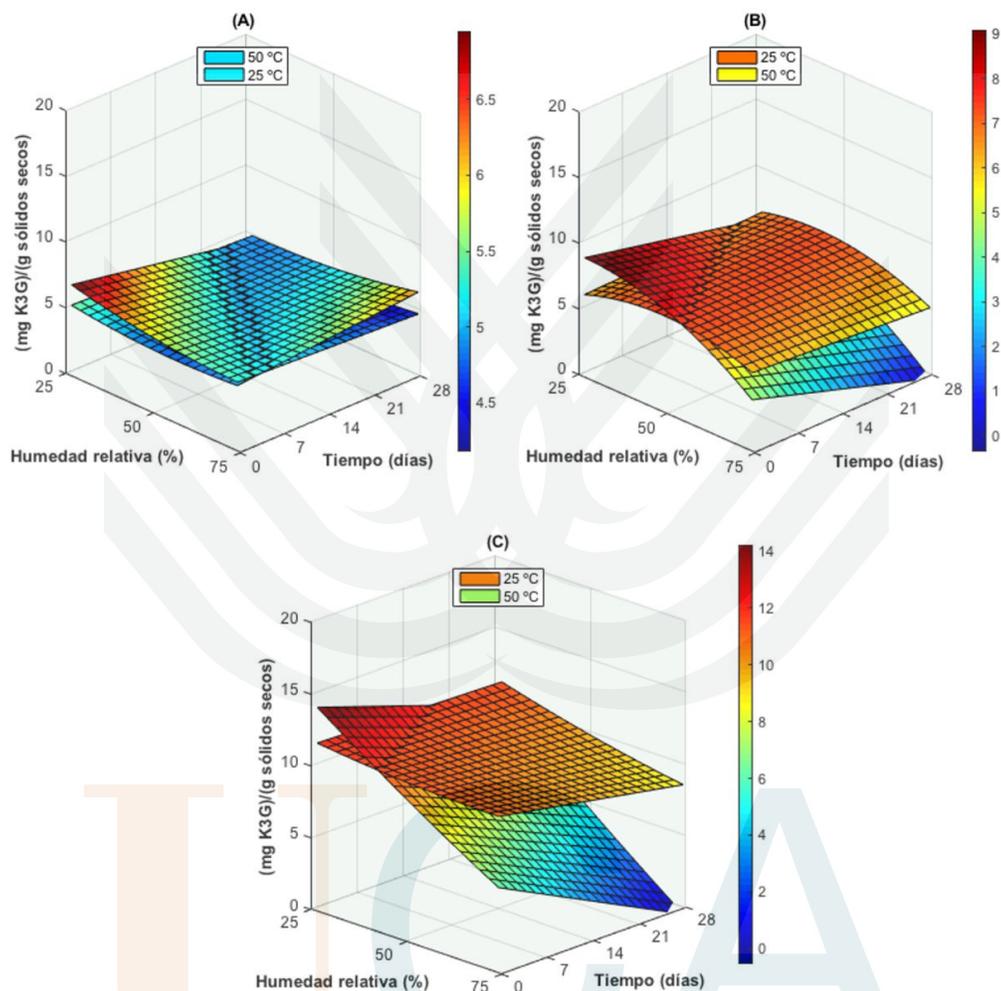


FIGURA 5.20 Efecto de la humedad relativa y la temperatura sobre el contenido de kaempferol-3-glucósido (K3G) durante el almacenamiento de extractos secos de moringa. Materiales de soporte evaluados: 95:5 (p/p) maltodextrina:sílice precipitada (A), maltodextrina DE-10 (B) y sílice precipitada (C).

Las variables evaluadas no afectaron significativamente el contenido de compuestos fenólicos de referencia cuando la mezcla maltodextrina:sílice precipitada se usó como material de soporte (Tabla 5.16). Cuando se usaron maltodextrina y sílice precipitada como materiales de soporte, todas las variables independientes afectaron significativamente a las variables de respuesta evaluadas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(Tabla 5.16). En general, no se observaron cambios significativos en la cantidad de compuestos fenólicos de referencia a 30% de humedad relativa para todos los tipos de material de soporte. Sin embargo, ambos compuestos fenólicos estudiados disminuyeron en contenido cuando las partículas secas con maltodextrina y sílice precipitada se almacenaron en el rango de humedad relativa de 50% - 75% a ambas temperaturas de almacenamiento (Figuras 5.19-5.20). El contenido de agua de los extractos secos de moringa con estos niveles de a_w podría considerarse lo suficientemente alto como para producir un aumento en las reacciones de degradación de los compuestos de referencia, incluso después de unos pocos días de almacenamiento (1-10 días). Resultados similares fueron reportados por Moraga *et al.* (2012), quienes observaron que un aumento en la a_w afecta negativamente el contenido de fenoles totales y de flavonoides en partículas secas de pomelo. Bajo estas condiciones, la degradación de estos compuestos se atribuye a la hidrólisis ácida, la cual es una de las principales vías de degradación de los flavonoides glucosidados (Bott *et al.*, 2010). Buchner *et al.* (2006) informaron que la presencia de oxígeno acelera la degradación de la quercetina y la quercetina-3-rutinósido, debido a la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos radicales a menudo se forman en solución acuosa y pueden ser capturados por los flavonoides. Durante la reacción, los flavonoides pueden transferir uno o dos átomos de hidrógeno (principalmente del grupo orto-dihidroxi en el anillo B) lo que resulta en la formación de estructuras quinonoides.

Las Figuras 5.19-5.20 muestran que en todas las humedades relativas y temperaturas evaluadas, las partículas secas con la mezcla maltodextrina:sílice precipitada proporcionaron la mayor estabilidad para los compuestos fenólicos de referencia. Estas muestras se caracterizaron por un mayor contenido de material de soporte en su formulación (3 g/g), lo que podría estar relacionado con una mayor protección contra la degradación de los compuestos fenólicos. Este resultado también se ve respaldado por el hecho de que esta formulación mostró una mayor retención de compuestos fenólicos en comparación con las muestras de 2 g de material de soporte por g de sólidos de extracto (Figuras 5.10 y 5.11). Esto sugiere que hay menor contenido de compuestos bioactivos libres en la superficie de las partículas, lo cual es característico de la capacidad de protección física del material de soporte (da Silva *et al.*, 2013).

El contenido de los compuestos de referencia disminuyó bruscamente en función de la humedad relativa especialmente cuando se usó sílice precipitada como material de soporte (Figuras 5.19-5.20), además a 50 °C se aceleró la degradación de los compuestos. Este comportamiento se atribuye a que este material de soporte no es un formador de pared, sólo es un regulador de flujo (Müller *et al.*, 2008). Una mayor tendencia a absorber humedad que otras muestras a niveles elevados de a_w (0.750-0.900) (Figuras 5.21-5.23) podría ser otra razón de este comportamiento.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

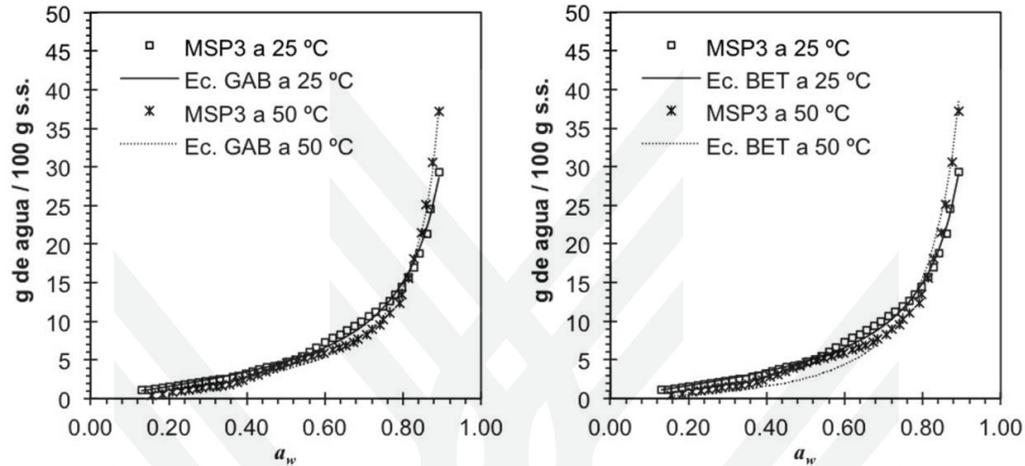


FIGURA 5.21 Isotermas de adsorción a 25 y 50 °C para extractos secos de moringa obtenidos con 3 g de 95:5 (p/p) maltodextrina:sílice precipitada por cada g de sólidos de extracto (MSP3).

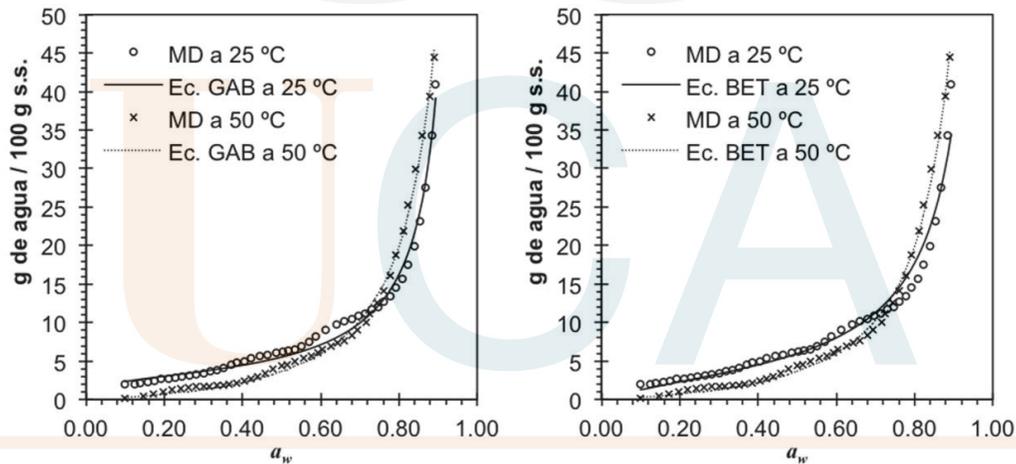


FIGURA 5.22 Isotermas de adsorción a 25 y 50 °C para extractos secos de moringa obtenidos con 2 g de maltodextrina DE-10 por cada g de sólidos de extracto (MD).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

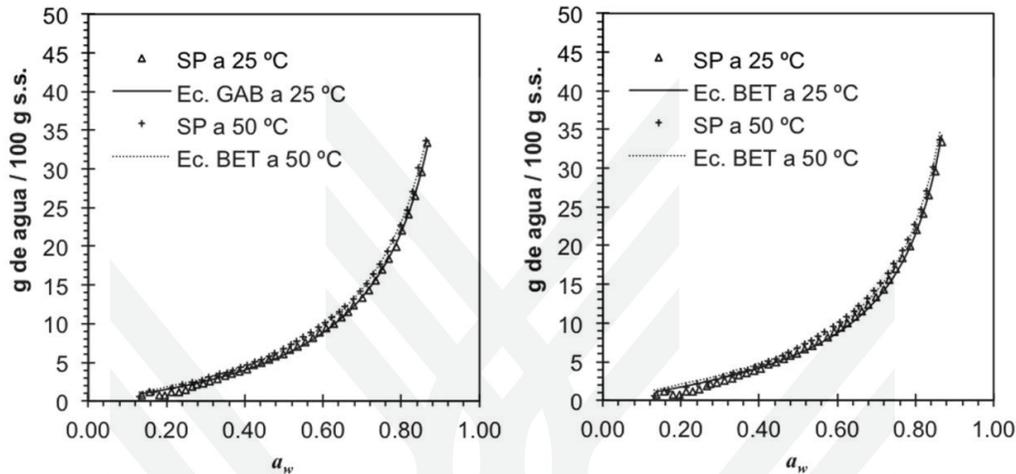


FIGURA 5.23 Isothermas de adsorción a 25 y 50 °C para extractos secos de moringa obtenidos con 0.5 g de sílice precipitada por cada g de sólidos de extracto (SP).

Los resultados del análisis de regresión no lineal para ajustar los modelos de GAB y de BET a los datos experimentales de la isoterma de adsorción (Figuras 5.21-5.23) se muestran en la Tabla 5.17. Los resultados muestran que ambos modelos tienen valores comparables de coeficientes de regresión (R^2) cercanos a 1, indicando un buen ajuste de ambas ecuaciones a la curva, pero el ajuste con el modelo GAB obtiene valores menores de Erp (Tabla 5.17).

El contenido de humedad al equilibrio en los extractos secos de moringa aumentó significativamente cuando se expuso a a_w superior a 0.500 (Figuras 5.21-5.23). Las diferentes muestras formuladas de extracto seco de moringa mostraron una estabilidad diferente tras la adsorción de humedad. A 50 y 75% de humedad relativa, las muestras con la mezcla maltodextrina:sílice precipitada y maltodextrina perdieron su comportamiento de flujo libre, con la formación de pequeños bloques como resultado de la compactación y apelmazamiento de los extractos secos de moringa rehidratados. En los valores bajos de a_w el agua puede adsorberse en la superficie de las partículas, mientras que en los valores altos de a_w se produce la disolución de las partículas (Fernandes *et al.*, 2014). En este estado, cuanto mayor es la humedad relativa y mayor es el tiempo de almacenamiento, menor es el contenido del compuesto bioactivo debido a la disponibilidad de agua para que se lleven a cabo reacciones de degradación (Moraga *et al.*, 2012), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo (Figuras 5.19-5.20). Las muestras con sílice precipitada no mostraron cambios en la estabilidad física, de hecho, el valor de M_0 de los extractos secos de moringa con sílice precipitada fue mayor en comparación con los de las otras muestras (Tabla 5.17), indicando la mayor disponibilidad de sitios activos de enlace con agua,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

atribuida a su naturaleza porosa (Evonik, 2015). La contribución de la sílice precipitada en la mezcla maltodextrina:sílice precipitada junto con la capacidad de formación de pared de la maltodextrina DE-10 podría explicar la mayor estabilidad física y química de las partículas obtenidas con esta mezcla en comparación con los extractos secos obtenidos con maltodextrina y sílice precipitada.

TABLA 5.17 Parámetros de los modelos GAB y BET para extractos secos de moringa obtenidos con diferentes materiales de soporte.

Modelo	Tipo de material de soporte	Temperatura (°C)	M_0 (g agua)/(100 g s.s.)	a_w en la M_0	C	K	R^2	Erp (%)
GAB	MSP3	25	3.449	0.397	2.390	0.993	0.996	5.306
	MSP3	50	2.587	0.390	2.150	1.046	0.996	11.817
	MD	25	2.737	0.139	28.542	1.041	0.989	10.436
	MD	50	6.414	0.605	0.394	1.002	0.997	10.627
	SP	25	6.735	0.535	0.926	0.960	0.999	9.796
	SP	50	6.769	0.517	1.142	0.961	1.000	2.832
BET	MSP3	25	3.267	0.380	2.779	NA	0.996	6.567
	MSP3	50	5.891	0.653	0.287	NA	0.979	24.917
	MD	25	3.772	0.334	3.808	NA	0.969	9.606
	MD	50	6.544	0.605	0.387	NA	0.997	10.831
	SP	25	4.999	0.444	1.530	NA	0.998	15.360
	SP	50	5.189	0.425	1.861	NA	0.998	10.245

MSP3: 95:5 (p/p) maltodextrina:sílice precipitada. MD: maltodextrina. SP: sílice precipitada. NA: no aplica.

Los resultados sugieren que la adsorción significativa de humedad que se produce a partir del 50% de humedad relativa podría conducir a una disolución macroscópica del material de soporte y a una liberación de los compuestos bioactivos, ocasionando así una mayor afinidad por el agua y efectos sobre la estabilidad de la muestra. Los resultados de este trabajo son consistentes con lo informado por Bott *et al.* (2010) cuando evaluaron la estabilidad de los extractos secos de *Passiflora alata*; y con los resultados reportados por da Silva *et al.* (2013), quienes estudiaron la estabilidad de almacenamiento de propóleo secado por aspersión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hace falta realizar el análisis de otros componentes fitoquímicos que podrían estar presentes en el extracto seco (clorofila, ácido ascórbico, carotenoides) y que le confieren otras bio-actividades al extracto seco de moringa obtenido. De igual forma, se deben evaluar diferentes materiales de empaque para asegurar la estabilidad físico-química de este producto, pues de estas características depende la calidad del producto resultante.



UCA

Tesis Doctoral



6 CONCLUSIONES

Las hojas de moringa contienen cantidades significativas de compuestos bioactivos (fenoles totales, ácido gálico, carotenoides totales, ácido ascórbico) y actividad antirradical (ensayos DPPH y ABTS) especialmente cuando los árboles han crecido en suelos con bajo contenido de P y K. Los factores climáticos (radiación solar, radiación UV, precipitación y temperatura media) modulan positivamente la expresión de compuestos bioactivos y de la actividad antirradical de las hojas de moringa.

Se determinaron las propiedades de transporte necesarias para optimizar el proceso de extracción de compuestos bioactivos a partir de hojas de moringa. El modelo propuesto por Castillo-Santos et al. (2016) describe satisfactoriamente el proceso de extracción sólido-líquido por lote en multietapas a contracorriente de hojas secas de moringa, utilizando un disolvente compuesto (etanol:agua 80:20 p/p) y dos parámetros de equilibrio determinados experimentalmente.

Las condiciones de operación del proceso de secado por aspersión evaluadas en este trabajo permitieron obtener extractos secos de moringa con retenciones de compuestos fenólicos superiores al 70%. El modelo termodinámico de Aguirre-Alonso (2016) describe satisfactoriamente el proceso de secado por aspersión con nitrógeno en ciclo cerrado de extractos etanólicos de moringa, utilizando variables de estado definidas experimentalmente y las interacciones termodinámicas de los sólidos de la alimentación adecuadas.

En las condiciones evaluadas, los extractos secos de moringa mantienen su estabilidad física a 30% de humedad relativa. Más estudios son necesarios para evaluar las condiciones de almacenamiento y el material de empaque que garanticen la estabilidad física del extracto seco y su composición.

Tesis Doctoral



LISTA DE REFERENCIAS

- Aguilera, J.M. 2003. Solid-liquid extraction. En: Extraction Optimization in Food Engineering. Editado por: Tzia, C. y Liakadis, N. Nueva York: Marcel-Dekker, Inc. p. 35-55.
- Aguirre-Alonso, R.O. 2016. Optimización térmica del secado por aspersión de extracto etanólico de vainilla en ciclo cerrado. Veracruz, México: Tesis de Doctorado. Instituto Tecnológico de Veracruz.
- Ahmad, M.H., Barrajon, E., Micol, V., Cárcel, J.A. y Garcia, J.V. 2013a. Influence of air temperature on drying kinetics and antioxidant potential of olive pomace. *Journal of Food Engineering* **119**(3):516-524.
- Ahmad, M.H., Barrajon, E., Micol, V., Mulet, A. y Garcia, J.V. 2013b. Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. *Food Research International* **50**(1):189-196.
- Ahmad-Qasem, M.H., Cánovas, J., Barrajon-Catalán, E., Micol, V., Cárcel, J.A. y Garcia-Pérez, J.V. 2013. Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **17**:120-129.
- Al-Muhtaseb, A.H., McMin, W.A.M. y Magee, T.R.A. 2002. Moisture Sorption Isotherm Characteristics of Food Products: A Review. *Food and Bioprocess Processing* **80**(2):118-128.
- Alcántar-González, G. y Trejo-Téllez, L.I. 2009. Nutrición de cultivos. México, D.F.: Mundi-Prensa México, S.A. de C.V.
- Amaglo, N.K., Bennett, R.N., Lo Curto, R.B., Rosa, E.A.S., Lo Turco, V., Giuffrida, A., Curto, A.L., Crea, F. y Timpo, G.M. 2010. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. *Food Chemistry* **122**(4):1047-1054.
- Annegowda, H.V., Anwar, L.N., Mordi, M.N., Ramanathan, S. y Mansor, S.M. 2010. Influence of sonication on the phenolic content and antioxidant activity of *Terminalia catappa* L. leaves. *Pharmacognosy Research* **2**(6):368.
- AOAC. 2006. Official Methods of Analysis. Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists.
- Arana, A., Estarrón, M., Obledo, E.N., Padilla, E., Silva, R. y Lugo, E. 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. *Letters in Applied Microbiology* **50**(6):585-590.
- Araújo, R.R., Teixeira, C.C.C. y Freitas, L.A.P. 2010. The Preparation of Ternary Solid Dispersions of an Herbal Drug via Spray Drying of Liquid Feed. *Drying Technology* **28**(3):412-421.
- Azevedo-Meleiro, C.H. y Rodriguez-Amaya, D.B. 2005. Carotenoids of endive and New Zealand spinach as affected by maturity, season and minimal processing. *Journal of Food Composition and Analysis* **18**(8):845-855.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N. y Omar, A.K.M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* **117**(4):426-436.
- Baker, C.G.J. y McKenzie, K.A. 2005. Energy Consumption of Industrial Spray Dryers. *Drying Technology* **23**(1/2):365-386.
- Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S.K. y Arora, S. 2013. Role of Secondary Metabolites and Brassinosteroids in Plant Defense Against Environmental Stresses. *Journal of Plant Growth Regulation* **32**(1):216-232.
- Ben Haj Said, L., Najjaa, H., Neffati, M. y Bellagha, S. 2013. Color, Phenolic and Antioxidant Characteristic Changes of Allium Roseum Leaves during Drying. *Journal of Food Quality* **36**(6):403-410.
- Bhandari, B.R., Datta, N., Crooks, R., Howes, T. y Rigby, S. 1997. A semi-empirical approach to optimise the quantity of drying aids required to spray dry sugar-rich foods. *Drying Technology* **15**(10):2509-2525.
- Birchal, V.S., Huang, L., Mujumdar, A.S. y Passos, M.L. 2006. Spray Dryers: Modeling and Simulation. *Drying Technology* **24**(3):359-371.



- Bott, R.F., Labuza, T.P. y Oliveira, W.P. 2010. Stability testing of spray- and spouted bed-dried extracts of *Passiflora alata*. *Drying Technology* **28**(11):1255-1265.
- Büchi. 2002. Training papers spray drying. Labortechnik AG. p. 19.
- Buchner, N., Krumbein, A., Rohn, S. y Kroh, L.W. 2006. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **20**(21):3229-3235.
- Busso, C., Schebor, C., Zamora, M.C. y Chirife, J. 2007. Glass transition temperatures and some physical and sensory changes in stored spray-dried encapsulated flavors. *LWT - Food Science and Technology* **40**(10):1792-1797.
- Cáceres, A., Saravia, A., Rizzo, S., Zabala, L., De León, E. y Nave, F. 1992. Pharmacological properties of *Moringa oleifera* 2: screening for antispasmodic, anti-inflammatory and diuretic activity. *Journal of Ethnopharmacology* **36**(3):233-237.
- Camire, M.E., Chaovanalikit, A., Dougherty, M.P. y Briggs, J. 2002. Blueberry and grape anthocyanins as breakfast cereal colorants. *Journal of Food Science* **67**(1):438-441.
- Campbell, O.E., Merwin, I.A. y Padilla-Zakour, O.I. 2013. Characterization and the effect of maturity at harvest on the phenolic and carotenoid content of Northeast USA Apricot (*Prunus armeniaca*) varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**(51):12700-12710.
- Castillo-Santos, K., Aguirre-Alonso, R.O., Rodríguez-Jimenes, G.C., Robles-Olvera, V.J., Salgado-Cervantes, M.A. y García-Alvarado, M.A. 2016. An optimization based algorithm for solving design problems of counter-current multistage batch solid-liquid extractors for complex systems: Application to vanilla extract. *Computers & Chemical Engineering* **89**:53-61.
- Cengel, Y.A. y Ghajar, A.J. 2011. *Trasferencia de calor y masa, fundamentos y aplicaciones*. 4ª ed. México, D.F.: Ed. Mc Graw Hill.
- Chiou, D. y Langrish, T.A.G. 2007. Development and characterisation of novel nutraceuticals with spray drying technology. *Journal of Food Engineering* **82**(1):84-91.
- Chludil, H.D., Corbino, G.B. y Leicach, S.R. 2008. Soil Quality Effects on *Chenopodium album* Flavonoid Content and Antioxidant Potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(13):5050-5056.
- Chumark, P., Khunawat, P., Sanvarinda, Y., Phornchirasilp, S., Morales, N.P., Phivthong-ngam, L., Ratanachamngong, P., Srisawat, S. y Pongrapeeporn, K.-u.S. 2008. The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Journal of Ethnopharmacology* **116**(3):439-446.
- Coria-Cayupan, Y.S., Sanchez de Pinto, M.I. y Nazareno, M.A. 2009. Variations in bioactive substance contents and crop yields of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivated in soils with different fertilization treatments. *J Agric Food Chem* **57**(21):10122-10129.
- Cortés, D.F. y Oliveira, W.P. 2012. Physicochemical properties of phytopharmaceutical preparations as affected by drying methods and carriers. *Drying Technology* **30**(9):921-934.
- Crespo, P., Bordonaba, J.G., Terry, L.A. y Carlen, C. 2010. Characterisation of major taste and health-related compounds of four strawberry genotypes grown at different Swiss production sites. *Food Chemistry* **122**(1):16-24.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. y Lewis, N.G. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). En: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Editado por: Buchanan, B.B., Grisse, W. y Jones, R.L. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists. p. 1250-1318.
- da Silva, F.C., da Fonseca, C.R., de Alencar, S.M., Thomazini, M., Balieiro, J.C.d.C., Pittia, P. y Favaro-Trindade, C.S. 2013. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. *Food and Bioprocess Technology* **91**(1):28-36.
- Davey, M.W., Montagu, M.V., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I.J.J., Strain, J.J., Favell, D. y Fletcher, J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**(7):825-860.
- Di Cesare, L.F., Forni, E., Viscardi, D. y Nani, R.C. 2004. Influence of drying techniques on the volatile phenolic compounds, chlorophyll and colour of oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *prismaticum* Gaudin). *Italian Journal of Food Science* **16**(2):165-175.
- Dong, J., Liu, Y., Liang, Z. y Wang, W. 2010. Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* root. *Ultrasonics Sonochemistry* **17**(1):61-65.



- Elizarov, D.V., Elizarov, V.I. y Kamaliev, T.S. 2013. Method for Approximate Calculation of Multistage Liquid Extraction. *Chemical and Petroleum Engineering* **49**(7):429-434.
- Evonik. 2015. SIPERNAT® and AEROSIL® as Flow Aid and Anticaking Agent. Technical Information 1351. p. 12.
- Faizi, S., Siddiqui, B.S., Saleem, R., Aftab, K. y Shaheen, F. 2007. Hypotensive constituents from the pods of *Moringa oleifera*. *Planta Medica* **64**(3):225-228.
- Fang, Z. y Bhandari, B. 2011. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry* **129**(3):1139-1147.
- Fazaeli, M., Emam-Djomeh, Z., Kalbasi-Ashtari, A. y Omid, M. 2012. Effect of process conditions and carrier concentration for improving drying yield and other quality attributes of spray dried black mulberry (*Morus nigra*) juice. *International Journal of Food Engineering* **8**(1):1-20.
- Fennell, C.W., Light, M.E., Sparg, S.G., Stafford, G.I. y van Staden, J. 2004. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices. *Journal of Ethnopharmacology* **95**(2-3):113-121.
- Fernandes, L.P., Candido, R.C. y Oliveira, W.P. 2012. Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends. *Food and Bioprocess Processing* **90**(3):425-432.
- Fernandes, R.V.d.B., Borges, S.V. y Botrel, D.A. 2014. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers* **101**(Supplement C):524-532.
- Filková, I., Huang, L.X. y Mujumdar, A.S. 2006. Industrial Spray Drying Systems. En: Handbook of industrial drying. Editado por: Ed. Mujumdar, A.S. Philadelphia: CR Press Taylor and Francis Group. p. 215-254.
- Freitas, A., Moldão-Martins, M., Costa, H.S., Albuquerque, T.G., Valente, A. y Sanches-Silva, A. 2015. Effect of UV-C radiation on bioactive compounds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) by-products. *Journal of the Science of Food & Agriculture* **95**(1):44.
- Fuji Chemical Industry Co., L. 2012. Spray Drying Technology. p. 2.
- García, M.A. y Ragazzo, A. 2000. Mathematical modeling of continuous dryers using the heat and mass transfer properties and product-air equilibrium relation. *Drying Technology* **18**(1-2):67-80.
- García-Salas, P., Gómez-Caravaca, A.M., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A. y Fernández-Gutiérrez, A. 2014. Identification and quantification of phenolic compounds in diverse cultivars of eggplant grown in different seasons by high-performance liquid chromatography coupled to diode array detector and electrospray-quadrupole-time of flight-mass spectrometry. *Food Research International* **57**:114-122.
- Geankoplis, C. 2003. Transport processes and separation process principles (includes unit operations), 4ª ed. E.U.A.: Prentice Hall Press.
- Georgetti, S.R., Casagrande, R., Souza, C.R.F., Oliveira, W.P. y Fonseca, M.J.V. 2008. Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* **41**(8):1521-1527.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. y Saurel, R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International* **40**(9):1107-1121.
- Ghasi, S., Nwobodo, E. y Ofili, J.O. 2000. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* **69**(1):21-25.
- Göğüş, F. y Maskan, M. 2006. Air drying characteristics of solid waste (pomace) of olive oil processing. *Journal of Food Engineering* **72**(4):378-382.
- Gomes, T. y Caponio, F. 2001. Possibility of improving the quality characteristics of olive-pomace oil and enhancing its differentiation from refined olive-pomace oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**(1):62-67.
- Greenspan, L. 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards* **81**(1):89-96.
- Gyamfi, E., Kwarteng, I., Ansah, M., Anim, A., Ackah, M., Kpattah, L. y Bentil, N.O. 2011. Effects of processing on *Moringa oleifera*. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences* **1**(3-4):179-185.



- Heleno, S.A., Prieto, M.A., Barros, L., Rodrigues, A., Barreiro, M.F. y Ferreira, I.C.F.R. 2016. Optimization of microwave-assisted extraction of ergosterol from *Agaricus bisporus* L. by-products using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology* **100**(Part A):25-35.
- Hellin, P., Manso, A., Flores, P. y Fenoll, J. 2010. Evolution of aroma and phenolic compounds during ripening of 'superior seedless' grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**(10):6334-6340.
- Hongbo, C., Jiangbo, W., Xintian, D., Yan, H., Qiaoli, M., Yudian, D., Fei, Z., Jiancheng, Z., Haijiang, C., Qiang, X., Juan, X. y Xiuxin, D. 2015. Carotenoid accumulation affects redox status, starch metabolism, and flavonoid/anthocyanin accumulation in citrus. *BMC Plant Biology* **15**(1):1-16.
- Huang, L., Kumar, K. y Mujumdar, A.S. 2004. Simulation of a Spray Dryer Fitted with a Rotary Disk Atomizer Using a Three-Dimensional Computational Fluid Dynamic Model. *Drying Technology* **22**(6):1489-1515.
- Huang, L. y Mujumdar, A.S. 2007. Simulation of an Industrial Spray Dryer and Prediction of Off-Design Performance. *Drying Technology* **25**(4):703-714.
- Huang, L.X., Passos, M.L., Kumar, K. y Mujumdar, A.S. 2005. A Three-Dimensional Simulation of a Spray Dryer Fitted with a Rotary Atomizer. *Drying Technology* **23**(9-11):1859-1873.
- Huesca-Osorio, C.A. 2014. Dinámica de la evaporación de mezclas complejas: aplicación al extracto de vainilla. Veracruz, México: Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz.
- Iqbal, S. y Bhanger, M.I. 2006. Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. *Journal of Food Composition and Analysis* **19**(6-7):544-551.
- Jäger, K.F. y Kilbride, T.J., inventors. 1997. Productos sólidos de cloruro de mepicuato y cloruro de clormecuato altamente concentrados.
- Jongrungruangchok, S., Bunrathap, S. y Songsak, T. 2010. Nutrients and minerals content of eleven different samples of *Moringa oleifera* cultivated in Thailand. *International Journal of Health Research* **24**(3):123-127.
- Joshi, P. y Mehta, D. 2010. Effect of dehydration on the nutritive value of drumstick leaves. *Journal of Metabolomics and Systems Biology* **1**(1):5-9.
- Karaaslan, İ. y Dalgıç, A.C. 2012. Spray drying of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) extract. *Journal of Food Science and Technology*:12.
- Kaufmann, B. y Christen, P. 2002. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis* **13**(2):105-113.
- Kaymak-Ertekin, F. y Sultanoğlu, M. 2001. Moisture sorption isotherm characteristics of peppers. *Journal of Food Engineering* **47**(3):225-231.
- Kha, T.C., Nguyen, M.H. y Roach, P.D. 2010. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering* **98**(3):385-392.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R. y Nithyanandam, R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioprocess Technology* **89**(3):217-233.
- Lang, Q. y Wai, C.M. 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - a practical review. *Talanta* **53**(4):771-782.
- Liang, Y.-Z., Xie, P. y Chan, K. 2004. Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B* **812**(1):53-70.
- Loewus, F.A. 1999. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry* **52**(2):193-210.
- Luna-Solano, G., Salgado-Cervantes, M.A., Rodríguez-Jimenes, G.C. y García-Alvarado, M.A. 2005. Optimization of brewer's yeast spray drying process. *Journal of Food Engineering* **68**(1):9-18.
- Luque de Castro, M.D. y García-Ayuso, L.E. 1998. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta* **369**(1-2):1-10.
- M'hiri, N., Ioannou, I., Mihoubi Boudhrioua, N. y Ghoul, M. 2015. Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. *Food and Bioprocess Technology* **96**:161-170.



- Manukyan, A. 2013. Effects of PAR and UV- B Radiation on Herbal Yield, Bioactive Compounds and Their Antioxidant Capacity of Some Medicinal Plants Under Controlled Environmental Conditions. *Photochemistry & Photobiology* **89**(2):406-414.
- Miller, D.A., Ellenberge, D. y Gil, M. 2012. Spray-Drying Technology. En: Formulating Poorly Water Soluble Drugs. Editado por: Williams III, R.O., Watts, A.B. y Miller, D.A. New York, NY: Springer. p. 363-442.
- Moraga, G., Igual, M., García-Martínez, E., Mosquera, L.H. y Martínez-Navarrete, N. 2012. Effect of relative humidity and storage time on the bioactive compounds and functional properties of grapefruit powder. *Journal of Food Engineering* **112**(3):191-199.
- Moreira, G.É.G., Azeredo, H.M.C.D., Medeiros, M.D.F.D.D., Brito, E.S.D. y Souza, A.C.R.D. 2010. Ascorbic acid and anthocyanin retention during spray drying of *Acerola pomace* extract. *Journal of Food Processing and Preservation* **34**(5):915-925.
- Moyer, R.A., Hummer, K.E., Finn, C.E., Frei, B. y Wrolstad, R.E. 2001. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(3):519-525.
- Moyo, B., Oyedemi, S., Masika, P.J. y Muchenje, V. 2012. Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera* leaves/sunflower seed cake. *Meat Science* **91**(4):441-447.
- Mujumdar, A.S. 2006. Handbook of industrial drying. Philadelphia, EUA: CR Press Taylor and Francis Group.
- Müller, A.K., Ruppel, J., Drexel, C.P. y Zimmermann, I. 2008. Precipitated silica as flow regulator. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **34**(4-5):303-308.
- Nambiar, R.B., Sellamuthu, P.S. y Perumal, A.B. 2017. Microencapsulation of Tender Coconut Water by Spray Drying: Effect of *Moringa oleifera* Gum, Maltodextrin Concentrations, and Inlet Temperature on Powder Qualities. *Food and Bioprocess Technology* **10**(9):1668-1684.
- Ndhkala, A.R., Mulaudzi, R., Ncube, B., Abdelgadir, H.A., du Plooy, C.P. y Van Staden, J. 2014. Antioxidant, antimicrobial and phytochemical variations in thirteen *Moringa oleifera* Lam. cultivars. *Molecules* **19**(7):10480-10494.
- Norma-Oficial-Mexicana. 2002. NOM-021-SEMARNAT-2000. Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México: Diario Oficial de la Federación.
- Ocón-García, J. y Tojo-Barreiro, G. 1986. Problemas de ingeniería química.: Aguilar S.A. de Ediciones.
- Ógáin, O.N., Tajber, L., Corrigan, O.I. y Healy, A.M. 2012. Spray drying from organic solvents to prepare nanoporous/nanoparticulate microparticles of protein: excipient composites designed for oral inhalation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **64**(9):1275-1290.
- Olgún-Rojas, J.A. 2014. Optimización del proceso de extracción de la oleoresina de chile habanero (*Capsicum chinense*). Veracruz, México: Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz.
- Oliveira, W.P., Bott, R.F. y Souza, C.R.F. 2006. Manufacture of Standardized Dried Extracts from Medicinal Brazilian Plants. *Drying Technology* **24**(4):523-533.
- Olson, M.E. y Alvarado-Cárdenas, L.O. 2016. ¿Dónde cultivar el árbol milagro, *Moringa oleifera*, en México? Un análisis de su distribución potencial. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **87**(3):1089-1102.
- Olson, M.E. y Fahey, J.W. 2011. *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **82**(4):1071-1082.
- Pal, S.K., Mukherjee, P.K. y Saha, B. 1995. Studies on the antiulcer activity of *Moringa oleifera* leaf extract on gastric ulcer models in rats. *Phytotherapy Research* **9**(6):463-465.
- Palencia, C., Nava, J., Herman, E., Rodríguez-Jimenes, G. y García-Alvarado, M. 2002. Spray drying dynamic modeling with a mechanistic model. *Drying Technology* **20**(3):569-586.
- Pang, S.F., Yusoff, M.M. y Gimbin, J. 2014. Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of *Orthosiphon stamineus* extracts. *Food Hydrocolloids* **37**:159-165.
- Papadakis, S.E., Gardeli, C. y Tzia, C. 2006. Spray drying of raisin juice concentrate. *Drying Technology* **24**(2):173-180.



- Páramo, D.E. 2005. Efecto de la adición de goma arábiga y maltodextrina sobre las propiedades del ajo deshidratado por aspersión. Ingeniería de Alimentos. Veracruz, México: Instituto Tecnológico de Veracruz.
- Paudel, A., Worku, Z.A., Meeus, J., Guns, S. y Van den Mooter, G. 2013. Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. *International Journal of Pharmaceutics* **453**(1):253-284.
- Pereira de Souza, T., Martinez, R., Gomez-Amoza, J.L. y Petrovick, P.R. 2007. Eudragit E as excipient for production of granules and tablets from *Phyllanthus niruri* L spray-dried extract. *AAPS PharmSciTech* **8**(2):34.
- Pérez-Landa, I.D. 2013. Efecto de diferentes métodos de secado sobre la retención de antioxidantes en hojas de *Moringa oleifera*. Veracruz, México: Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz.
- Perry, R.H., Green, D.W. y Maloney, J.O. 1984. Perry's Chemical Engineers Handbook, 6th ed.: McGraw-Hill.
- Praveen, K., Duduku, K. y Awang, B. 2008. Selection of optimum process, solvent and drying method for extraction of antioxidants. *Jurnal Teknologi* **48**(F):85-98.
- Premi, M., Sharma, H., Sarkar, B. y Singh, C. 2010. Kinetics of drumstick leaves (*Moringa oleifera*) during convective drying. *African Journal of Plant Science* **4**(10):391-400.
- Rajabi, H., Ghorbani, M., Jafari, S.M., Sadeghi Mahoonak, A. y Rajabzadeh, G. 2015. Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. *Food Hydrocolloids* **51**:327-337.
- Rakotondramasy, L., Havet, J.L., Porte, C. y Fauduet, H. 2007. Solid-liquid extraction of protopine from *Fumaria officinalis* L.—Analysis determination, kinetic reaction and model building. *Separation and Purification Technology* **54**(2):253-261.
- Ramel, F., Mialoundama, A.S. y Havaux, M. 2013. Nonenzymic carotenoid oxidation and photooxidative stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* **64**(3):799-805.
- Ranganna, S. 1999. Handbook of analysis and quality control for fruit and vegetable products, 2nd ed. New Delhi, India: Tata McGraw-Hill Education.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **26**(9):1231-1237.
- Reimberg, M.C.H., Colombo, R. y Yariwake, J.H. 2009. Multivariate analysis of the effects of soil parameters and environmental factors on the flavonoid content of leaves of *Passiflora incarnata* L., Passifloraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **19**(4):853-859.
- Reineccius, G.A. 2004. The Spray Drying of Food Flavors. *Drying Technology* **22**(6):1289-1324.
- Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N. y Pohl, C. 1996. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry* **68**(6):1033-1039.
- Rodriguez, D.B. 2001. A guide to carotenoid analysis in foods. ILSI press Washington, DC.
- Rodríguez-Jimenes, G.C., Vargas-García, A., Espinoza-Pérez, D.J., Salgado-Cervantes, M.A., Robles-Olvera, V.J. y García-Alvarado, M.A. 2013. Mass Transfer During Vanilla Pods Solid Liquid Extraction: Effect of Extraction Method. *Food and Bioprocess Technology* **6**(10):2640-2650.
- Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Fernández-Gutiérrez, A. y Segura-Carretero, A. 2015. Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. *Industrial Crops and Products* **66**:246-254.
- Romdhane, M. y Gourdon, C. 2002. Investigation in solid-liquid extraction: influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal* **87**(1):11-19.
- Roustapour, O.R., Hosseinalipour, M., Ghobadian, B., Mohaghegh, F. y Azad, N.M. 2009. A proposed numerical-experimental method for drying kinetics in a spray dryer. *Journal of Food Engineering* **90**(1):20-26.
- Ruiz-Rodríguez, A., Carrera, C.A., Setyaningsih, W., Barbero, G.F., Ferreira-González, M., Palma, M. y Barroso, C.G. 2017. Tryptophan Levels during Grape Ripening: Effects of Cultural Practices. *Molecules* **22**(6):941.
- Şahin, H., Torun, M. y Özdemir, F. 2011. Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. *LWT - Food Science and Technology* **44**(7):1626-1635.



- Şahin-Nadeem, H., Dinçer, C., Torun, M., Topuz, A. y Özdemir, F. 2013. Influence of inlet air temperature and carrier material on the production of instant soluble sage (*Salvia fruticosa* Miller) by spray drying. *LWT - Food Science and Technology* **52**(1):31-38.
- Salgado-Cervantes, M.A., Garcia-Alvarado, M.A. y Waliszewski-Kubiak, K.N. 1994. Modeling of water activity and enthalpy of water sorption in cassava chips. *Drying Technology* **12**(7):1743-1752.
- Sansone, F., Mencherini, T., Picerno, P., d'Amore, M., Aquino, R.P. y Lauro, M.R. 2011. Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. *Journal of Food Engineering* **105**(3):468-476.
- Sass, A. y Lee, G. 2014. Evaluation of some water-miscible organic solvents for spray-drying enzymes and carbohydrates. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **40**(6):749-757.
- Shih, M.C., Chang, C.M., Kang, S.M. y Tsai, M.L. 2011. Effect of different parts (leaf, stem and stalk) and seasons (summer and winter) on the chemical compositions and antioxidant activity of *Moringa oleifera*. *International Journal of Molecular Sciences* **12**(9):6077-6088.
- Shirsath, S., Sonawane, S. y Gogate, P. 2012. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations - A review of current status. *Chemical Engineering and Processing* **53**:10-23.
- Siddhuraju, P. y Becker, K. 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agro-climatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(8):2144-2155.
- Simon-Brown, K., Solval, K.M., Chotiko, A., Alfaro, L., Reyes, V., Liu, C., Dzandu, B., Kyereh, E., Goldson Barnaby, A., Thompson, I., Xu, Z. y Sathivel, S. 2016. Microencapsulation of ginger (*Zingiber officinale*) extract by spray drying technology. *LWT - Food Science and Technology* **70**:119-125.
- Singh, B.N., Singh, B., Singh, R., Prakash, D., Dhakarey, R., Upadhyay, G. y Singh, H. 2009. Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food and Chemical Toxicology* **47**(6):1109-1116.
- Singh, R.P. y Heldman, D.R. 2009. Introduction to Food Engineering, 4a ed. San Diego, California. USA: Food Science and Technology. International Series.
- Smith, R.M. 2002. Extractions with superheated water. *Journal of Chromatography A* **975**(1):31-46.
- Sollohub, K. y Cal, K. 2010. Spray drying technique: II. Current applications in pharmaceutical technology. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **99**(2):587-597.
- Souza, C.R. y Oliveira, W.P. 2006. Powder properties and system behavior during spray drying of *Bauhinia forficata* Link extract. *Drying Technology* **24**(6):735-749.
- Sreelatha, S. y Padma, P. 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition* **64**(4):303-311.
- Stefan, G. y Chantal, B. 2005. The Challenges of Chemical Stability Testing of Herbal Extracts in Finished Products Using State-of-the-Art Analytical Methodologies. *Current Pharmaceutical Analysis* **1**(2):203-215.
- Sultana, B., Anwar, F. y Ashraf, M. 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules* **14**(6):2167-2180.
- Tamura, Y. y Nishibe, S. 2002. Changes in the concentrations of bioactive compounds in plantain leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(9):2514-2518.
- Tende, J., Ezekiel, I., Dikko, A. y Goji, A. 2011. Effect of ethanolic leaves extract of *Moringa oleifera* on blood glucose levels of streptozocin-induced diabetics and normoglycemic wistar rats. *British Journal of Pharmacology* **2**(1):1-4.
- Tzia, C. 2003. Optimization. En: Extraction Optimization in Food Engineering. Editado por: Tzia, C. y Liakadis, N. Nueva York: Marcel-Dekker, Inc. p. 35-55.
- Valpuesta, V. y Botella, M.A. 2004. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends in Plant Science* **9**(12):573-577.
- Vázquez, L.A. 2013. Efecto de las variables del proceso de secado por aspersión sobre compuestos bioactivos de extracto de hojas de *Moringa oleifera*. Veracruz, México: Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz.
- Vega, H., Gongora, M.M. y Barbosa, G.V. 2001. Advances in dehydration of foods. *Journal of Food Engineering* **49**(4):271-289.



- Verma, A.R., Vijayakumar, M., Mathela, C.S. y Rao, C.V. 2009. In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food and Chemical Toxicology* **47**(9):2196-2201.
- Vetal, M.D., Lade, V.G. y Rathod, V.K. 2012. Extraction of ursolic acid from *Ocimum sanctum* leaves: Kinetics and modeling. *Food and Bioproducts Processing* **90**(4):793-798.
- Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry* **8**(3):303-313.
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y. y Gritsanapan, W. 2013. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products* **44**:566-571.
- Wang, L., Li, D., Bao, C., You, J., Wang, Z., Shi, Y. y Zhang, H. 2008. Ultrasonic extraction and separation of anthraquinones from *Rheum palmatum* L. *Ultrasonics Sonochemistry* **15**(5):738-746.
- Wang, L. y Weller, C.L. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* **17**(6):300-312.
- Wang, Q.-e., Ma, S., Fu, B., Lee, F.S.C. y Wang, X. 2004. Development of multi-stage countercurrent extraction technology for the extraction of glycyrrhizic acid (GA) from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Biochemical Engineering Journal* **21**(3):285-292.
- Wijngaard, H., Hossain, M.B., Rai, D.K. y Brunton, N. 2012. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International* **46**(2):505-513.
- Woo, M.W., Wan Daud, W.R., Tasirin, S.M. y Talib, M.Z.M. 2007. Effect of Wall Surface Properties at Different Drying Kinetics on the Deposition Problem in Spray Drying. *Drying Technology* **26**(1):15-26.
- Xie, Z., Liu, X., Chen, Y. y Wang, L. 2009. Pilot-Scale Multi-Stage Countercurrent Extraction of Scutellarein from *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand-Mazz. *Separation Science and Technology* **44**(5):1250-1260.
- Yassa, H.D. y Tohamy, A.F. 2014. Extract of *Moringa oleifera* leaves ameliorates streptozotocin-induced Diabetes mellitus in adult rats. *Acta Histochemica* **116**(5):844-854.
- Yu, C.-h., Chen, J., Xiong, Y.-k., Li, X.-x., Dai, X.-y. y Shi, C.-c. 2012. Optimization of multi-stage countercurrent extraction of antioxidants from Ginkgo biloba L. leaves. *Food and Bioproducts Processing* **90**(2):95-101.
- Zhang, Q., Bian, Y., Shi, Y., Zheng, S., Gu, X., Zhang, D., Zhu, X., Wang, X., Jiang, D. y Xiong, Q. 2015. An economical and efficient technology for the extraction of resveratrol from peanut (*Arachis hypogaea*) sprouts by multi-stage countercurrent extraction. *Food Chemistry* **179**:15-25.
- Zhao, S., Kwok, K. y Liang, H. 2007. Investigation on ultrasound assisted extraction of saikosaponins from *Radix Bupleuri*. *Separation and Purification Technology* **55**(3):307-312.
- Zou, T.B., Wang, M., Gan, R.Y. y Ling, W.H. 2011. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from mulberry, using Response Surface Methodology. *International Journal of Molecular Sciences* **12**(12):3006-3017.

Tesis Doctoral





APÉNDICES

UCA

Tesis Doctoral



APENDICE A

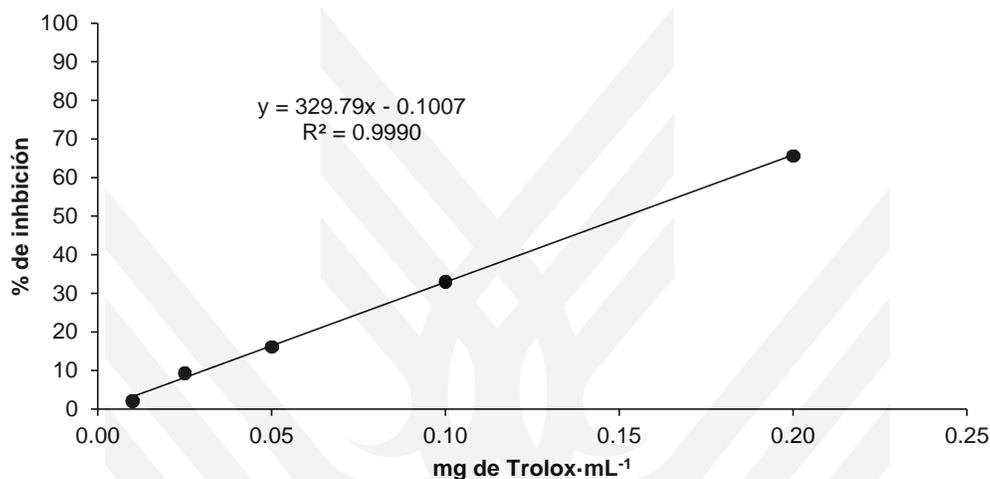


FIGURA A.1 Curva de calibración de trolox para la determinación de actividad antirradical por ensayo DPPH utilizando como disolvente etanol:agua 80:20 (p/p).

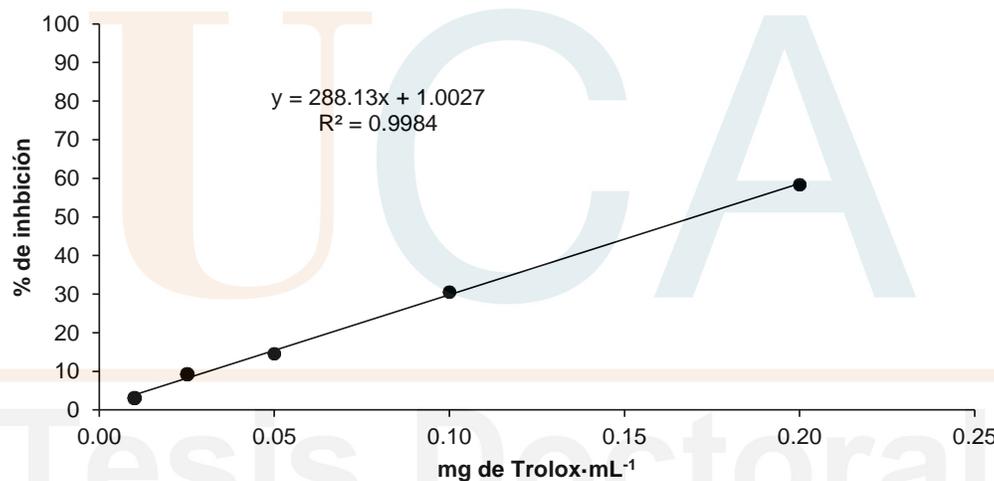


FIGURA A.2 Curva de calibración de trolox para la determinación de actividad antirradical por ensayo ABTS utilizando como disolvente etanol:agua 80:20 (p/p).

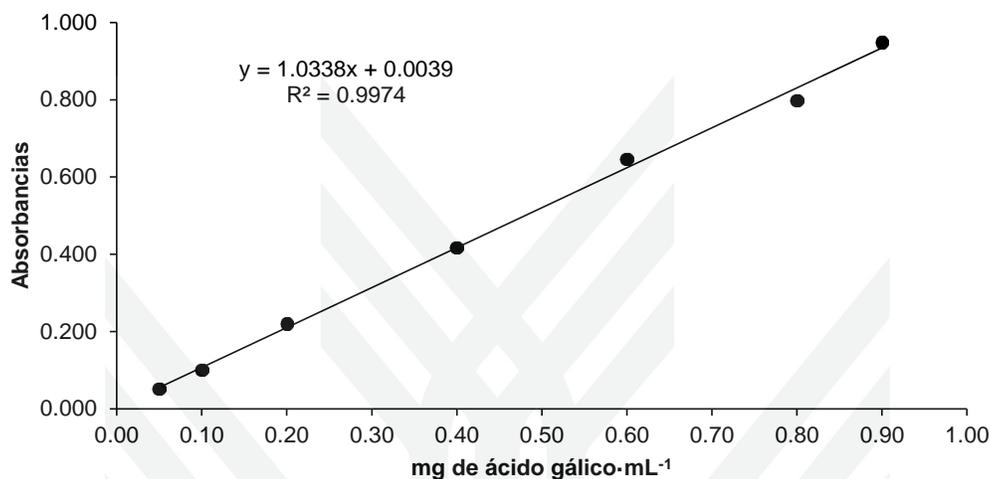


FIGURA A.3 Curva de calibración de ácido gálico para la determinación del contenido de fenoles totales utilizando como disolvente etanol:agua 80:20 (p/p).

UCA

Tesis Doctoral

APENDICE B

La curva de calibración de la Figura B.1 se realizó con una solución madre de ácido gálico de 0.1 mg·mL⁻¹, la cual se diluyó a 0.00625, 0.01250, 0.02500, 0.05000, 0.02500 y 0.07500 mg·mL⁻¹. Mientras que la curva de calibración de la Figura B.2 se realizó con una solución madre de ácido gálico de 0.1 mg·mL⁻¹ la cual se diluyó a 0.00625, 0.01250, 0.02500 y 0.05000 mg·mL⁻¹.

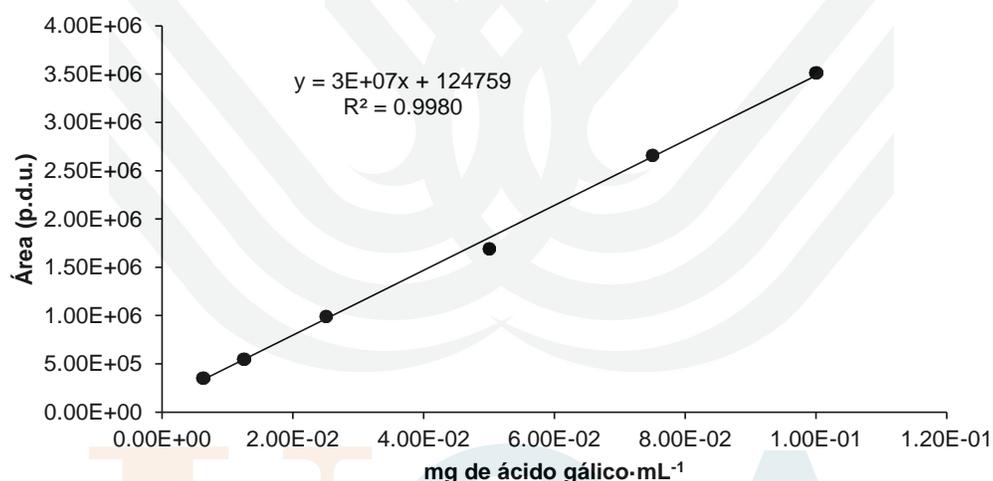


FIGURA B.1 Curva de calibración de ácido gálico (pureza: 97.9%) por HPLC. Concentración de ácido gálico (en mg·mL⁻¹) versus área de los picos (en unidades definidas por procedimiento, p.d.u. por sus siglas en inglés). Inyección de 10 µL. Detección a 260 nm, velocidad de flujo de 1.30 mL·min⁻¹, columna C18 (150 mm x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm) y elución isocrática: 60% ácido acético al 1% en agua y 40% metanol.

Tesis Doctoral



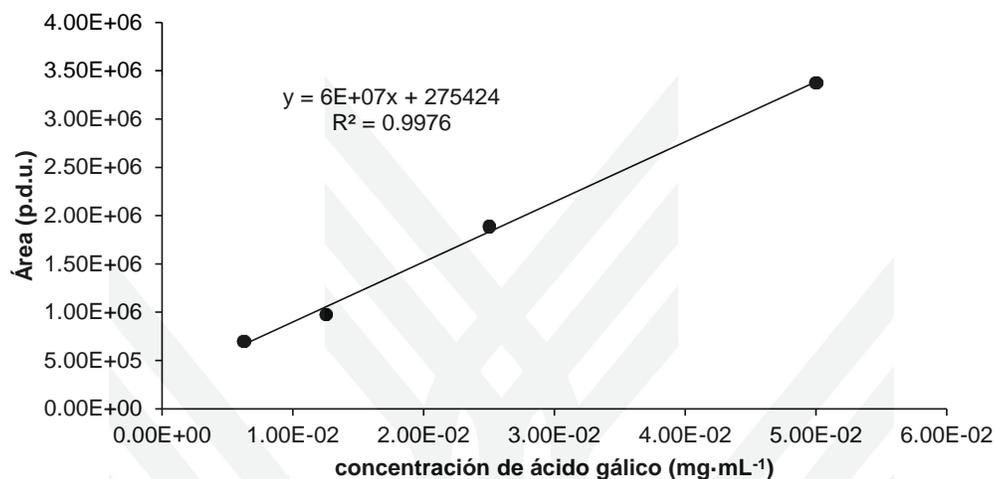


FIGURA B.2 Curva de calibración de ácido gálico (pureza: 97.9%) por HPLC. Concentración de ácido gálico (en mg·mL⁻¹) versus área de los picos (en unidades definidas por procedimiento, p.d.u. por sus siglas en inglés). Inyección de 20 µL. Detección a 260 nm, velocidad de flujo de 1.30 mL·min⁻¹, columna C18 (150 mm x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm) y elución isocrática: 60% ácido acético al 1% en agua y 40% metanol.

UCA

Tesis Doctoral

APENDICE C

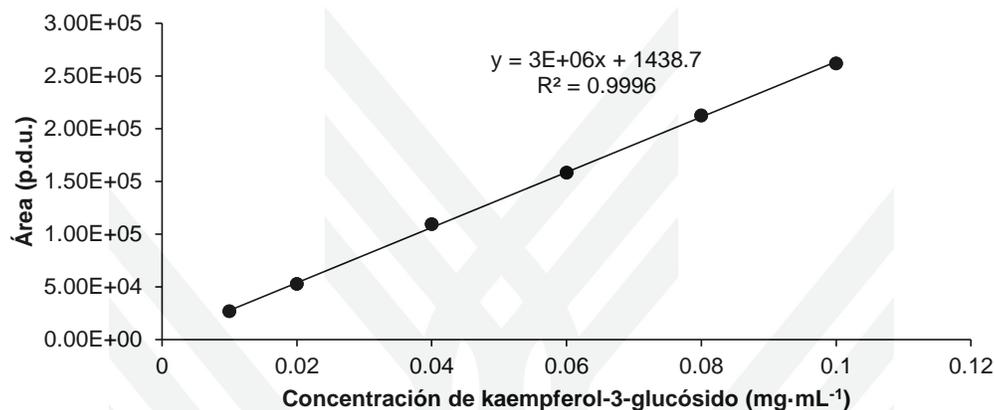


FIGURA C.1 Curva de calibración de kaempferol-3-glucósido (pureza: > 99.0%) por UHPLC. Concentración de kaempferol-3-glucósido (en mg·mL⁻¹) versus área de los picos (en unidades definidas por procedimiento, p.d.u. por sus siglas en inglés).

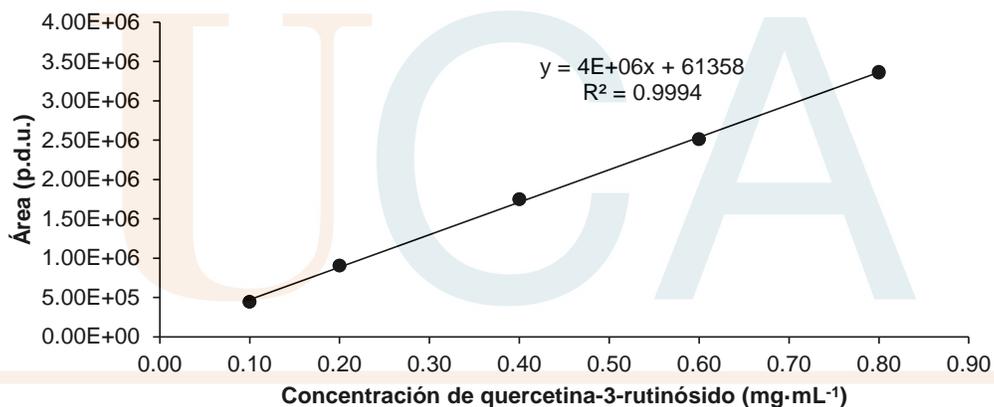


FIGURA C.2 Curva de calibración de quercetina-3-rutinósido (rutina) (pureza: 99.5%) por UHPLC. Concentración de ácido gálico (en mg·mL⁻¹) versus área de los picos (en unidades definidas por procedimiento, p.d.u. por sus siglas en inglés).