



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Mérida

DEPARTAMENTO DE FÍSICA APLICADA

**“Extracción de metabolitos secundarios de hojas de chaya
(*Cnidoscolus aconitifolius*): caracterización fisicoquímica,
evaluación y aprovechamiento de biomasa”**

TESIS

Que presenta

Viviana Roche Llerena

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

en

Fisicoquímica

Directores de Tesis:

Dra. María Antonieta Fernández Herrera

Dr. Geonel Rodríguez Gattorno

Mérida, Yucatán, México

Agosto de 2023

Agradecimientos

“Expresar gratitud es un estado natural del ser y nos recuerda que todos estamos conectados”

Valerie Elster

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han apoyado a lo largo de esta investigación y contribuido de diversas formas para que este proyecto fuera posible.

En primer lugar, deseo agradecer a mis directores de tesis, **Dra. Marieta Fernández** y **Dr. Geonel Rodríguez**, por su guía experta, su paciencia y dedicación en cada etapa de este trabajo. Sus conocimientos y orientación fueron fundamentales para el desarrollo y éxito de esta investigación.

No puedo dejar de mencionar a **Leonardo** por su colaboración y compañerismo en este proyecto, por brindarme y presentarme a la chaya. Su dedicación y contribuciones fueron fundamentales para llevar a cabo los experimentos y obtener resultados significativos.

También quiero agradecer a todos los profesores del CINVESTAV-Mérida por contribuir a mi formación como Maestra en Ciencias y en especial a los miembros del comité sinodal por su valioso tiempo y sus comentarios constructivos durante las revisiones y defensa de esta tesis. Sus sugerencias y aportes enriquecieron considerablemente mi trabajo. A CONAHCYT por el apoyo económico a través de la beca 1155080.

Al Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales, Cinvestav-IPN (LANNBIO) financiado por los proyectos FOMIX-Yucatán 2008-108160, CONACYT LAB-2009-01-123913, 292692, 294643, 188345 y 204822; al **M.C. Daniel Aguilar Treviño** por la obtención de los DRX, al **M.C. José Bante Guerra**, **Ing. Willian Cauich Ruiz** y **Dr. William Santiago González Gómez** por el apoyo con las técnicas de caracterización, al **M.C. Jair García Méndez** y la **Dra. Mónica Díaz Fernández** por la ayuda en la realización e interpretación de los estudios de RMN, al **Dr. Leonardo Hernández Pat** por los resultados de SEM y al **Dr. Adolfo López Torres** de la UNPA por la espectrometría de masas de alta resolución.

Mi reconocimiento especial va dirigido a mis padres, **Vivian** y **Antonio** y a toda mi familia, por su apoyo incondicional, amor y sacrificio. Su confianza en mí y su constante aliento fueron los pilares que me impulsaron a alcanzar mis metas académicas. A mi esposo **Javier**, sin ti nada de esto sería posible, gracias.

Agradezco también a mis amigos y seres queridos por su apoyo emocional y palabras de aliento en los momentos más desafiantes. Su presencia y ánimo positivo fueron un gran estímulo para seguir adelante. A mis amigos de toda la vida, a los que me acogieron: **Dallelys, Charly, Silvana, Alan, Goyo, Nallybe**, a mis amigos del laboratorio **Diana, Lupita, Luis, Juan Pablo, Jair y Moni**, gracias también por toda la ayuda y porque sigan sobrando las risas. A mis compañeros de estudio. A mi familia acá **Elier y Ale**, a **Raúl** siempre con la disposición de ayudar como el hermano mayor.

A todos, mi más sincero agradecimiento por su valioso apoyo, confianza y contribuciones. Este logro es también suyo. ¡Muchas gracias!

Resumen

La chaya o chayamansa (*Cnidoscolus aconitifolius*) es un arbusto de rápido crecimiento cuya especie es endémica de la península de Yucatán. Ésta se cultiva con fines medicinales y de consumo humano, fundamentalmente en el sur de México, Centroamérica y algunas regiones de África. El uso de esta planta se remonta a la época precolombina. En la actualidad, existen muy pocos estudios que indiquen las posibles aplicaciones químicas, biológicas y fisicoquímicas que puedan presentar sus extractos. En el presente trabajo, se evalúa una metodología para la extracción de metabolitos secundarios en las hojas de la planta, así como su separación, caracterización y aprovechamiento de la biomasa residual. También, se hace una comparativa de la influencia de la temperatura y disolvente en dichos extractos. Para la extracción, se utilizaron técnicas de calentamiento por reflujo y en reactor de microondas, utilizando como disolventes hexano, acetato de etilo e isopropanol, los metabolitos fueron separados por cromatografía de columna utilizando como fase móvil una mezcla de hexano/acetato de etilo y como fase estacionaria gel de sílice. Una vez aisladas, las fracciones obtenidas se caracterizaron por UV-Vis, FT-IR, RMN y EMAR. Los resultados indican la presencia, fundamentalmente, de ácidos grasos en las fracciones obtenidas, también se propone la estructura del producto natural saliramofenol para el metabolito aislado clasificado como C1R1. Con la biomasa residual fue obtenido un material carbonoso que fue caracterizado y utilizado para formar un material compuesto C-TiO₂ que demostró tener excelentes propiedades como fotocatalizador en la degradación del azul de metileno. La separación y análisis espectroscópico profundo del resto de los principales constituyentes de las hojas, su evaluación biológica y la continuación de la investigación del uso de la biomasa residual, forman parte del esfuerzo actual.

Abstract

Chaya or chayamansa (*Cnidoscolus aconitifolius*) is a fast-growing shrub endemic to the Yucatan Peninsula. It is cultivated for medicinal and human consumption purposes, primarily in Southern Mexico, Central America, and some regions of Africa. The use of this plant dates to pre-Columbian times. Currently, very few studies indicate the possible chemical, biological, and physicochemical applications that its extracts may present. In this study, a methodology for the extraction of secondary metabolites in the plant's leaves, as well as their separation, characterization, and utilization of residual biomass, is evaluated. The influence of temperature and solvent on these extracts is compared. For extraction, reflux heating and microwave reactor techniques were used. Hexane, ethyl acetate, and isopropanol were chosen as solvents, and the metabolites were separated by column chromatography using a mobile phase of hexane/ethyl acetate and silica gel as the stationary phase. Once isolated, the obtained fractions and metabolites were characterized by UV-Vis, FT-IR, NMR, and HRMS. The results indicate the presence of primarily fatty acids in the obtained fractions. The proposed structure of the natural product saliramophenol is suggested for the isolated metabolite classified as C1R1. A carbonaceous material was obtained from the residual biomass, which was characterized and used to form a C-TiO₂ composite material, which demonstrated excellent properties as a photocatalyst in the degradation of methylene blue. The separation and in-depth spectroscopic analysis of the remaining major constituents of the leaves, their biological evaluation, and further research on the use of the residual biomass are part of the current effort.

Contenido

I.	Introducción.....	10
II.	Objetivos.....	11
III.	Antecedentes.....	12
3.1.	Chaya mansa (<i>Cnidocolus aconitifolius</i>).....	12
3.2.	Procesos de obtención de metabolitos secundarios en productos naturales	13
3.3.	Obtención de polvos carbonosos a partir de biomasa.....	16
3.4.	Contaminación por azul de metileno	18
3.4.1.	Degradación del azul de metileno con TiO ₂	20
IV.	Desarrollo experimental	22
4.1.	Recolección y tratamiento de las hojas de chaya.....	22
4.2.	Análisis termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	22
4.3.	Extracción de los metabolitos secundarios	24
4.4.	Cromatografía	25
4.5.	Técnicas de identificación de metabolitos secundarios	25
4.5.1.	Espectroscopía Infrarroja a Transformada de Fourier (FT-IR)	25
4.5.2.	Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	26
4.5.3.	UV-Vis	28
4.5.4.	Espectrometría de Masas	28
4.6.	Tratamiento Térmico de la biomasa residual.....	28
4.7.	Caracterización estructural y morfológica.....	29
4.7.1.	Espectroscopía Raman.....	29
4.7.2.	Difracción de Rayos X (DRX)	29
4.7.3.	Espectroscopía fotoelectrónica de Rayos X (XPS)	30
4.7.4.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Energía Dispersiva de Rayos X (EDS)	30
4.8.	Síntesis del material compuesto para fotocatalisis.....	31
4.9.	Degradación de azul de metileno.....	32
V.	Resultados y discusión	33
5.1.	Extracción de metabolitos secundarios en hojas de chaya.....	33
5.1.1.	Análisis termogravimétrico (TGA)	33
5.1.2.	Influencia del disolvente y la temperatura de extracción	36
5.2.	Extracción de metabolitos mediante la técnica de reflujo con isopropanol.....	38
5.2.1.	Obtención de los metabolitos aislados.....	38

5.2.2. Caracterización de las fracciones y metabolitos obtenidos.	39
5.3. Obtención del material carbonoso a partir de la biomasa residual	49
5.3.1. Caracterización estructural y morfológica.....	50
5.4. Descomposición de azul de metileno.....	53
VI. Conclusiones.....	59
VII. Perspectivas	60
Referencias Bibliográficas.....	61

Índice de figuras

Fig. 1. Fórmula molecular del cloruro de tetrametilitionina (azul de metileno)	19
Fig. 2. Proceso de degradación de azul de metileno por fotocatalisis.....	21
Fig. 3. Proceso de conservación del material vegetal.....	22
Fig. 4. Sistema modular de Análisis Térmico de TA-Instruments. a) termobalanza HR-MTGA y b) calorímetro MDSC	23
Fig. 5. Metodologías de extracción de metabolitos secundarios. a) Extracción a temperatura ambiente, b) extracción asistida por microondas y c) extracción por reflujo.....	24
Fig. 6. Tratamiento térmico de la biomasa residual de la extracción en hojas de chaya	28
Fig. 7. Resultados de síntesis. a) TiO ₂ al 6 % y b) material compuesto C-TiO ₂	31
Fig. 8. Curva TGA de las hojas de chaya verdes en atmósfera de aire	33
Fig. 9. Curva TGA de las hojas de chaya seca en atmósfera de aire.....	34
Fig. 10. Curva DSC de a) chaya seca en atmósfera de aire y b) chaya seca con isopropanol en atmósfera de aire	35
Fig. 11. Influencia de la temperatura en la extracción con isopropanol. a) CCF sin revelar y b) CCF revelada.....	36
Fig. 12. Influencia de la temperatura en la extracción con hexano. a) CCF sin revelar y b) CCF revelada	36
Fig. 13. Influencia de la temperatura en la extracción con acetato de etilo. a) CCF sin revelar y b) CCF revelada.....	37
Fig. 14. Comparación de la CCF de los disolventes utilizados (de izquierda a derecha: isopropanol, hexano y acetato de etilo) con la técnica de reflujo: a) CCF antes del revelado y b) CCF después del revelado	37
Fig. 15. CCF del resultado de la separación del crudo obtenido por reflujo.....	38
Fig. 16. CCF del resultado de la repurificación de la mezcla R1	38
Fig. 17. Caracterización espectroscópica de la mezcla M1: a) UV-Vis, b) FT-IR, c) ¹ H-RMN y d) ¹³ C-RMN.....	40
Fig. 18. Caracterización espectroscópica de la mezcla M2: a) UV-Vis, b) FT-IR, c) ¹ H-RMN y d) ¹³ C-RMN.....	41
Fig. 19. Caracterización espectroscópica de la mezcla M4: a) UV-Vis, b) FT-IR, c) ¹ H-RMN y d) ¹³ C-RMN.....	43

Fig. 20. Caracterización espectroscópica de la mezcla M5: a) UV-Vis, b) FT-IR, c) ¹ H-RMN y d) ¹³ C-RMN.....	44
Fig. 21. Caracterización espectroscópica del metabolito C1-R1: a) UV-Vis, b) FT-IR, c) ¹ H-RMN, d) ¹³ C-RMN y e) Espectrometría de masas de alta resolución modo positivo	46
Fig. 22. Estructura química del saliramofenol	47
Fig. 23. a) Espectrometría de masas de alta resolución modo negativo y b) fragmentos obtenidos.....	48
Fig. 24. TGA de las biomásas residuales de las extracciones a las temperaturas de 40, 80 y 160 °C.....	49
Fig. 25. Caracterización combinada de los materiales carbonosos obtenidos: a) Espectroscopia Raman, b) Difracción de Rayos X, c) Espectroscopia XPS y d) Espectroscopia FT-IR.....	51
Fig. 26. Microscopía electrónica de barrido de los materiales carbonosos obtenidos de las biomásas residuales de las extracciones a las temperaturas de: a) 40 °C, b) 80 °C y c) 160 °C.....	52
Fig. 27. Análisis EDS representativo de los tres materiales carbonosos obtenidos	53
Fig. 28. Difracción de rayos X: a) TiO ₂ al 6 % en masa y b) C-TiO ₂	53
Fig. 29. Microscopía SEM y análisis estructural EDS en: a) TiO ₂ al 6 % y b) C-TiO ₂	54
Fig. 30. Experimento de degradación de azul de metileno	55
Fig. 31. Espectro de absorción UV-Vis de las disoluciones posterior al proceso de descomposición del azul de metileno	56
Fig. 32. Microscopía SEM y análisis EDS de los materiales posterior a la exposición con azul de metileno: a) material carbonoso, b) TiO ₂ y c) C-TiO ₂	57

I. Introducción

Las plantas han sido utilizadas durante siglos para el tratamiento de enfermedades y como fuente primaria de alimentos, materiales y herramientas.¹ Específicamente las plantas consideradas como medicinales contienen metabolitos secundarios que poseen propiedades curativas y/o terapéuticas y su uso ha perdurado a lo largo del tiempo debido a su efectividad y accesibilidad. La medicina herbal se basa en el conocimiento tradicional acumulado a lo largo de generaciones, transmitido de forma oral o escrita.² Sin embargo, en la actualidad, la investigación científica ha permitido validar muchas de estas prácticas ancestrales y comprender mejor los mecanismos de acción de las plantas medicinales. De la misma forma, la ciencia ha permitido desarrollar materiales con innumerables aplicaciones a partir de plantas.

La chaya, específicamente la especie *Cnidoscolus aconitifolius* es una planta originaria de la península de Yucatán, Guatemala y Belice conocida fundamentalmente por su uso en la gastronomía yucateca y es muy apreciada desde la época prehispánica por los mayas. En la literatura, se encuentran estudios que evidencian las propiedades medicinales de esta planta.³⁻⁶ No obstante, la mayoría de los registros de las propiedades brindadas por la chaya son de carácter empírico y los estudios acerca de la composición fitoquímica de la misma son escasos, así como sus posibles aplicaciones, por lo que es importante el estudio de los metabolitos secundarios de las hojas de chaya para encontrar sus posibles aplicaciones.

En este trabajo hemos estudiado diferentes métodos de extracción de hojas de chaya para la obtención de los metabolitos secundarios. De igual forma, con el fin de aprovechar el material vegetal, a partir de la biomasa residual de los procesos de extracción de metabolitos secundarios, se obtuvieron materiales carbonosos. El auge de este tipo de materiales en años recientes es notorio y se debe a las propiedades y características que permiten su aplicación en diversas ramas de la industria, otorgándoles un valor agregado.

II. Objetivos

Objetivo general:

Extraer y separar los metabolitos secundarios de hojas de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) y explorar el aprovechamiento de la biomasa residual en la preparación de materiales compuestos con propiedades fotocatalíticas.

Objetivos específicos:

- Evaluar la influencia de la temperatura y del disolvente en la extracción de los metabolitos secundarios en hojas de chaya.
- Separar las fracciones metabólicas para su caracterización utilizando cromatografía de columna tipo *flash*.
- Obtener un material carbonoso a partir de la biomasa residual del proceso de extracción y su caracterización por diferentes técnicas.
- Evaluar la actividad fotocatalítica del material carbonoso compuesto con dióxido de titanio.

III. Antecedentes

3.1. Chaya mansa (*Cnidoscolus aconitifolius*)

Cnidoscolus aconitifolius, comúnmente conocida como chaya o chaya mansa, es una planta de interés botánico y cultural que ha despertado la atención de la comunidad científica en los últimos años.⁷ Esta planta perenne, perteneciente a la familia Euphorbiaceae es originaria de la península de Yucatán, se ha cultivado y utilizado tradicionalmente en varios países de la región, como México, Belice, Guatemala, Honduras y Nicaragua, tanto por sus propiedades nutricionales como medicinales.⁸ Este arbusto crece en hábitats con poca altitud y clima cálido-húmedo, a veces, cálido-seco. Es un árbol pequeño cuya altura puede alcanzar de 3 a 8 m. Los tallos son largos y suaves. La morfología de las hojas verdes varía según la especie ya que pueden ser alternas, simples o palmatilobadas, con peciolo carnosos y de formas variadas, entre 10 y 20 cm de largo. Las flores son pequeñas y blancas, agrupadas en racimos pequeños al extremo de pedúnculos, son comúnmente vistas durante los meses de verano.⁷ Además, la planta es resistente a condiciones adversas, como la sequía y el suelo pobre, lo que la convierte en una opción atractiva para la agricultura sostenible y la seguridad alimentaria en áreas vulnerables.

Una de las características más destacadas de la chaya es su alto contenido de nutrientes. Las hojas de la chaya son una excelente fuente de proteínas, vitaminas (A, C y E) y minerales (por ejemplo, hierro, calcio y fósforo),⁸ esto hace que su principal uso en México sea como consumo humano en forma de verdura. No obstante, hay estudios donde se reportan características tóxicas o anti nutricionales, como es el alto contenido de cianuro glucogénico presente en hojas y tallos. Este compuesto es un mecanismo de defensa de la planta para rechazar depredadores, por lo que al tener contacto puede provocar comezón y ronchas en la piel de algunas personas. Por esa razón, se realizaron investigaciones que indican que el ácido cianhídrico puede ser eliminado fácilmente por medio de cocción en agua hirviendo por cinco minutos.⁹

Además de su valor nutricional, la chaya ha sido objeto de investigación debido a sus propiedades medicinales. Estudios científicos han demostrado que la chaya posee propiedades antioxidantes,⁴ antiinflamatorias,^{6,10} antimicrobianas³ y antidiabéticas,⁵ entre

otras. Un resumen de los principales estudios sobre esta planta se presenta a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Estudios publicados sobre la chaya.

Especie	Método de extracción	Metabolito identificado	Disolventes	Ref. Año
<i>Cnidoscolus chayamansa</i>	Maceración sucesiva a 25 °C	Esteroles Coumarinas Flavonoides Lignanos Glucósidos cianogénicos	Hexano Acetato de etilo Etanol	2014 ¹⁰
<i>Cnidoscolus aconitifolius</i>	1. Microondas 2. Extracción de agua subcrítica 3. Soxhlet	Compuestos fenólicos	Agua Etanol	2020 ¹¹
<i>Cnidoscolus chayamansa</i>	Convencional a temperatura ambiente	Flavonoides Azúcares Esteroides	Metanol Hexano Éter etílico Acetato de etilo	2003 ¹²
<i>Cnidoscolus aconitifolius</i>	Soxhlet	Alcaloides Flavonoides	Agua Metanol	2016 ³
<i>Cnidoscolus aconitifolius</i>	Maceración 48 h a temperatura ambiente	Fenoles Terpenos Esteroides	Agua Etanol Acetona Acetato de etilo Dietil éter Hexano	2021 ⁵
<i>Cnidoscolus aconitifolius</i>	Convencional a temperatura ambiente	Fenoles Flavonoides	Acetato de etilo Hexano Butanol	2018 ¹³
<i>Cnidoscolus aconitifolius</i>	Convencional a temperatura ambiente	Flavonoides Coumarinas Lignanos Terpenos	Etanol	2015 ¹⁴

3.2. Procesos de obtención de metabolitos secundarios en productos naturales

A partir de las plantas se pueden obtener sustancias con actividad biológica o fisicoquímica, los llamados productos naturales. El proceso general para la obtención de productos bioactivos se describe a continuación. El primer paso es la preparación y selección del material vegetal, donde pueden ser analizadas diferentes partes de la planta, ya sean hojas, tallos o raíces. Por ejemplo, las hojas, se recolectan cortando los tallos, se lavan con

abundante agua y posteriormente con agua destilada. Luego se dejan secar a temperatura ambiente y se procede a deshidratar para poder moler hasta obtener un polvo fino. Las muestras del polvo deben almacenarse en frascos de vidrio a temperatura ambiente.^{15,16} Después se procede a realizar la extracción, donde el método y el disolvente a utilizar varía según el estudio. Es importante la elección del disolvente de interés, este puede ser seleccionado dependiendo de la polaridad con respecto a los productos que se desean obtener.¹⁷ Finalmente se procede a la separación de metabolitos secundarios mediante técnicas de cromatografía. La cromatografía es una técnica ampliamente utilizada en la separación y análisis de metabolitos secundarios en muestras biológicas. Esta se basa en la capacidad de los compuestos para distribuirse entre una fase estacionaria y una fase móvil, permitiendo su separación en función de sus diferentes afinidades por estas fases.¹⁸ La elección de la técnica de cromatografía depende de varios factores, como la naturaleza de los metabolitos, la sensibilidad y selectividad requerida, así como los equipos y recursos disponibles. Además, se pueden utilizar diferentes detectores, como UV-Vis, espectrometría de masas o detectores de fluorescencia, para ayudar la identificación y cuantificación de los metabolitos separados.¹⁹

Existen diferentes técnicas de extracción:

- Extracción a temperatura ambiente, mediante la maceración del material vegetal con el disolvente en agitación constante, esta puede mantenerse por 24, 48 o 72 h, según se estime conveniente.¹⁷
- Extracción continua con Soxhlet, el extractor Soxhlet consta de un matraz redondo conectado a un cartucho y este a su vez, con un condensador vertical. En el matraz se coloca el disolvente y este se calienta, en el cartucho está la muestra sólida, generalmente en forma de polvo o partículas pequeñas. A medida que el disolvente se calienta, comienza a evaporarse y subir por el condensador. Al alcanzar la parte superior del condensador, el disolvente gotea en el cartucho y de ahí pasa al matraz, creando un ciclo continuo de extracción. La extracción con el Soxhlet es especialmente útil cuando se requiere una extracción prolongada y completa de los componentes de la muestra. El ciclo de extracción se repite varias veces, lo que permite una extracción más eficiente y una mayor recuperación de los compuestos de

interés. Además, el uso de un sistema cerrado y un condensador evita la pérdida de disolvente y minimiza la exposición a vapores tóxicos.^{20,21}

- La extracción asistida por microondas (MAE, por sus siglas en inglés) es una de las tecnologías con mayor potencial para la obtención de compuestos bioactivos. En este proceso, la muestra se coloca en un vial, junto con el disolvente de extracción, luego, se somete a radiación de microondas. Las microondas generan calor y energía que se transmiten rápidamente a la muestra, lo que acelera las reacciones químicas y promueve la liberación de los compuestos en el disolvente.²² La MAE ofrece varias ventajas en comparación con las técnicas de extracción convencionales. En primer lugar, permite una extracción más rápida y eficiente debido al calentamiento selectivo de la muestra. Además, la extracción asistida por microondas puede lograr una mayor extracción y mayor rendimiento en comparación con otras técnicas.¹¹ El calentamiento rápido y la mayor eficiencia energética permiten una mayor solubilidad de los compuestos en el disolvente y una mayor transferencia de masa durante el proceso de extracción. Otra ventaja importante es el ahorro de tiempo. La extracción asistida por microondas reduce significativamente el tiempo requerido para la extracción en comparación con los métodos convencionales, lo que permite un aumento en la productividad y la eficiencia de las extracciones,¹¹ sin embargo, la cantidad de material vegetal que se puede procesar en cada vial es reducida.
- Extracción por sistema de reflujo, el proceso de extracción por reflujo se lleva a cabo en un matraz de fondo redondo, donde se colocan la muestra y el disolvente. El matraz se calienta utilizando una manta calefactora, lo que provoca la evaporación del disolvente y la liberación de los compuestos deseados de la muestra. Estos compuestos se mezclan con el disolvente vaporizado el cual asciende hacia el condensador, donde se enfría y condensa nuevamente en forma líquida. Luego, el disolvente condensado gotea sobre la muestra, extrayendo más compuestos y completando el ciclo de extracción. La extracción por reflujo es especialmente útil cuando se requiere una extracción eficiente y completa de los compuestos de la muestra. Al mantener la temperatura constante y proporcionar un ciclo continuo de evaporación y condensación, se logra una extracción más efectiva y una mayor recuperación de los compuestos de interés en comparación con otras técnicas de

extracción, además de que se puede trabajar con una mayor cantidad de material vegetal en cada sistema.^{15,23}

Existen diferentes tipos de cromatografía que se utilizan para la separación de metabolitos secundarios, entre los más comunes se encuentran:¹⁸

- Cromatografía de capa fina (CCF): En esta técnica, una fase estacionaria sólida se deposita en una placa de vidrio o metal, formando una capa fina y uniforme. La muestra se aplica como una mancha en la parte inferior de la placa y luego se coloca en un disolvente, la fase móvil, que asciende por capilaridad a través de la capa estacionaria. Los metabolitos se separan en función de su afinidad por la fase estacionaria y la velocidad de migración en la fase móvil.
- Cromatografía en columna: En esta técnica, la fase estacionaria se empaqueta en una columna de vidrio, plástico o metal. La muestra se carga en la parte superior de la columna y se eluye mediante el paso de un disolvente, la fase móvil, a través de la columna. Los metabolitos se separan en función de su interacción con la fase estacionaria y la velocidad de elución en la fase móvil.
- Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés): Es una variante de la cromatografía en columna que utiliza una alta presión para forzar el paso del disolvente a través de la columna a una velocidad mayor. Esto permite una mayor resolución y eficiencia en la separación de metabolitos secundarios. Además, se pueden utilizar diferentes tipos de columnas y detectores para una mayor selectividad y sensibilidad.
- Cromatografía de gases (GC): En esta técnica, los metabolitos secundarios se convierten en formas volátiles y se separan utilizando una columna capilar y un gas acarreador. Los metabolitos se separan en función de su afinidad por la fase estacionaria y el tiempo de retención en la columna.

3.3. Obtención de polvos carbonosos a partir de biomasa

Los materiales carbonosos son aquellos que contienen carbono como elemento principal en su composición química. Estos materiales pueden encontrarse en diferentes formas y estructuras, lo que les confiere propiedades y aplicaciones diversas.²⁴ Uno de los materiales carbonosos más conocidos es el grafito, que consiste en capas apiladas de átomos de carbono

dispuestos en una estructura hexagonal. El grafito tiene propiedades únicas, como su alta conductividad eléctrica y térmica, lo que lo hace útil en aplicaciones como electrodos, lubricantes y materiales refractarios.²⁵

El carbono puede también formar estructuras bidimensionales como el grafeno. El grafeno es una lámina de carbono de un solo átomo de espesor, con propiedades excepcionales como una alta conductividad eléctrica y mecánica. Debido a estas propiedades, el grafeno se utiliza en aplicaciones como dispositivos electrónicos flexibles, baterías de alta capacidad y materiales compuestos avanzados.²⁶ El principal problema que impide la explotación masiva de materiales base-grafeno, es que la producción es limitada y muy costosa debido a que, en la mayoría de los casos, se requiere de técnicas complejas como exfoliaciones micromecánicas, reducción de monóxido de carbono, deposición de vapor químico, exfoliaciones electroquímicas, entre otras y reactivos de alta pureza.²⁷

Otro material carbonoso destacado es el carbono amorfo, que carece de una estructura ordenada y se encuentra en forma de carbón vegetal, carbón activado y negro de humo. Estos materiales se caracterizan por una amplia superficie específica y tienen excelentes propiedades de adsorción en la filtración de agua, purificación de gases y en la industria química.²⁸

En general, los materiales carbonosos son ampliamente utilizados en diversas industrias debido a sus propiedades únicas. Además, la continua investigación y desarrollo en este campo abre nuevas oportunidades para la creación de materiales carbonosos con propiedades mejoradas y aplicaciones innovadoras.

La exploración de biomasa rica en carbono como fuente para la creación de nuevos materiales carbonosos abre un camino innovador hacia la producción de materiales avanzados de carbono con múltiples aplicaciones en diversas áreas científicas. En la actualidad, se utiliza ampliamente una metodología que implica el uso de tratamientos térmicos (TT) específicos y funcionalización química para obtener materiales carbonosos a partir de fuentes de biomasa vegetal. El propósito principal de esta metodología es mejorar las propiedades químicas y físicas de estos materiales.^{29,30} En la Tabla 2 se presentan algunos de los principales estudios publicados en los cuales se han obtenido materiales carbonosos utilizando biomasa como material de partida. En la mayor parte de los estudios, el proceso térmico se efectúa con atmosferas no oxidantes, esto representa una desventaja pues se exige

un gasto energético y de recursos. Además, los materiales son sometidos a un proceso de funcionalización para modificar las propiedades finales de los mismos, en este sentido es importante que los reactivos que se utilicen para este proceso no sean contaminantes. El aspecto económico y la viabilidad de escalar estos procesos a nivel industrial pueden plantear desafíos significativos que podrían limitar la aplicación de los procesos desarrollados. Además, es importante considerar los factores ambientales y de sostenibilidad asociados con estos procesos. El uso de biomasa como fuente de obtención de materiales carbonosos indiscriminadamente puede perjudicar en gran medida la biodiversidad y aumentar el costo de obtención de estas. Por lo que, en este trabajo se propone de forma paralela el utilizar la biomasa residual de los procesos de extracción de productos naturales en chaya, apelando a una conducta de “cero desperdicios” para obtener los materiales carbonosos utilizando TT en atmósfera de aire.

Tabla 2. Resumen de algunos estudios de obtención de materiales carbonosos a partir de biomasa.

Fuente de obtención	Metodología	Tratamiento	Aplicación	Ref. Año
<i>Sargassum spp</i>	TT en N ₂	KOH HCl N ₂ H ₄	Electrocatalisis	2019 ₂₉
<i>Vatica rassak</i>	TT en N ₂	H ₃ PO ₄	Remoción de Pb ²⁺	2019 ₃₁
Hojas de alcanfor	TT en N ₂	KOH HCl	Supercapacitores	2021 ₃₂
<i>Betula platyphylla</i>	TT en N ₂	FeCl ₃ ·6H ₂ O HCl	Electrocatalisis	2021 ₃₃
Cáscara de arroz	TT en aire	KOH	Supercapacitores	2017 ₃₄
Bagazo de caña de azúcar	TT en aire	Fe(C ₅ H ₅) ₂	Obtención de óxido de grafeno	2015 ₃₅
<i>Phragmites australis</i> <i>Carya illinoensis</i>	TT en aire	H ₂ O ₂	Obtención de óxido de grafeno	2023 ₃₆

3.4. Contaminación por azul de metileno

El azul de metileno, con fórmula molecular presentada en la figura 1 es un compuesto químico utilizado en diversas aplicaciones industriales y médicas. Es un polvo cristalino de

color azul brillante y tiene propiedades físicas y químicas únicas que le otorgan su versatilidad.³⁷

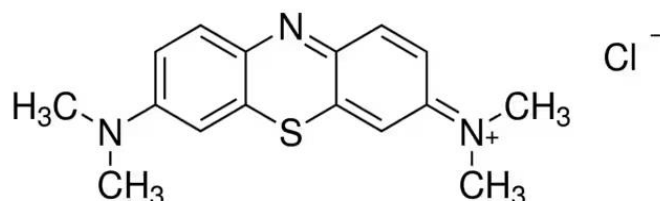


Fig. 1. Fórmula molecular del cloruro de tetrametilitionina (azul de metileno)

En la industria, el azul de metileno se utiliza principalmente como colorante y tinte para textiles, papel y plásticos. También se emplea en la industria alimentaria como aditivo para dar color a productos como caramelos y bebidas. Además, tiene aplicaciones en la fotografía, la impresión y la producción de productos químicos.³⁸ En el ámbito médico, el azul de metileno se utiliza como agente terapéutico en diversas situaciones clínicas. Se ha utilizado históricamente como tratamiento para la intoxicación por cianuro, ya que puede ayudar a convertir el cianuro en una forma menos tóxica. También se ha utilizado en el tratamiento de trastornos neurológicos, como la metahemoglobinemia y la enfermedad de Alzheimer, aunque su eficacia en estos casos es objeto de debate y estudio.³⁹

A pesar de sus amplias aplicaciones, el azul de metileno también presenta ciertos riesgos para la salud y el medio ambiente. Es considerado tóxico y en caso de exposición puede causar irritación en la piel, los ojos y las vías respiratorias.⁴⁰ Además, puede tener efectos adversos en organismos acuáticos y en la vida acuática en general debido a su persistencia y toxicidad, incluyendo la alteración de procesos biológicos y fisiológicos, daño al sistema nervioso y reproductivo, y la muerte de organismos sensibles. Además, el azul de metileno puede bioacumularse en la cadena alimentaria, con consecuencias perjudiciales para los organismos que dependen de los ecosistemas acuáticos para su supervivencia, incluyendo a los seres humanos.³⁸

La liberación incontrolada de azul de metileno en el medio ambiente ya sea a través de los vertidos industriales o el uso inadecuado en aplicaciones médicas, puede resultar en concentraciones significativas en el medio ambiente, en la contaminación del agua y los ecosistemas acuáticos. Por ello, la contaminación por azul de metileno es un problema complejo y multifacético que requiere atención urgente y constante. Es crucial comprender la fuente y los mecanismos de liberación de este compuesto en el medio ambiente, así como

desarrollar estrategias efectivas de mitigación y remediación total o parcial (conversión en moléculas menos dañinas).

3.4.1. Degradación del azul de metileno con TiO_2

El dióxido de titanio (TiO_2) presenta cuatro fases cristalinas: una de alta presión del tipo $\alpha\text{-PbO}_2$, rutilo (estructura tetragonal), brookita (estructura ortorrómbica) y anatasa (estructura octaédrica). Para el rutilo y el TiO_2 tipo $\alpha\text{-PbO}_2$, cada octaedro tiene dos lados comunes con otros octaedros, en la brookita son tres y en la anatasa cuatro los lados compartidos por octaedros.⁴¹ Por tanto, el rutilo y la fase de alta presión suelen ser las formas más estables del TiO_2 , aunque en disolución puede predominar la fase anatasa estabilizada por factores de tensión interfacial a tamaño nanométrico. El dióxido de titanio, especialmente en fase anatasa, es ampliamente utilizado como fotocatalizador por sus propiedades ópticas y electrónicas, bajo costo, estabilidad química y baja toxicidad.⁴²

La degradación del azul de metileno utilizando dióxido de titanio (TiO_2) se basa en un proceso conocido como fotocátalisis heterogénea.⁴³ En este proceso, el TiO_2 actúa como un catalizador que utiliza la energía de la luz para descomponer el azul de metileno en productos menos tóxicos. El TiO_2 es un semiconductor que, cuando es irradiado con luz ultravioleta (UV), genera pares de electrones y huecos en su estructura (conocidos como excitones). Estos electrones y huecos son altamente reactivos y pueden participar en reacciones de oxidación y reducción.^{44,45} El proceso general de degradación se presenta en la figura 2.

Cuando el azul de metileno está en presencia de TiO_2 y se expone a la luz UV, ocurren varias reacciones:

- Adsorción y desorción: El azul de metileno puede adsorberse en la superficie del TiO_2 , lo que aumenta la probabilidad de que se produzcan reacciones de oxidación y reducción. Luego de la degradación, los productos pueden desorberse de la superficie.
- Oxidación directa: Los electrones generados en la superficie del TiO_2 pueden transferirse a la molécula (absorbida en la interfase) de azul de metileno, lo que resulta en la oxidación del compuesto. Esto conduce a la ruptura de los enlaces químicos en el azul de metileno y la formación de productos de degradación.

- Formación de especies reactivas de oxígeno: Los huecos generados en la superficie del TiO_2 pueden reaccionar con moléculas de agua adsorbidas, generando especies reactivas de oxígeno como radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Estos son altamente oxidantes y pueden atacar al azul de metileno, descomponiéndolo en productos más simples.^{45,46}

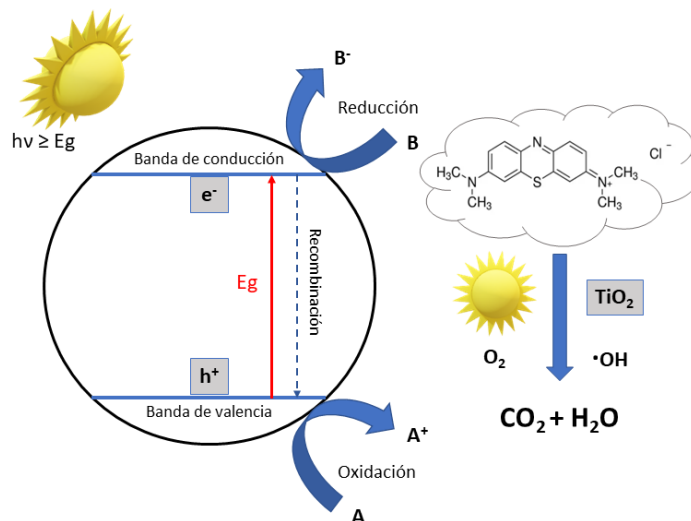


Fig. 2. Proceso de degradación de azul de metileno por fotocatalisis

En general, la fotocatalisis heterogénea con TiO_2 y luz UV es un proceso eficiente para la degradación de compuestos orgánicos, como el azul de metileno. Sin embargo, la eficiencia de degradación puede verse afectada por diversos factores, como la concentración inicial del compuesto, la cantidad, la fase y la actividad del TiO_2 , la intensidad y longitud de onda de la luz UV, el pH del medio y la presencia de otras especies químicas en la disolución. Estos factores deben ser considerados y optimizados para lograr una degradación efectiva del azul de metileno. La estabilización de los portadores de carga (excitones) en la interfase siempre facilita los procesos fotocatalíticos.

IV. Desarrollo experimental

En este capítulo se describen los procesos experimentales desarrollados en este trabajo para la obtención de metabolitos secundarios de hojas de chaya y su identificación, así como el aprovechamiento de la biomasa restante del proceso de extracción en la obtención de materiales carbonosos, caracterización y aplicación de estos como prueba de concepto.

4.1. Recolección y tratamiento de las hojas de chaya

Como material vegetal, se utilizó la especie *Cnidoscolus aconitifolius*, conocida también como chaya mansa, la planta se encuentra ubicada en Mérida, Yucatán. Las hojas fueron recolectadas durante mayo, junio, julio, agosto y septiembre, meses en los que la planta florece.⁷ Estas fueron lavadas con agua corriente para retirarles el polvo e impurezas, posteriormente fueron enjuagadas con agua destilada y secadas a temperatura ambiente por al menos 24 h, posteriormente fueron deshidratadas en horno Binder a 80 °C por 2 h y una vez deshidratadas se trituraron en un molino de cuchillas, luego el material molido fue guardado en frascos herméticos a temperatura ambiente para evitar la rehidratación.⁴⁷ El proceso de recolección y tratamiento se presenta en la figura 3.



Fig. 3. Proceso de conservación del material vegetal

4.2. Análisis termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los equipos de análisis termogravimétrico registran continuamente la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada (inerte u oxidante) en función de la temperatura o del tiempo, al ir aumentando la temperatura del sistema se obtiene información sobre procesos físicos como: desorción, evaporación y sublimación, además de reacciones químicas de descomposición y oxidación.⁴⁸ El análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés)

se realizó con dos objetivos, uno para evaluar los cambios que ocurrían en el material vegetal a la temperatura máxima a la que se harían las extracciones y el segundo, explorar el comportamiento de la biomasa residual ante el aumento de la temperatura. La evaluación termogravimétrica se realizó por separado en atmósfera de aire, en el equipo Discovery de TA-Instruments (figura 4 a)) bajo un flujo igual a 25 ml/min desde temperatura ambiente hasta 160 °C a razón de 5 °C/min, para evaluar los cambios que ocurrían en el material vegetal a la temperatura máxima a la que se harían las extracciones. El TGA sobre la biomasa residual se realizó bajo un flujo de aire igual a 25 ml/min desde temperatura ambiente hasta 800 °C con una rampa de 10 °C/min.

Mediante la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés) usando el módulo DSC del equipo de TA-Instruments (figura 4 b)) en atmósfera de aire con una rampa de calentamiento igual a 5 °C/min y un flujo de 25 ml/min, se determinó la entalpía involucrada para las reacciones de deshidratación o evaporación del disolvente. Esta técnica se basa en la medición de la diferencia de temperatura entre un material de referencia y la muestra, bajo un calentamiento controlado por lo que se identifican los procesos endotérmicos y exotérmicos.⁴⁹ Para la muestra de hojas de chaya se realizaron dos análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) en atmósfera de aire, uno de la muestra seca y otro con la presencia del disolvente (isopropanol) a usar en las extracciones, llegando hasta la temperatura a la cual estas se realizarían (160 °C). Esta técnica permite calcular la variación de entalpía asociada a cada etapa durante el tratamiento térmico además de conocer detalles sobre la reversibilidad o irreversibilidad de estos. La entalpía para las reacciones involucradas en la de descomposición de cada especie se determinó utilizando el software TRIOS-TA Instruments (versión 5.1.0).

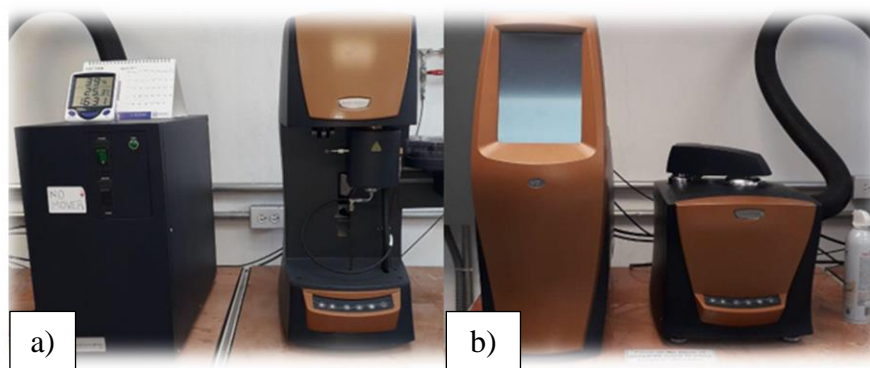


Fig. 4. Sistema modular de Análisis Térmico de TA-Instruments. a) termobalanza HR-MTGA y b) calorímetro MDSC

4.3. Extracción de los metabolitos secundarios

Para los metabolitos secundarios en hojas de chaya se evaluaron varias metodologías de extracción, con el objetivo de determinar la influencia de la temperatura y el disolvente. Las técnicas aplicadas se muestran en la figura 5. Para evaluar la influencia del disolvente en las extracciones se utilizaron diferentes polaridades, en este sentido se realizaron extracciones con isopropanol, acetato de etilo y hexano, utilizando para cada disolvente las mismas condiciones.

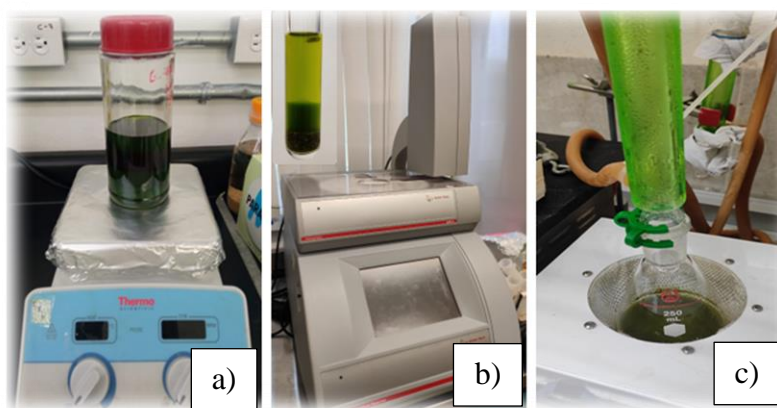


Fig. 5. Metodologías de extracción de metabolitos secundarios. a) Extracción a temperatura ambiente, b) extracción asistida por microondas y c) extracción por reflujo

Para evaluar el efecto de la temperatura, primero se llevó a cabo la extracción convencional a temperatura ambiente (figura 5a). Se pesaron 10 g de material vegetal seco y molido y se añadieron 300 ml de disolvente, esta mezcla se agitó magnéticamente en parrilla de calentamiento a 300 rpm por 48 h y fue filtrado a gravedad. Posteriormente, el líquido se trasladó a un matraz de fondo redondo de 500 ml y el disolvente se retiró con un rotavapor.

Para evaluar el efecto de la temperatura de forma controlada se utilizó la extracción asistida por microondas (figura 5b), aquí se emplearon 0.25 g de material vegetal seco por cada 5 ml de disolvente. El equipo utilizado fue un reactor de microondas Anton Paar modelo Monowave EXTRA 300, las temperaturas evaluadas fueron de 40, 80, 100, 120 y 160 °C con agitación de 800 rpm y un tiempo de 30 min a presiones de 0.0, 0.0, 1.0 – 1.5, 3.6 – 4.0 y 11.1 – 12.0 bar. Después, la mezcla resultante se filtró por gravedad, donde la biomasa residual se reservó y el líquido se evaporó para remover el disolvente.

La extracción por reflujo de disolvente fue la otra metodología utilizada (figura 5c), esta permitió aumentar la temperatura de extracción utilizando mayores volúmenes con cada

réplica. Se pesaron 12.5 g de material vegetal seco y se añadieron 250 ml de disolvente, durante el reflujo la temperatura alcanzó 85 °C y se mantuvo por 3 h. De igual forma, se filtró por gravedad, se reservó la biomasa residual y el disolvente se evaporó en el rotavapor.

4.4. Cromatografía

Para separar las diferentes fracciones y metabolitos resultado del proceso de extracción se utilizó cromatografía de columna. Con el crudo obtenido de ambas técnicas de extracción se realizó el siguiente procedimiento: el sólido se disolvió en diclorometano CH_2Cl_2 , se tomó una alícuota de aproximadamente 2 ml como referencia y el resto se adsorbió en gel de sílice, posteriormente se evaporó el diclorometano, la mezcla de sílice y el crudo se preparó para separar los metabolitos por cromatografía en columna. Para aplicar esta técnica se utilizó el equipo CombiFlash® Rf Lumen™ de Teledyne Isco, con cartuchos de polipropileno, los cuales se empacaron con gel de sílice grado 60. El equipo permite programar una rampa en el tiempo de la fase móvil, la cual fue de 10 min de hexano, 28 min en gradiente hasta lograr una proporción de 1:1 de *n*-hexano/acetato de etilo (AcOEt) y esa proporción se mantuvo durante 22 min.

El resultado de las separaciones fue evaluado por Cromatografía de Placa Fina (CCF) empleando placas comerciales de gel de sílice grado 60 de 0.2 mm de espesor con indicador de fluorescencia (F_{254}) (fase estacionaria) y la fase móvil *n*-hexano/AcOEt (9:1, 7:3, 1:1), revelado con una disolución de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_4$, $\text{MoO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y H_2SO_4 y calcinando a 180 °C.

4.5. Técnicas de identificación de metabolitos secundarios

4.5.1. Espectroscopía Infrarroja a Transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopia FT-IR es una herramienta muy utilizada para determinar la presencia de grupos funcionales en productos naturales, así como en materiales carbonosos mediante la comparación de la posición e intensidad de las señales obtenidas con las reportadas en la literatura^{41,50}. Para la determinación de los grupos funcionales en las especies aisladas y en el material carbonoso obtenido de la biomasa residual se utilizó un espectrofotómetro FT-IR Agilent Cary 630 y la técnica ATR (Attenuated Total Reflection, por sus siglas en inglés) para muestras sólidas, los datos fueron expresados en cm^{-1} (número de onda, ν).

4.5.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los experimentos de RMN se realizaron a una temperatura de 25 °C en espectrómetro Varian 600 MHz AR Premium Compact con sonda de líquidos OneNMR $^1\text{H}/^{19}\text{F}/^{15}\text{N}-^{31}\text{P}$ 5 mm con gradiente de campo pulsado (PFG). El registro de los espectros de ^1H se realizó a 600 MHz, y los de ^{13}C se registraron a 150 MHz. El disolvente empleado fue cloroformo deuterado (CDCl_3 con referencia interna de TMS). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz). Los espectros de RMN fueron procesados con el software MestReNova versión 12.0.0 de MestreLab Research S. L. Principales señales obtenidas:

- M1:

^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 4.05 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.03 – 1.98 (m, 0H), 1.97 (s, 3H), 1.96 – 1.87 (m, 1H), 1.68 – 1.59 (m, 1H), 1.53 (dd, J = 5.3, 3.3 Hz, 1H), 1.44 (tdd, J = 14.1, 12.1, 7.5 Hz, 1H), 1.31 – 1.23 (m, 1H), 1.25 – 1.19 (m, 5H), 1.19 (dd, J = 8.4, 5.9 Hz, 12H), 1.18 (s, 5H), 1.10 – 0.94 (m, 2H), 0.89 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 0.82 (d, J = 6.8 Hz, 6H), 0.82 – 0.73 (m, 7H).

^{13}C -RMN (150 MHz, CDCl_3) δ : 171.06, 60.33, 60.21, 31.57, 29.69, 25.23, 22.62, 21.32, 21.07, 20.56, 14.18, 14.01, 13.93.

- M2:

^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 9.35 (s, 1H), 9.20 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.88 – 7.80 (m, 1H), 7.17 (s, 0H), 6.20 – 6.12 (m, 2H), 6.08 – 6.02 (m, 1H), 5.34 – 5.22 (m, 1H), 5.04 (s, 2H), 4.45 – 4.32 (m, 2H), 4.14 (dd, J = 10.8, 6.4 Hz, 1H), 4.03 (q, J = 7.1 Hz, 6H), 3.81 (s, 2H), 3.74 (s, 1H), 3.58 (s, 2H), 3.56 – 3.46 (m, 2H), 3.28 (d, J = 8.5 Hz, 3H), 3.05 (d, J = 9.5 Hz, 3H), 2.72 (s, 1H), 2.55 (s, 1H), 2.44 – 2.37 (m, 1H), 2.30 – 2.21 (m, 2H), 2.25 (s, 1H), 2.15 – 2.06 (m, 1H), 2.04 – 1.99 (m, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.95 (s, 8H), 1.93 – 1.87 (m, 2H), 1.78 (dq, J = 14.5, 7.7 Hz, 3H), 1.73 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 1.68 – 1.61 (m, 2H), 1.61 – 1.48 (m, 13H), 1.43 (ddq, J = 13.7, 10.9, 6.8 Hz, 3H), 1.34 (s, 1H), 1.29 – 1.24 (m, 1H), 1.26 (s, 1H), 1.23 (s, 11H), 1.26 – 1.09 (m, 51H), 1.12 – 0.99 (m, 4H), 0.99 – 0.92 (m, 1H), 0.95 – 0.89 (m, 1H), 0.91 – 0.86 (m, 4H), 0.88 – 0.76 (m, 31H), 0.79 – 0.70 (m, 18H), 0.69 (dd, J = 13.4, 6.5 Hz, 3H), -1.75 (s, 1H).

^{13}C -RMN (150 MHz, CDCl_3) δ : 189.64, 171.16, 155.57, 150.92, 149.63, 137.89, 136.44, 128.96, 128.92, 105.21, 93.13, 60.38, 31.58, 25.25, 22.63, 21.12, 14.21, 13.95.

- M4:

¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃) δ: 5.04 (s, 1H), 4.14 (dq, J = 10.9, 5.0 Hz, 1H), 4.02 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 1.94 (s, 5H), 1.91 (s, 1H), 1.80 (dt, J = 14.5, 8.0 Hz, 1H), 1.68 – 1.64 (m, 1H), 1.64 – 1.58 (m, 1H), 1.47 – 1.41 (m, 1H), 1.39 – 1.32 (m, 1H), 1.19 (s, 13H), 1.30 – 1.14 (m, 22H), 1.10 – 1.01 (m, 1H), 0.97 (ddd, J = 16.5, 8.2, 3.5 Hz, 1H), 0.89 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 0.85 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 0.85 – 0.72 (m, 16H), 0.75 (s, 4H).

¹³C-RMN (150 MHz, CDCl₃) δ: 171.14, 60.37, 31.56, 22.62, 21.05, 20.86, 14.00.

- M5:

¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.63 (dd, J = 5.7, 3.3 Hz, 1H), 7.49 – 7.43 (m, 1H), 7.19 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 6.62 – 6.50 (m, 1H), 6.29 (dd, J = 15.0, 3.4 Hz, 1H), 6.18 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.11 – 6.06 (m, 1H), 6.06 – 6.00 (m, 2H), 5.47 (s, 1H), 5.36 (dd, J = 15.4, 9.9 Hz, 1H), 5.04 (s, 1H), 4.15 (qd, J = 11.0, 6.2 Hz, 2H), 3.94 (s, 1H), 2.32 (dd, J = 19.6, 7.6 Hz, 1H), 2.04 – 1.96 (m, 2H), 1.90 (d, J = 4.4 Hz, 6H), 1.85 – 1.74 (m, 4H), 1.70 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 1.66 (s, 2H), 1.67 – 1.63 (m, 1H), 1.65 – 1.60 (m, 1H), 1.62 – 1.56 (m, 1H), 1.54 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 1.49 – 1.37 (m, 3H), 1.39 – 1.31 (m, 2H), 1.33 – 1.27 (m, 1H), 1.26 (dt, J = 15.3, 2.3 Hz, 1H), 1.26 (s, 3H), 1.24 (d, J = 7.3 Hz, 3H), 1.23 (s, 11H), 1.20 (ddt, J = 13.5, 5.8, 2.4 Hz, 30H), 1.07 (ddd, J = 13.3, 8.5, 6.4 Hz, 2H), 1.03 (dd, J = 10.8, 5.8 Hz, 0H), 1.00 (s, 4H), 0.98 (s, 2H), 1.00 – 0.86 (m, 6H), 0.86 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 0.86 – 0.75 (m, 37H).

¹³C-RMN (150 MHz, CDCl₃) δ: 167.74, 147.06, 138.44, 137.98, 137.74, 137.54, 136.39, 135.65, 135.01, 132.68, 132.44, 132.41, 131.31, 131.01, 130.37, 129.09, 128.43, 126.13, 125.23, 124.78, 124.08, 68.33, 68.15, 66.07, 64.90, 48.36, 39.71, 38.70, 37.09, 34.84, 34.49, 34.01, 31.79, 31.55, 31.27, 30.33, 30.27, 30.20, 30.04, 29.67, 29.50, 29.42, 29.08, 28.90, 28.72, 25.24, 24.08, 23.71, 23.54, 22.95, 22.62, 14.22, 13.94, 13.04, 12.83, 11.54, 11.25, 11.02, 10.81.

- C1R1:

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.53 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.35 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 7.12 (dd, J = 8.6, 2.5 Hz, 1H), 1.86 (dt, J = 14.4, 7.2 Hz, 1H), 1.73 – 1.70 (m, 2H), 1.63 – 1.58 (m, 1H), 1.57 – 1.45 (m, 1H), 1.33 (s, 9H), 1.27 (d, J = 17.8 Hz, 22H), 1.23 (s, 17H), 1.18 – 1.09 (m, 2H), 1.05 (dq, J = 16.2, 5.7, 4.0 Hz, 1H), 0.98 – 0.90 (m, 2H), 0.92 – 0.81 (m, 12H).

¹³C-RMN (150 MHz, CDCl₃) δ: 147.06, 138.50, 124.24, 124.12, 119.27, 118.87, 34.85, 34.50, 31.66, 31.57, 31.49, 31.33, 31.17, 30.41, 30.25, 30.09, 29.93, 29.68, 14.16, 14.03.

4.5.3. UV-Vis

Los espectros de absorción electrónica en el UV-Vis se midieron en un equipo Agilent 8453 Instruments en un rango de longitudes de onda entre 200-800 nm. Esta técnica se utilizó para la caracterización de metabolitos aislados y también para la evaluación de la descomposición de azul de metileno, ya que la región entre 200 y 400 nm, llamada ultravioleta cercana, es de gran utilidad en la determinación de insaturaciones conjugadas, aromaticidad o de ciertos grupos insaturados con pares electrónicos libres.⁵⁰

4.5.4. Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas de alta resolución (EMAR) brinda información provechosa sobre los compuestos químicos orgánicos, por ejemplo, la masa molecular, fórmula global y estructura molecular.⁵⁰ Los espectros de masas de alta resolución se obtuvieron mediante la técnica de ionización por electropulverización (ESI, por sus siglas en inglés) usando un espectrómetro de masas Synapt G2-Si (Waters) TOF.

4.6. Tratamiento Térmico de la biomasa residual

Analizando la información proveniente del análisis termogravimétrico realizado a la biomasa residual de la extracción de metabolitos, se determinó, a partir de la primera derivada de la curva del TGA, que la temperatura óptima para la obtención del material carbonoso es 450 °C. Se aplicó el tratamiento térmico (TT) en una mufla de rampa Thermo Scientific, Los detalles de la rampa de calentamiento se muestran en la Fig. 6.

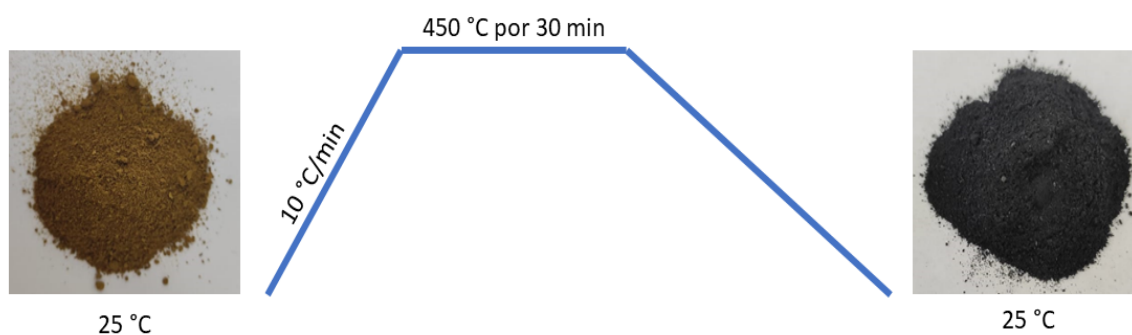


Fig. 6. Tratamiento térmico de la biomasa residual de la extracción en hojas de chaya

Se sometieron 10 g de biomasa restante al TT según el esquema presentado en la figura 6. El material obtenido fue reservado para posteriores análisis.

4.7. Caracterización estructural y morfológica

Los materiales carbonosos obtenidos fueron caracterizados mediante diferentes técnicas las cuales se presentan a continuación.

4.7.1. Espectroscopía Raman

La técnica de espectroscopia Raman es muy común en la caracterización de materiales carbonosos, ya que, se pueden identificar átomos de carbono con hibridación sp^3 (pico alrededor de los 1350 cm^{-1} , banda “D”), carbonos sp^2 (pico sobre los 1575 cm^{-1} , banda “G”) y una banda que brinda el grado de apilamiento por capas o banda “2D” (alrededor de los 2690 cm^{-1}).^{50,51} La relación entre las intensidades de las bandas D y G (I_D/I_G), también conocida como relación sp^3/sp^2 , se utiliza para comparar la estructura ordenada de diferentes muestras de materiales carbonosos⁵². En este estudio, la técnica de espectroscopia Raman se utilizó para analizar la estructura de los materiales carbonosos obtenidos después del tratamiento térmico de la biomasa restante. Se empleó un equipo Alpha 300 WITEC con un láser azul de Neón a una longitud de onda de 488 nm.

4.7.2. Difracción de Rayos X (DRX)

La técnica de difracción de rayos X (DRX) resulta muy útil para caracterizar materiales carbonosos debido a que se observan dos señales características en las posiciones de $2\theta = 26^\circ$ y 43° , las cuales corresponden a los planos cristalinos (002) y (100) típicos de materiales carbonosos con cierto orden bidimensional.³⁰ En este estudio, se analizó la estructura cristalina del material carbonoso obtenido utilizando un difractómetro Bruker D-8 Advance con radiación de cobre $K\alpha$ ($\lambda = 1.5418\text{ \AA}$), que opera a 40 kV y 30 mA. Los parámetros de adquisición fueron un tiempo de exposición de 0.5 segundos y un tamaño de paso de 0.02° en un rango angular $2\theta = 5\text{-}60^\circ$. Los valores de tamaño de cristalito (L_c) de los materiales sintetizados fueron calculados empleando la ecuación de Debye-Sherrer (Ecuación 1), usando el pico de difracción de la Anatasa en 25° .

$$L_c = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (1)$$

Donde: L_c es el tamaño de cristalito en la dirección del eje c, $K = 0.9$ (Constante que depende de la forma de los cristales), β (expresado en radianes) es el semiancho del pico (FWHM) y θ es la posición angular del pico principal de la anatasa.

4.7.3. Espectroscopía fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

En el estudio de materiales carbonosos, la técnica de espectroscopía fotoelectrónica de Rayos X (XPS) brinda datos de energía de enlace, de forma que se puede indicar el tipo de enlace químico de los átomos de carbono en diferentes entornos químicos.^{53,54} En este trabajo, los materiales carbonosos obtenidos de la biomasa residual después de la extracción a las diferentes temperaturas fueron caracterizados mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) utilizando un equipo K-Alpha-Surface Analysis de Thermo Scientific. El cañón de Rayos x utiliza la línea K-Alpha monocromada de aluminio (1486.6eV) a 12 kV y 40 W de potencia en un área ovalada de 400 μm^2 e incide a la muestra con un ángulo relativo de 30°. En la erosión, se usa un haz de iones de argón acelerados a 3 kV, con una potencia de 30 W que incide en un área de 1 x 2 mm² concéntrico al haz de Rayos X. Los espectros XPS son obtenidos en dos condiciones: En amplio barrido general (0-1350 eV) con 1 eV/paso, energía de paso 100 eV y el modo ventanas pequeñas con 0.1 eV/paso, energía de paso 50 eV.

4.7.4. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Energía Dispersiva de Rayos X (EDS)

La microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) es una herramienta muy útil en el análisis de materiales carbonosos, ya que permite obtener información sobre la morfología y la composición química en áreas específicas.⁴¹ En el estudio realizado, se examinó la morfología del material carbonoso utilizando el equipo JEOL JSM-7600. Además, se realizó un análisis cuantitativo utilizando la técnica de Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS, por sus siglas en inglés), que proporciona una caracterización cualitativa y semi-cuantitativa de las interfaces y superficies de los materiales. Esta técnica aprovecha que la energía de los rayos X emitidos es característica de los elementos presentes, lo que permite obtener información analítica cualitativa y cuantitativa de las diferentes áreas de la superficie. Para poder analizar las muestras se aplicó una capa de Au/Pd mediante el proceso de *sputtering* para hacerlas conductoras y facilitar la observación de la superficie en las imágenes. Además, las muestras se colocaron en un porta-muestras de aluminio para evitar interferencias durante el análisis semi-cuantitativo.

4.8. Síntesis del material compuesto para fotocatalisis

Con el propósito de mejorar las propiedades fotocatalíticas de los productos carbonosos derivados de este trabajo nos dimos a la tarea de obtener TiO_2 para aprovechar su excelente eficiencia en la generación de excitones por absorción electrónica en el UV. En un vaso de precipitados se agregaron 75 ml de isopropanol y 3.8 ml de isopropóxido de titanio (IV) o TTIP (por sus siglas en inglés), con agitación constante a 500 rpm por 20 min. Posteriormente se añadieron 0.22 ml de ácido clorhídrico concentrado (HCl_{conc}) y 10 ml de agua desionizada (H_2O) en fracciones de 1 ml para lograr la formación del precipitado.⁴⁶ La agitación se mantuvo por 30 min más. Una vez pasado el tiempo de agitación, se llevó a centrifugar a 1500 rpm por 30 min en una centrífuga marca Thermo Scientific, se decantó el sobrenadante para llevar el sólido a un horno de vacío marca Fisher Scientific por 24 h para secarlo y una vez seco se trituró en mortero de ágata y se obtuvo un polvo fino de color blanco como se muestra en la figura 7a).

Para preparar el material compuesto (C-TiO_2), se utilizó el polvo carbonoso y el procedimiento anterior del TiO_2 al 6 % en masa. En un vaso de precipitados se agregaron 75 ml de isopropanol, 3.8 ml de TTIP y 0.5 g de material carbonáceo, se llevó a agitación constante de 500 rpm durante 90 min, posteriormente se añadieron 0.22 ml de HCl_{conc} y 10 ml de H_2O en fracciones de 1 ml para lograr la formación del sólido, se mantuvo la agitación por 30 min más. Tras la agitación la mezcla se centrifugó a 1500 rpm por 30 min, se decantó el sobrenadante para llevar el sólido a horno de vacío por 24 h para secarlo y una vez seco se trituró en mortero de ágata y se obtuvo un polvo fino de color gris como se muestra en la figura 7b). Los resultados de los procesos de síntesis fueron llevados a tratamiento térmico a 450 °C, siguiendo el procedimiento representado en la figura 6.

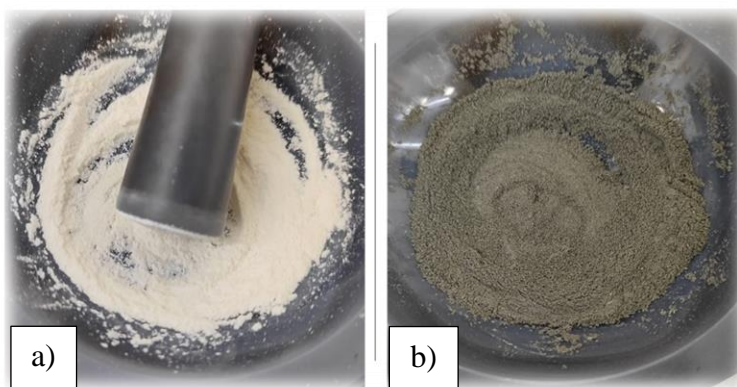


Fig. 7. Resultados de síntesis. a) TiO_2 al 6 % y b) material compuesto C-TiO_2

4.9. Degradación de azul de metileno

Para evaluar las propiedades fotocatalíticas del material compuesto se exploró la reacción de descomposición del azul de metileno, para lo cual se preparó una disolución acuosa de azul de metileno (Sigma Aldrich, 99 %) de concentración 25 mg/L. Se prepararon cuatro frascos con las mismas dimensiones y características, cada uno con 100 ml de azul de metileno (25 mg/ml), uno de estos frascos funcionó como referencia para la degradación que presenta esta sustancia ante la exposición al sol (fotólisis), a otro se le añadieron 20 mg de material carbonoso, al tercero se le añadieron 20 mg de TiO₂ sintetizado al 6 % en masa y al cuarto 20 mg del material compuesto (C-TiO₂). Los frascos estuvieron en agitación constante a 600 rpm por 16 h y 30 min; posterior a esto, se expusieron a la radiación solar natural por 5 h, después de este tiempo se dejó reposo por 19 h. Pasado ese tiempo las mezclas se agitaron por 30 min y se expusieron al sol nuevamente por 5 h. El proceso de degradación de azul de metileno se monitoreó por espectroscopía UV-Vis.

V.Resultados y discusión

5.1. Extracción de metabolitos secundarios en hojas de chaya

Para la obtención de los extractos de hojas de chaya se utilizaron diferentes técnicas de extracción que permitieron evaluar la influencia de la temperatura y del disolvente. Los resultados se presentan a continuación.

5.1.1. Análisis termogravimétrico (TGA)

Se realizó un análisis termogravimétrico sobre las hojas de chaya antes de realizar el procedimiento de secado con el objetivo de apreciar las diferentes pérdidas de masa que ocurren en el material verde, en atmósfera de aire, hasta 600 °C (figura 8).

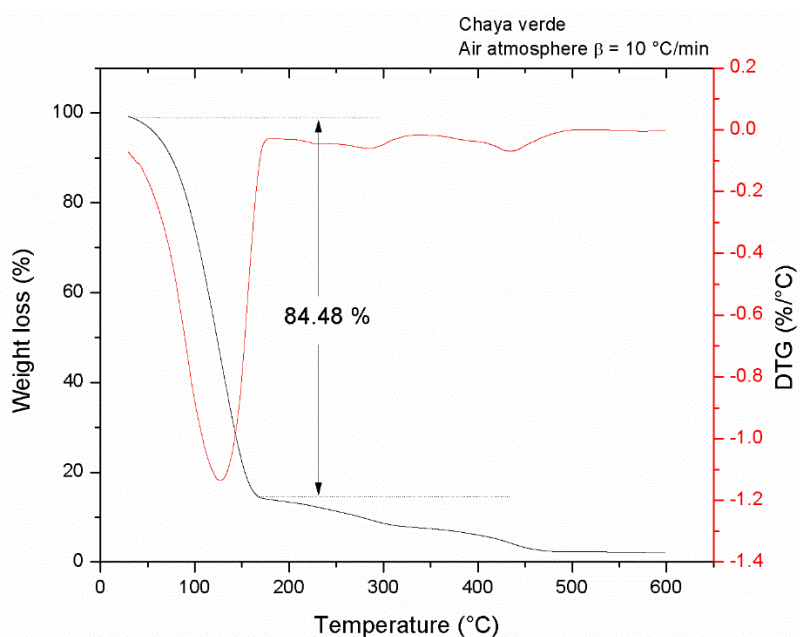


Fig. 8. Curva TGA de las hojas de chaya verdes en atmósfera de aire

En la figura 8 se aprecia que la pérdida más significativa de masa es la correspondiente al proceso de deshidratación (84.48 %), este análisis muestra la eficacia del proceso de secado al cual se someten las hojas.

Para comprobar que no ocurren procesos de descomposición de compuestos orgánicos durante el calentamiento de la biomasa en las extracciones, se realizó un análisis termogravimétrico de las hojas de chaya previamente deshidratadas y pulverizadas. En este sentido el TGA se llevó a cabo en atmósfera de aire, hasta alcanzar 200 °C (figura 9).

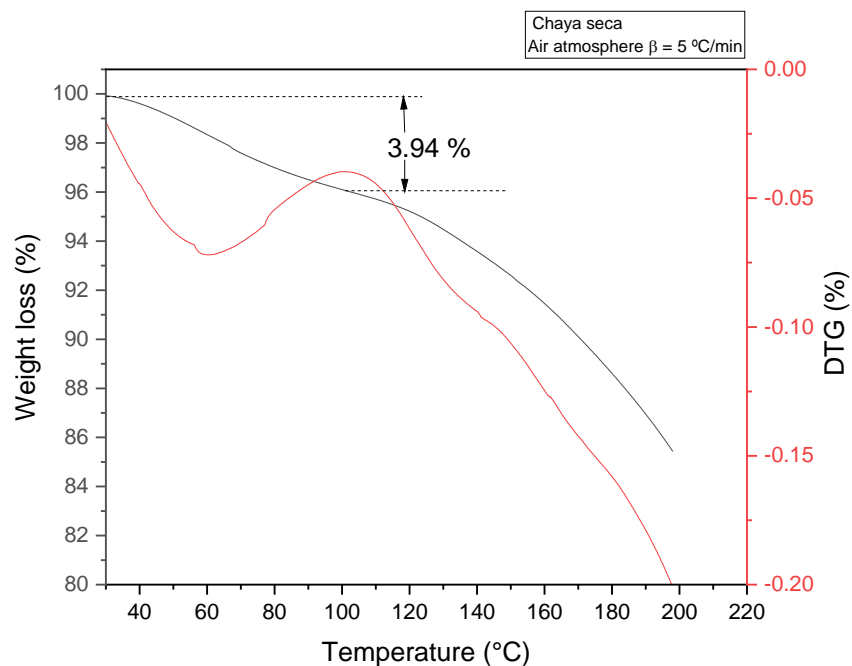


Fig. 9. Curva TGA de las hojas de chaya seca en atmósfera de aire

El análisis TGA caracteriza los cambios químico-físicos ocurridos durante la deshidratación de la chaya previamente secada. Como se puede apreciar en la figura 9, a los 100 °C ocurre el proceso de deshidratación, donde la pérdida de masa es de 3.94 %, lo que significa que el proceso de secado y horno, con el cual se obtuvo en promedio una pérdida de masa de 74.55 %, fue un proceso eficiente. Además, este tratamiento térmico implica que, a las temperaturas a las cuales se realizarán las extracciones no ocurren procesos de descomposición de los compuestos existentes en las hojas.

A la muestra de hojas de chaya se le realizaron dos análisis por DSC en atmósfera de aire, uno para la muestra seca y otro con la presencia del disolvente (isopropanol) a usar en las extracciones hasta la temperatura de 160 °C (temperatura máxima de extracción en reactor de microondas). Esta técnica permite calcular la variación de entalpía asociada a cada etapa durante el tratamiento térmico además de conocer detalles sobre la reversibilidad o irreversibilidad de estos. En la figura 10 se muestran las curvas obtenidas en estos análisis y en la tabla 3 se muestran los valores de ΔH y el tipo de reacción (deshidratación o evaporación de disolvente) que son las fundamentales en estos procesos.

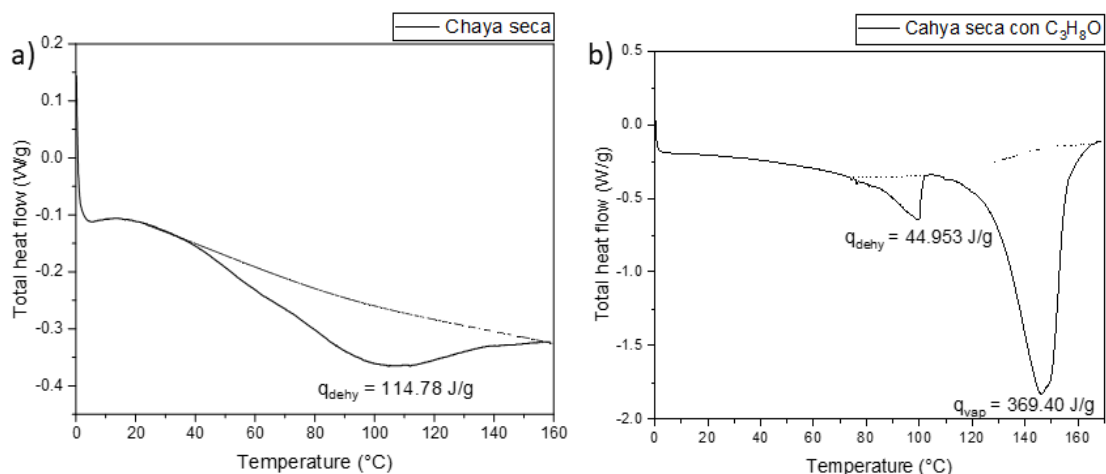


Fig. 10. Curva DSC de a) chaya seca en atmósfera de aire y b) chaya seca con isopropanol en atmósfera de aire

En la figura 10 a) se muestra la curva DSC de la chaya seca en atmósfera de aire donde puede apreciarse el proceso de deshidratación de la muestra alrededor de los 100 °C con una energía de 114.78 J/g como único proceso que ocurre en el rango de temperaturas a las que se realizan las extracciones, corroborando que no existen reacciones de descomposición de sustancias orgánicas. En la figura 10 b) se muestra la curva DSC de la chaya seca con isopropanol en atmósfera de aire, este proceso se llevó a cabo en una cápsula hermética, por lo cual se pueden apreciar 2 procesos fundamentales, la deshidratación y la evaporación del disolvente, los cuales, por el efecto que provoca el aumento de la presión dentro de la cápsula hermética tienen un comportamiento especial. La temperatura de ebullición de isopropanol es 82.5 °C a presión estándar ambiente, sin embargo, en este caso puede observarse que alrededor de los 100 °C ocurre un proceso de deshidratación con una energía de 44.95 J/g y bruscamente vuelve a la línea base completándose la evaporación a una temperatura por encima de los 140 °C y con una energía de 369.40 J/g, este aumento de la temperatura de ebullición del disolvente puede estar relacionado con el aumento de la presión del sistema y la ocurrencia de interacciones del disolvente con la muestra o con el agua que esta contenía.

Tabla 3. ΔH y tipo de reacción.

Reacciones	Q_{Total} (J/g) Chaya seca	Q_{Total} (J/g) Disolvente
<i>Deshidratación</i>	114.78	44.953
<i>Evaporación del disolvente</i>	-	369.40

5.1.2. Influencia del disolvente y la temperatura de extracción

Como ya se planteó, se utilizaron tres diferentes técnicas de extracción con el objetivo de evaluar la influencia de la temperatura en la extracción de hojas de chaya: extracción convencional a temperatura ambiente, extracción asistida por microondas y extracción por reflujo.

Los extractos obtenidos siguiendo las metodologías descritas en el capítulo anterior, después de la evaporación del disolvente fueron disueltos en diclorometano (CH_2Cl_2) con la finalidad de observar en un análisis cualitativo por cromatografía de capa fina las fracciones extraídas. En la figura 11 se presenta este análisis con isopropanol como disolvente donde el primer punto de aplicación corresponde a la extracción convencional a temperatura ambiente y el resto de los puntos de aplicación corresponden a las extracciones asistidas por microondas a las temperaturas de 40, 80, 100, 120 y 160 °C, en la figura 12 es hexano el disolvente utilizado, de igual forma a la izquierda de cada figura se encuentra la aplicación de la extracción convencional a temperatura ambiente y luego las temperaturas de 80, 100 y 120 °C asistidas por microondas y en la figura 13 acetato de etilo con el mismo procedimiento que con hexano.

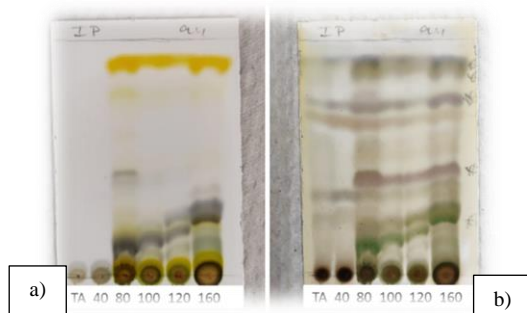


Fig. 11. Influencia de la temperatura en la extracción con isopropanol. a) CCF sin revelar y b) CCF revelada

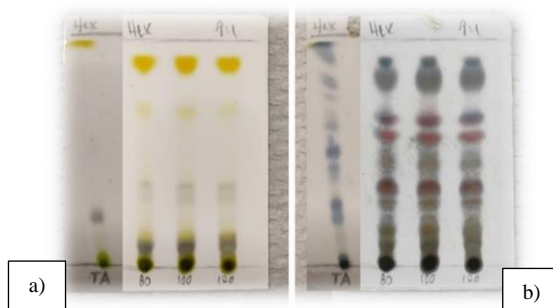


Fig. 12. Influencia de la temperatura en la extracción con hexano. a) CCF sin revelar y b) CCF revelada

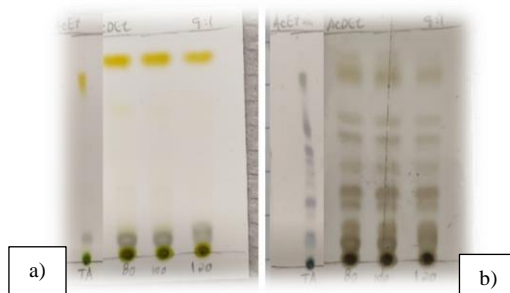


Fig. 13. Influencia de la temperatura en la extracción con acetato de etilo. a) CCF sin revelar y b) CCF revelada

Como se puede apreciar en las figuras 11, 12 y 13, la temperatura de extracción tiene una apreciable influencia en el número de metabolitos y fracciones que se logran extraer, así como en la concentración de estos pues la intensidad de las señales en CCF es mayor con el aumento de la temperatura. Sin embargo, también se puede apreciar que a temperaturas mayores a 80 °C tanto la cantidad como la intensidad de las señales en cromatografía no varía, por tanto, se elige la técnica de extracción por reflujo, ya que esta extrae a una temperatura constante de 85 °C. En la figura 14 se muestran las CCF de los tres disolventes evaluados con esta técnica.

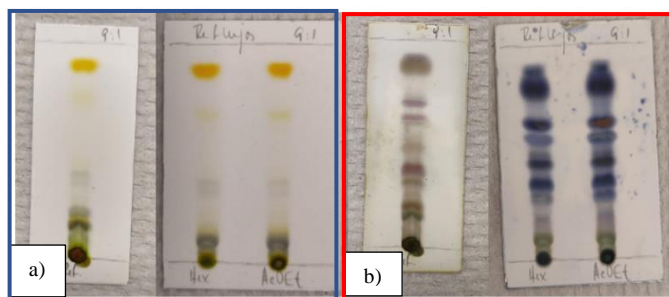


Fig. 14. Comparación de la CCF de los disolventes utilizados (de izquierda a derecha: isopropanol, hexano y acetato de etilo) con la técnica de reflujo: a) CCF antes del revelado y b) CCF después del revelado

Como puede observarse en la figura 14, aplicando la técnica de extracción por reflujo se obtienen las fracciones y metabolitos que se predecían según lo obtenido con las extracciones asistidas por microondas a partir de 80 °C. La figura 14 también brinda información importante acerca del disolvente a utilizar en las extracciones, en este sentido puede observarse que en las extracciones con los tres disolventes empleados se obtienen fracciones muy similares, sin embargo, con isopropanol las fracciones son más intensas y se aprecia mayor número de estas. Debido a estos resultados, para obtener los metabolitos y

fracciones aislados se utilizó la técnica de extracción por reflujo con isopropanol como disolvente.

5.2. Extracción de metabolitos mediante la técnica de reflujo con isopropanol

Se realizaron las extracciones por reflujo con isopropanol siguiendo la metodología propuesta en el capítulo anterior para esta técnica. El crudo obtenido después de evaporar el disolvente se llevó a una columna de cromatografía tipo *flash* con un volumen de equilibrio de 48 ml, el resultado de esta separación fue monitoreado por CCF.

5.2.1. Obtención de los metabolitos aislados

En la figura 15 se ilustran las principales fracciones que se separaron de acuerdo con la intensidad de la señal en CCF, se recuperaron las mezclas clasificadas como M1, R1, M2, M4 y M5.

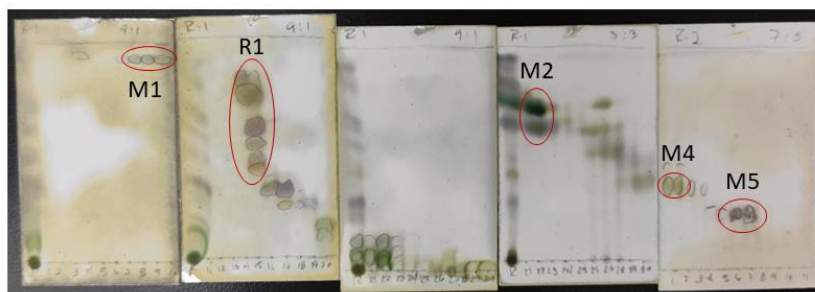


Fig. 15. CCF del resultado de la separación del crudo obtenido por reflujo

Por la cantidad e intensidad de las señales observadas en la mezcla R1 se procedió a repurificar utilizando cromatografía de columna tipo *flash* con un volumen de equilibrio de 15 ml y utilizando como fase móvil una mezcla hexano/acetato de etilo, comenzando la separación con hexano y aplicando un gradiente hasta una proporción de 85:15. El resultado de esta repurificación fue monitoreado por CCF y se muestra en la figura 16.

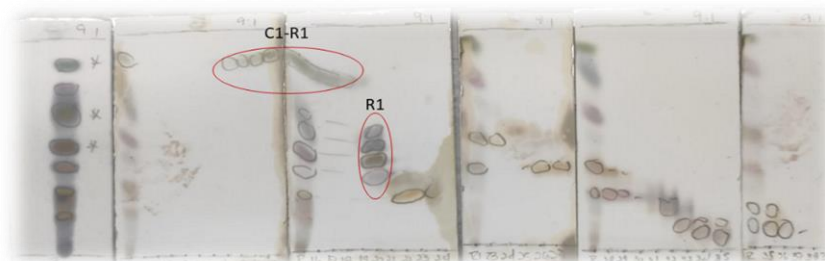


Fig. 16. CCF del resultado de la repurificación de la mezcla R1

Como resultado de la separación de la mezcla R1 se aisló el compuesto que se clasificó como C1-R1, el cual se obtuvo en forma de sólido y se reservó una mezcla R1 por la intensidad observada en las señales de esta para aplicar otros procesos de separación en estudios a futuro.

5.2.2. Caracterización de las fracciones y metabolitos obtenidos.

Las fracciones separadas por cromatografía en columna tipo *flash* fueron caracterizadas mediante técnicas espectroscópicas de FT-IR, ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, se analizaron las mezclas M1, M2, M4 y M5 y el compuesto aislado C1-R1. Para este último, por obtenerse en estado sólido, fue posible utilizar la técnica de caracterización por espectrometría de masas. Los espectros se presentan a continuación.

- M1: Para caracterizar esta fracción metabólica se emplearon las técnicas espectroscópicas de UV-Vis (figura 17 a)), FT-IR (figura 17 b)), ^1H -RMN (figura 17 c)) y ^{13}C -RMN (figura 17 d)) la mezcla asilada.

En la figura 17 a) se observa el espectro UV-Vis de la mezcla M1 donde se utilizó diclorometano como disolvente, se presenta una señal de absorción sobre los 280 nm probablemente representativa de las transiciones $n\sigma^*$ de un compuesto sustituido con halógeno como puede ser el bromo. Por otra parte, en el espectro FT-IR (figura 17 b)) se observa una señal que corrobora lo anterior aproximadamente en 730 cm^{-1} , también se observa la banda característica del grupo carbonilo (C=O) en 1725 cm^{-1} y se puede apreciar la banda característica de los Csp^3 inmediatamente por debajo de 3000 cm^{-1} .

En el espectro de ^1H -RMN de la mezcla M1 (figura 17 c)), se observa hacia campo alto una señal intensa cuádruple en 4.12 ppm con $J=7.1\text{ Hz}$, con este desplazamiento debido probablemente a la cercanía de los protones a un grupo metilo y a un oxígeno de un grupo funcional éster. También se aprecian varias señales intensas simples y múltiples, las cuales deben corresponder a cadenas alifáticas.

Mientras tanto, en el espectro de ^{13}C -RMN (figura 17 d)) se observan siete señales de carbonos alifáticos en: 171.1, correspondiente al carbono (C=O) de un éster, 60.3, 31.6, 29.7, 22.6, 21.1 y dos señales dobles en 14.1-13.9 ppm.

Por tanto, la mezcla M1 es alifática y probablemente contiene algún halógeno y grupo funcional éster.

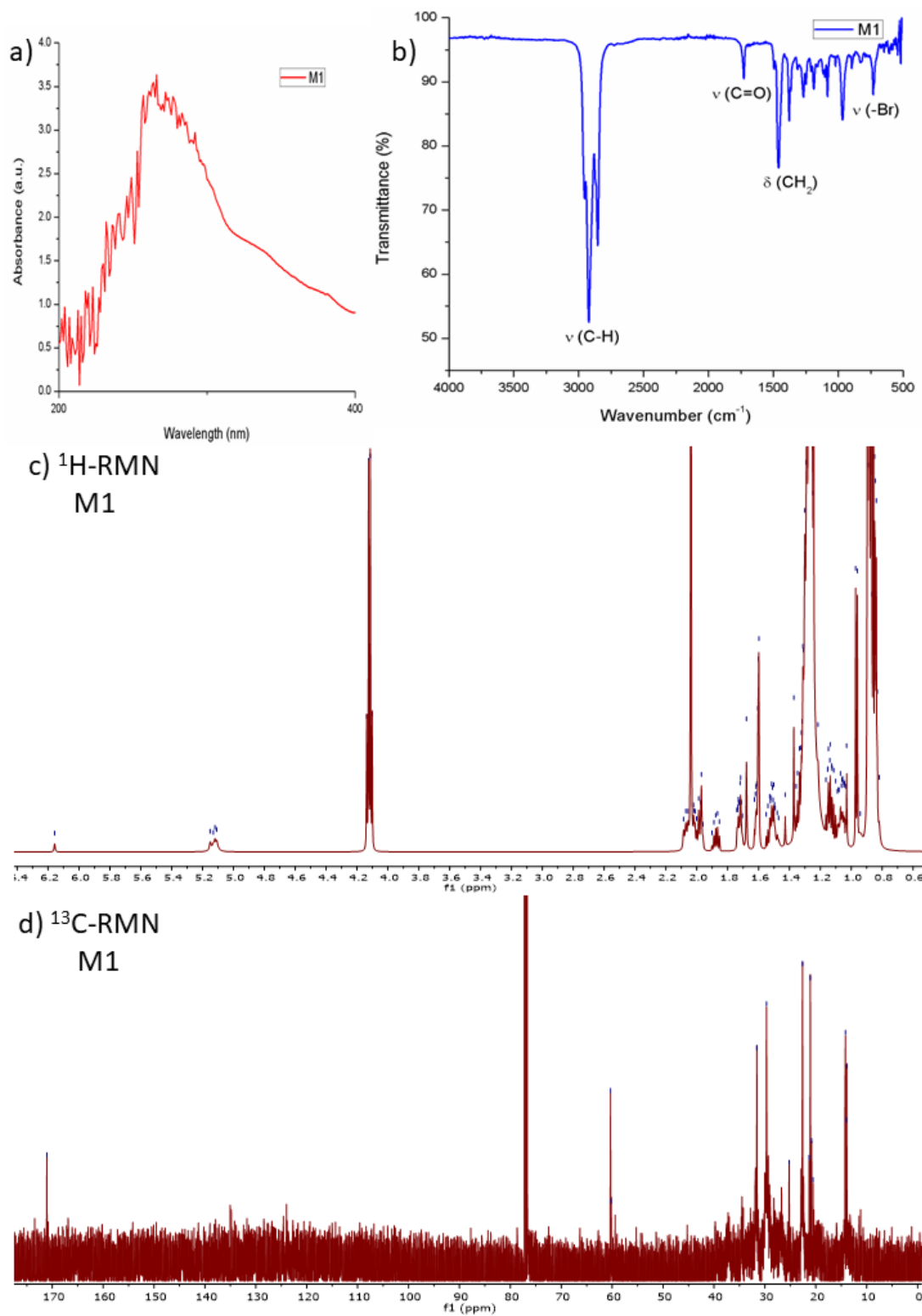


Fig. 17. Caracterización espectroscópica de la mezcla M1: a) UV-Vis, b) FT-IR, c) ^1H -RMN y d) ^{13}C -RMN

- M2: Para caracterizar esta fracción metabólica se analizaron las técnicas espectroscópicas de UV-Vis (figura 18 a)), FT-IR (figura 18 b)), ^1H -RMN (figura 18 c)) y ^{13}C -RMN (figura 18 d)) la mezcla asilada.

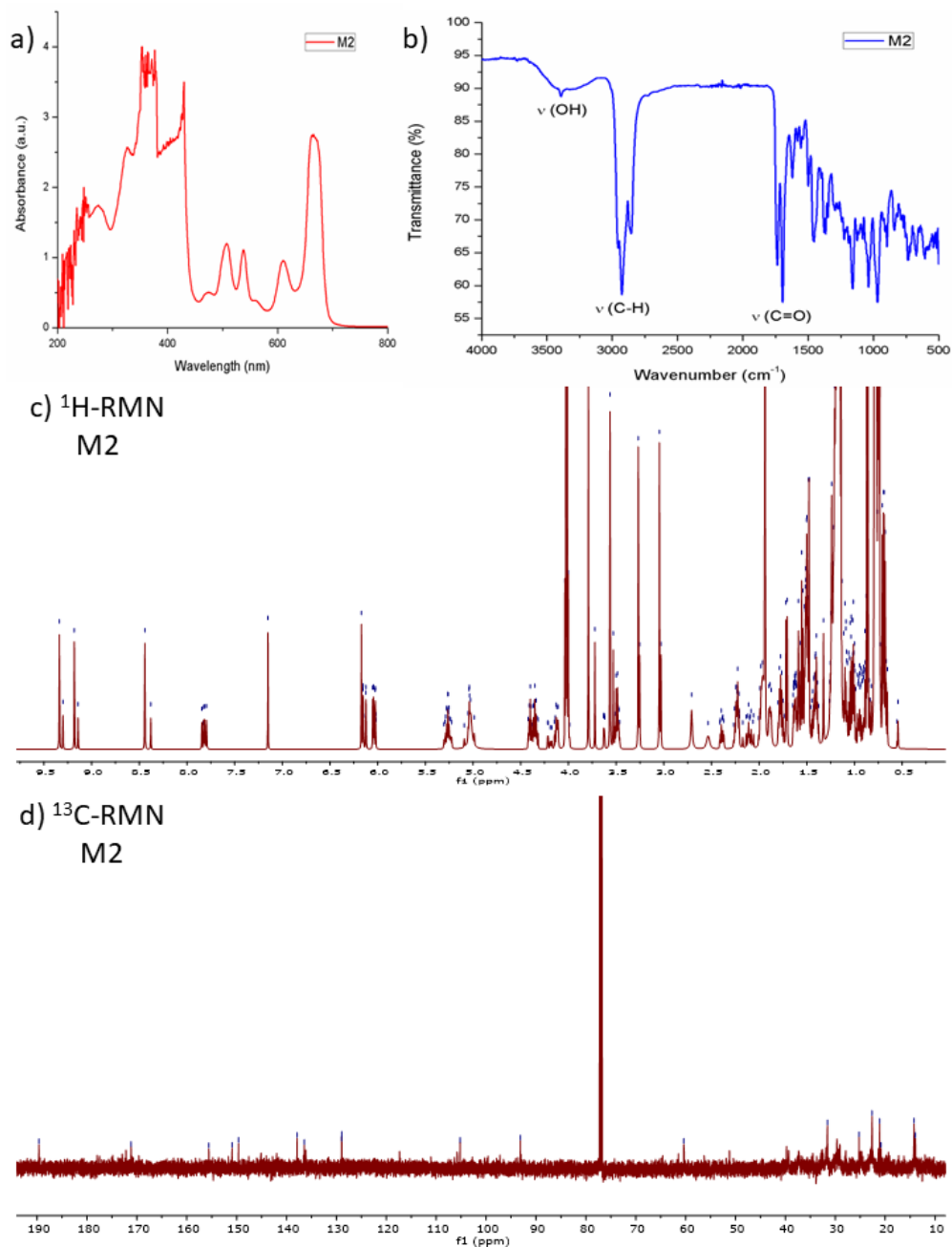


Fig. 18. Caracterización espectroscópica de la mezcla M2: a) UV-Vis, b) FT-IR, c) ^1H -RMN y d) ^{13}C -RMN

En la figura 18 a) se observa el espectro UV-Vis de la mezcla M2, se utilizó como disolvente diclorometano, en este se pueden apreciar bandas características de las

transiciones $\pi\pi^*$ de compuestos aromáticos entre los 200 y 400 nm y bandas representativas de transiciones $n\pi^*$ que indican sustituciones en los anillos entre los 400 y los 700 nm. En el espectro FT-IR (figura 18 b)) se aprecia una banda ancha en aproximadamente 3300 cm^{-1} característica de grupos hidroxilo (OH), se observa la banda característica de los Csp^3 por debajo de 3000 cm^{-1} y también, la banda correspondiente al grupo carbonilo (C=O) en 1690 cm^{-1} .

En el espectro de ^1H -RMN de la mezcla M2 (figura 18 c)), se observan 2 señales dobles en 9.3 y 9.1 ppm indicativas de protones de aldehídos, en la región aromática, entre 8 y 7 ppm se pueden observar dos señales, hacia campo alto se aprecian señales anchas sobre los 5 ppm, indicativas de la presencia de protones de hidroxilo, además se aprecian varias señales intensas simples y múltiples, las cuales deben formar parte de cadenas alifáticas.

Mientras tanto, en el espectro de ^{13}C -RMN (figura 18 d)) se observan las siguientes señales: en 189.6 ppm correspondiente a carbonos ácidos, varias señales en la región aromática entre 110 y 160 ppm, así como señales de carbonos alifáticos a campo alto. Por tanto, la mezcla M2 podría corresponder a una mezcla de ácidos grasos.

- M4: Para caracterizar esta fracción metabólica se analizaron las técnicas espectroscópicas de UV-Vis (figura 19 a)), FT-IR (figura 19 b)), ^1H -RMN (figura 19 c)) y ^{13}C -RMN (figura 19 d)) la mezcla asilada.

En la figura 19 a) se observa el espectro UV-Vis de la mezcla M4, se utilizó como disolvente diclorometano, en este se pueden apreciar bandas características de las transiciones $\pi\pi^*$ de compuestos aromáticos entre los 200 y 400 nm y bandas representativas de transiciones $n\pi^*$ que indican sustituciones en los anillos entre los 400 y los 700 nm.

En el espectro FT-IR (figura 19 b)) se aprecia una banda ancha en aproximadamente 3300 cm^{-1} característica de grupos hidroxilo (OH), se observa la banda característica de los Csp^3 por debajo de 3000 cm^{-1} y también, la banda correspondiente al grupo carbonilo (C=O) en 1725 cm^{-1} .

En el espectro de ^1H -RMN de la mezcla M4 (figura 19 c)), se observan tres señales simples en 10.8, 9.8 y 9.5 ppm indicativas de protones de ácidos, en la región aromática, entre 8 y 7 ppm se pueden observar cuatro señales, hacia campo alto puede observarse señal en 5 ppm ancha, indicativa de la presencia de protones de alcoholes, además se aprecian

varias señales intensas simples y múltiples, las cuales deben formar parte de cadenas alifáticas.

Mientras tanto, en el espectro de ^{13}C -RMN (figura 19 d)) se observan las siguientes señales: en 171.1 ppm una señal que corresponde a un carbonilo de éster, dos señales en la región aromática entre 130-135 ppm, así como señales de carbonos alifáticos a campo alto. Por tanto, M4 podría corresponder a una mezcla de ácidos grasos y derivados de estos.

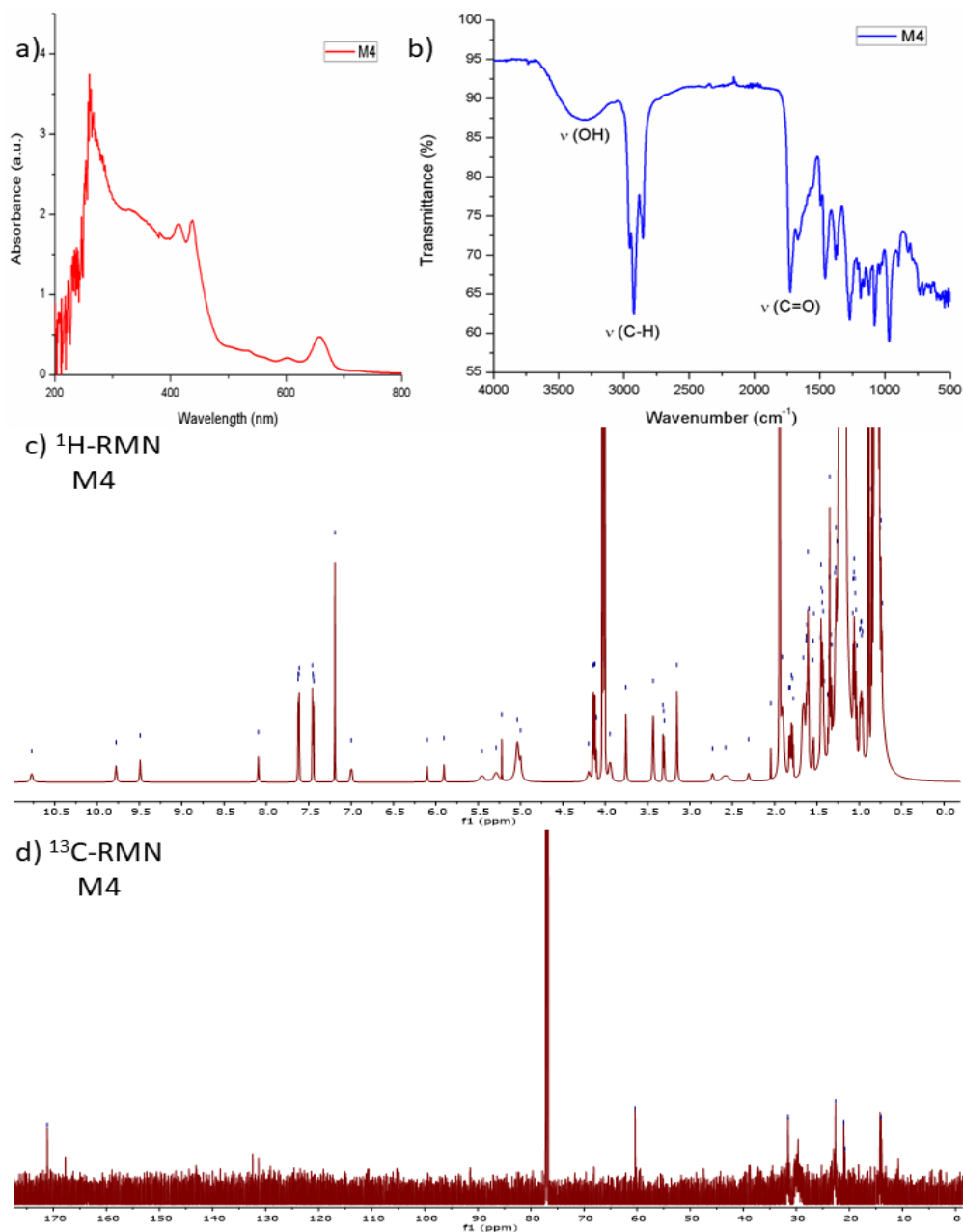


Fig. 19. Caracterización espectroscópica de la mezcla M4: a) UV-Vis, b) FT-IR, c) ^1H -RMN y d) ^{13}C -RMN

- M5: Para caracterizar esta fracción metabólica se analizaron las técnicas espectroscópicas UV-Vis (figura 20 a)), FT-IR (figura 20 b)), ^1H -RMN (figura 20 c)) y ^{13}C -RMN (figura 20 d)) la mezcla asilada.

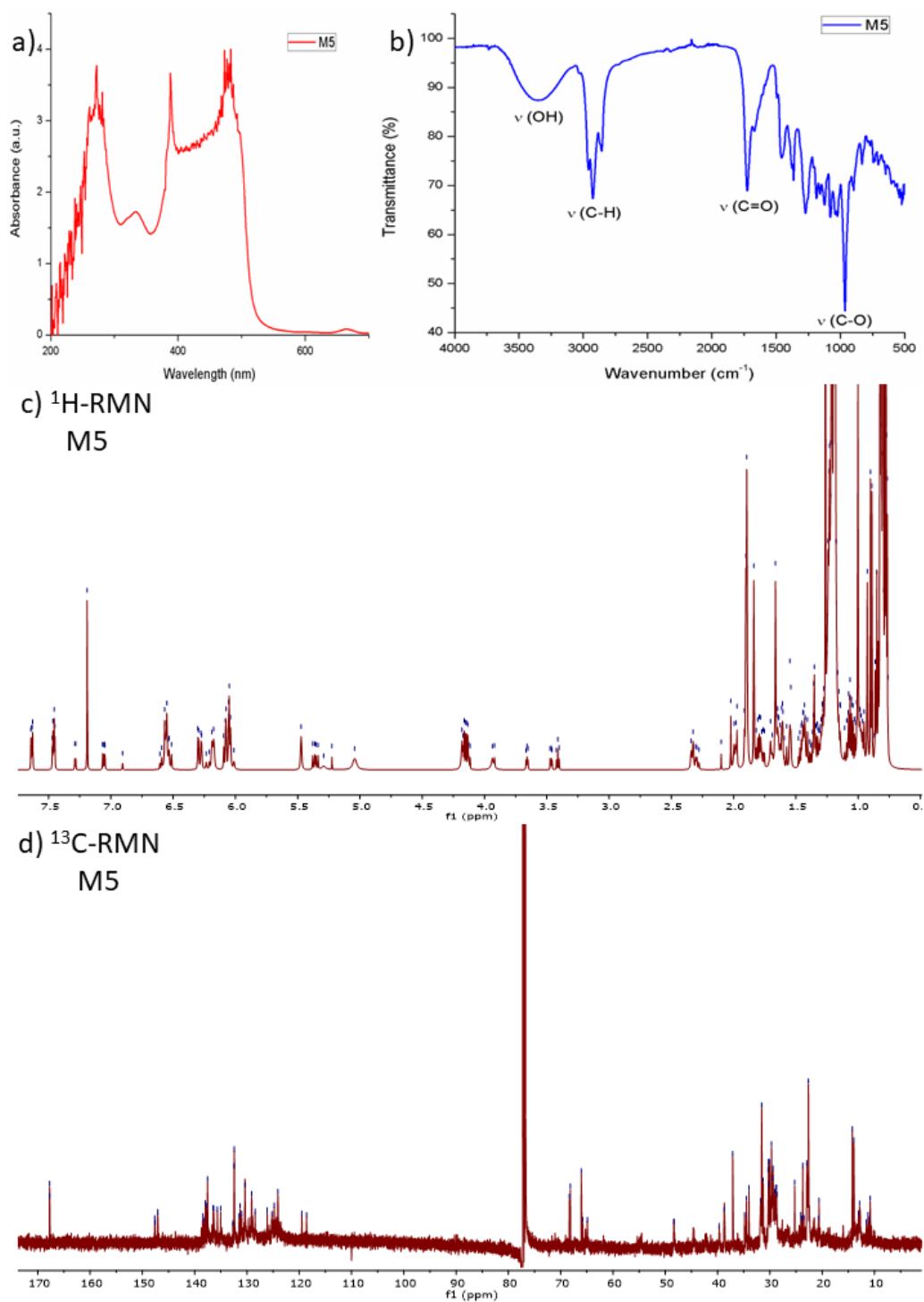


Fig. 20. Caracterización espectroscópica de la mezcla M5: a) UV-Vis, b) FT-IR, c) ^1H -RMN y d) ^{13}C -RMN

En la figura 20 a) se observa el espectro UV-Vis de la mezcla M5, se utilizó como disolvente diclorometano, en este se pueden apreciar bandas características de las transiciones $\pi\pi^*$ de compuestos aromáticos entre los 200 y 400 nm y bandas representativas de transiciones $n\pi^*$ que indican sustituciones en los anillos entre los 400 y los 600 nm.

En el espectro FT-IR (figura 20 b)) se aprecia una banda ancha en aproximadamente 3300 cm^{-1} característica de grupos hidroxilo (OH), se observa la banda característica de los Csp^3 por debajo de 3000 cm^{-1} , también, la banda correspondiente al grupo carbonilo (C=O) en 1725 cm^{-1} y la banda correspondiente a vibraciones C-O en 958 cm^{-1} .

En el espectro de $^1\text{H-RMN}$ de M5 (figura 20 c)), se observan cinco señales múltiples y una simple en la región aromática, entre 7 y 8 ppm, entre los 6 y 7 ppm se observan varias señales probablemente debidas a insaturaciones en la mezcla hacia campo alto. También se observan señales anchas cerca de 5 ppm, indicativas de la presencia de protones de alcoholes, además se aprecian varias señales intensas simples y múltiples, las cuales deben formar parte de cadenas alifáticas.

Mientras tanto, en el espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ (figura 20 d)) se observa una señal en 167.8 ppm, correspondiente a carbono del grupo funcional éster o derivado de ácidos, múltiples señales en la región aromática entre 110-150 ppm, así como señales de carbonos alifáticos a campo alto. Por tanto, M5 también puede corresponder a una mezcla de ácidos grasos y derivados de estos.

- C1-R1: Para caracterizar este metabolito se analizaron diferentes técnicas espectroscópicas como UV-Vis (figura 21 a)), FT-IR (figura 21 b)), $^1\text{H-RMN}$ (figura 21 c)), $^{13}\text{C-RMN}$ (figura 21 d)) y espectrometría de masas (figura 21 e)).

En la determinación del espectro UV-Vis (figura 21 a)) del compuesto C1R1 se utilizó como disolvente diclorometano, en este se pueden apreciar bandas características de las transiciones $\pi\pi^*$ de compuestos aromáticos entre los 200 y 400 nm y bandas representativas de transiciones $n\pi^*$ que indican sustituciones en los anillos entre los 400 y los 500 nm.

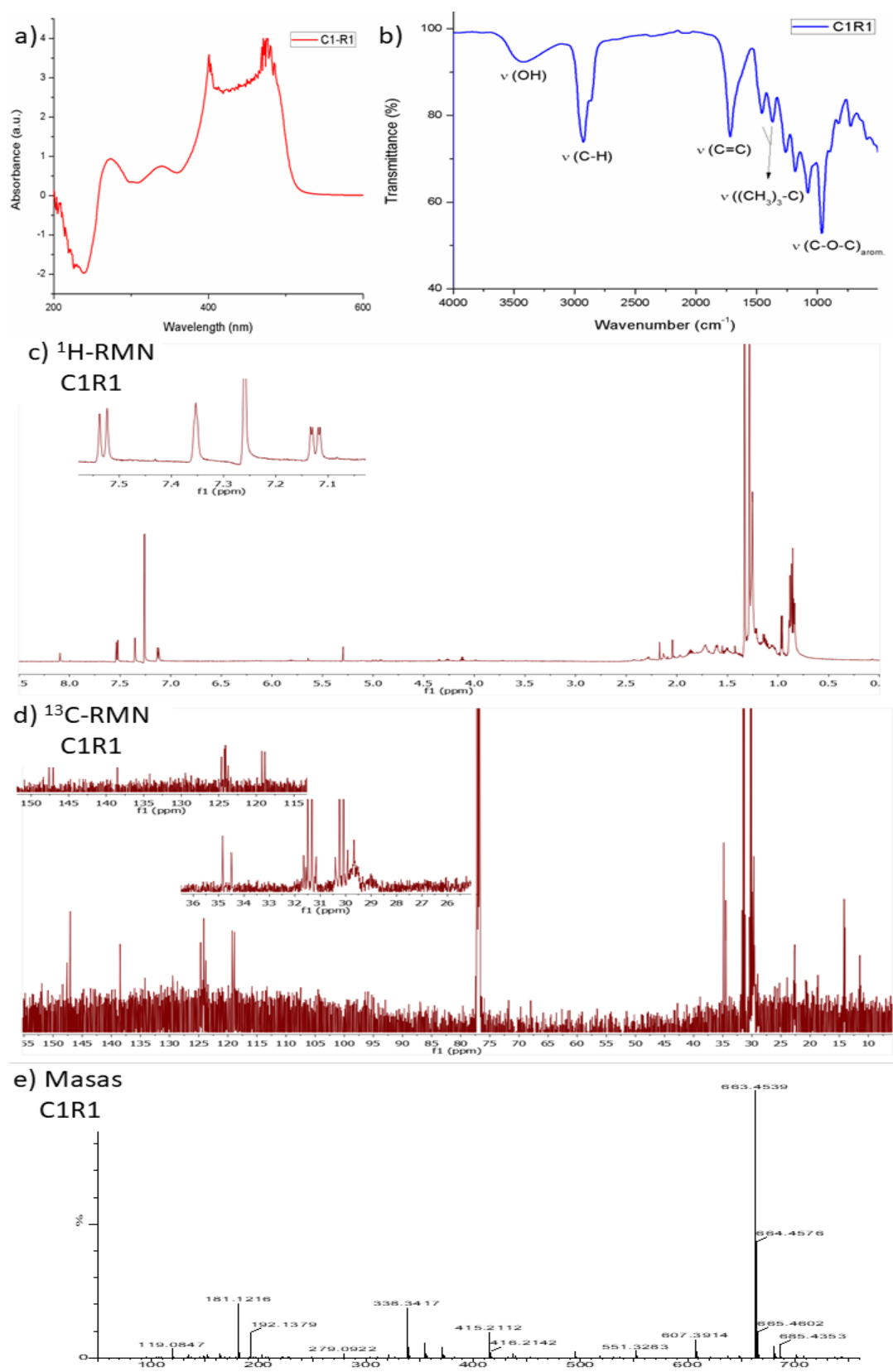


Fig. 21. Caracterización espectroscópica del metabolito C1-R1: a) UV-Vis, b) FT-IR, c) $^1\text{H-RMN}$, d) $^{13}\text{C-RMN}$ y e) Espectrometría de masas de alta resolución modo positivo

En la figura 21 b) se observa el espectro FT-IR de la muestra C1R1, en él se aprecian señales significativas de diferentes grupos funcionales. Una banda ancha en aproximadamente 3300 cm^{-1} característica de grupos hidroxilo (OH), por debajo de 3000 cm^{-1} se presenta una banda intensa que corresponde a los enlaces C-H (Csp^3). En 1720 cm^{-1} se observa una banda asociada a los dobles enlaces C=C, probablemente desplazada debido a un gran número de Csp^2 , en 1365 cm^{-1} aparece una banda precedida por otra de menor intensidad que muestran el índice de ramificación representativo para el grupo terbutilo. Aproximadamente en 960 cm^{-1} se observa una banda intensa correspondiente a la tensión del enlace C-O-C en éteres difenólicos.

En el espectro de ^1H -RMN de la muestra C1R1 (figura 21c)), se observan tres señales correspondientes a un sistema aromático trisustituido. En 7.53 ppm se encuentra una señal doble con una constante de acoplamiento en posición *orto* de 8.7 Hz. También, se localiza una señal doble con un desplazamiento químico de 7.35 ppm con $J=2.4$ Hz y una señal doble de dobles desplazada a 7.13 ppm, con $J=8.7, 2.4$ Hz. Hacia campo alto, se observan dos señales intensas simples, la primera en 1.33 ppm y la segunda en 1.28 ppm que al integrarse guardan una relación 9:1 con respecto a las señales de los protones aromáticos. Por lo cual, estas señales pertenecen a tres grupos metilo cada una. Mientras tanto, en el espectro de ^{13}C -RMN acoplado (figura 21 d)) se observan seis señales de carbonos aromáticos en: 147.6, 147.1, 138.5, 124.3, 124.1 y 119.1 ppm. En la región alifática se ubican cuatro señales 34.9, 34.5, 31.4 y 30.2 ppm. Por otro lado, en la figura 21 e), que corresponde al espectro de masas de alta resolución en modo positivo (MS ES+), se observa el pico ion molecular con relación $m/z= 663.45$, que indica que la simplicidad relativa observada en las señales en RMN podría deberse a una estructura simétrica con unidades repetidas y se propone la fórmula condensada $\text{C}_{46}\text{H}_{63}\text{O}_3$ [M+H]. Por lo que se sugiere la siguiente estructura para este compuesto (figura 22):

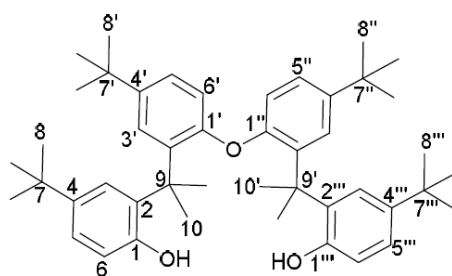


Fig. 22. Estructura química del saliramofenol

En el espectro de masas de alta resolución en modo negativo (MS ES-) que se presenta en la figura 23 a) se observan dos picos con mayor abundancia $m/z= 283.26$ y 255.23 , estos pueden corresponderse con los fragmentos más estables de la molécula de saliramofenol que fue propuesta, los fragmentos se presentan en la figura 23 b). Lo que concuerda con la estructura sugerida para la molécula C1R1. Uno de los fragmentos más abundantes que se observa es la ruptura del enlace del éster, resultando el del difenilo que perdió uno de los terbutilos, de masa 283.26 . El fragmento de masa 255.23 puede deberse a la ruptura del enlace éster, además la pérdida de un terbutilo y tres grupos metilo, uno de los cuales puede haberse unido al oxígeno que quedó con carga negativa, como se observa en la figura 23 b).

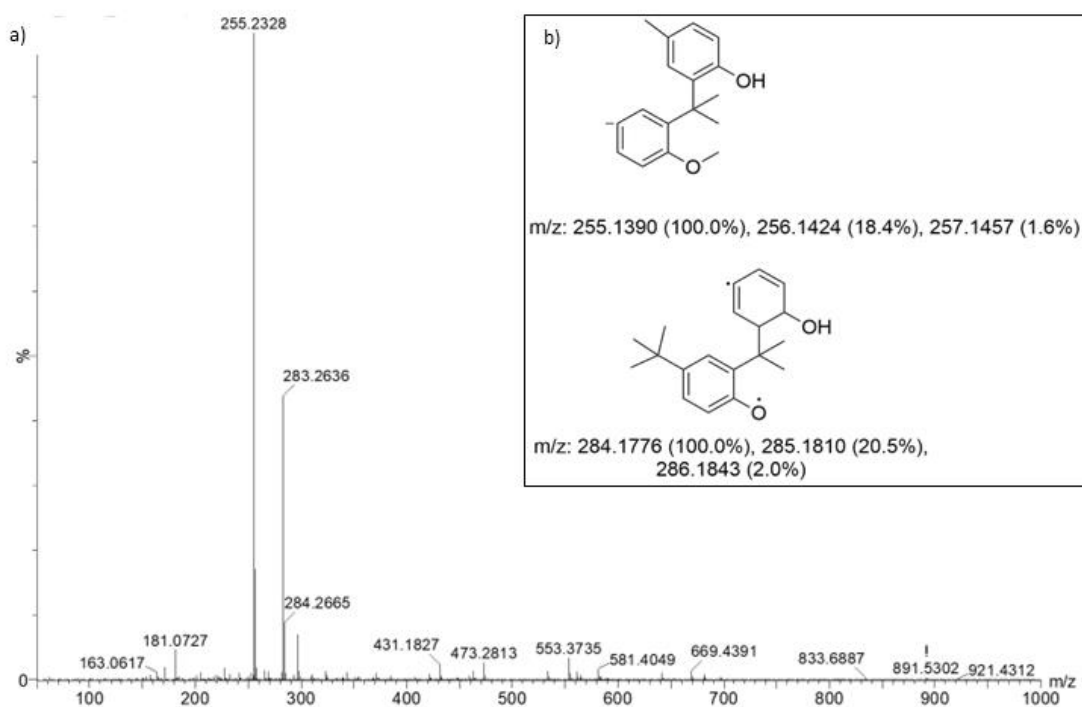


Fig. 23. a) Espectrometría de masas de alta resolución modo negativo y b) fragmentos obtenidos

Al tratarse de un tetrámero, las integrales obtenidas en el espectro de ^1H -RMN y la cantidad de señales de observadas en ^{13}C -RMN corresponden a cuatro veces su valor. De esta manera la cantidad de hidrógenos y carbonos, concuerdan con la fórmula química propuesta. En la literatura se encontró que la estructura propuesta corresponde al producto natural saliramofenol aislado de la especie *Salicornia ramosissima* J. Woods.⁵⁵

5.3. Obtención del material carbonoso a partir de la biomasa residual

La biomasa residual de las extracciones se reservó y utilizó para obtener un material carbonoso que pudiera aplicarse en determinados procesos fisicoquímicos con el objetivo de aprovechar todo el material orgánico que la biomasa de esta planta tan importante nos brinda y generar la menor cantidad de desechos al entorno. En función de esto, se empleó la biomasa residual de las extracciones obtenidas a 40, 80 y 160 °C para evaluar si existen diferencias significativas en los materiales carbonosos obtenidos de biomazas tratadas a diferentes temperaturas de extracción. En primer lugar, se realizó un análisis termogravimétrico bajo las mismas condiciones para determinar la temperatura a la cuál se le aplicaría el tratamiento térmico. Las gráficas obtenidas se muestran en la figura 23. Se observa que mientras aumenta la temperatura de extracción de metabolitos el porcentaje de pérdida de masa asociado a compuestos orgánicos (pirólisis reactiva) es menor, lo que corrobora que cuando aumenta la temperatura de extracción se obtiene mayor cantidad de metabolitos, mientras que la descomposición de lignina, que se observa enseguida, se mantiene prácticamente igual independientemente de la temperatura de extracción.

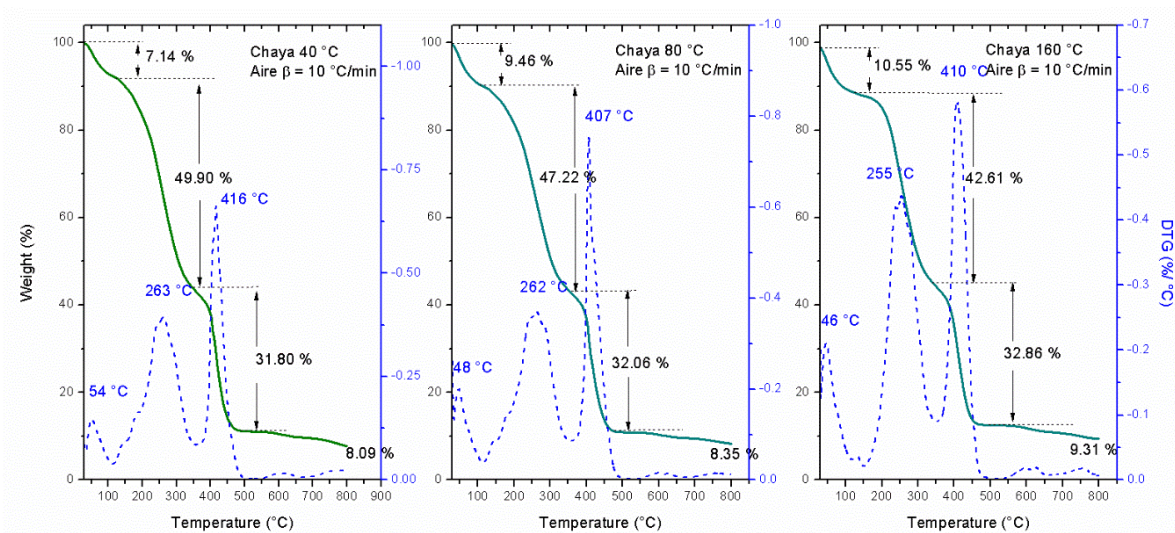


Fig. 24. TGA de las biomazas residuales de las extracciones a las temperaturas de 40, 80 y 160 °C

A partir de la información extraída de las gráficas se determinó que la temperatura óptima para realizar el tratamiento térmico es 450 °C, de modo que se procedió a aplicar la metodología descrita en el capítulo anterior en la figura 6. Se obtuvieron masas de material carbonoso de 2.46, 2.72 y 3.28 g a partir de 10 g de biomasa obtenida de la extracción a 40,

80 y 160 °C, respectivamente, con porcentajes de pérdida de peso en el proceso de carbonización de 75.39, 72.79 y 67.17%, respectivamente.

5.3.1. Caracterización estructural y morfológica

Los materiales carbonosos obtenidos a partir del TT a 450 °C de la biomasa residual luego de los procesos de extracción se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas y de difracción de rayos X como se muestra en la figura 24. Mediante el análisis de la figura 24 a) se aprecia el patrón característico de los materiales tipo óxido de grafeno (banda D en aproximadamente 1360 cm^{-1} , banda G en aproximadamente 1600 cm^{-1} y la señal en 2860 cm^{-1} que corresponde a la banda 2D) para los materiales carbonosos obtenidos a partir de las biomazas residuales a las tres temperaturas de extracción. Los valores de la relación $I_D/I_G = 0.79$ son aproximadamente iguales para los tres materiales, lo cual se aprecia debido a la superposición de los tres espectros, indicando una organización estructural muy parecida entre ellas que es independiente de la temperatura de extracción. Si se compara con otros materiales tipo grafeno que se obtienen a partir de biomazas usando TT,³⁰ se observa que los carbones que se obtienen en el presente trabajo poseen menores valores de la relación I_D/I_G , lo cual indica una mayor organización bidimensional y una menor proporción de defectos en su estructura.

Mediante difracción de rayos X, figura 24 b) se aprecia en las tres muestras el plano 002 en aproximadamente 25° ($d_{002} = 0.36\text{ nm}$) que indica una ligera expansión del parámetro de red en el eje c de la estructura entre láminas de grafenos probablemente debido a cierto grado de oxidación.⁵⁴ La intensidad de esta señal es muy baja debido a la presencia de impurezas con un apreciablemente mayor grado de cristalinidad, en forma de sales como (KCl, CaCO_3 , Na_2CO_3 y MgCO_3). En otros trabajos consultados, se aprecian con mayor claridad los planos característicos a materiales tipo grafeno en aproximadamente 26 y 43° , respectivamente,²⁹ esto se explica porque en general, luego de los TT, los materiales son sometidos a diferentes procesos de activación y lavado que permiten eliminar la mayor parte de las sales y quedan de esta forma materiales mucho más puros.

En la figura 24 c) se observan los espectros XPS, se corrobora la presencia de las sales encontradas en los difractogramas mediante las señales características de O_{1s} , C_{1s} , Na_{1s} , Ca_{2p} y K_{2p} . Los valores de las razones C/O son 1.45, 1.85 y 1.37 para las temperaturas de

extracción 40, 80 y 160 °C, respectivamente, si se compara con otros materiales obtenidos a partir de diferentes biomazas se tiene que los valores de esta razón son semejantes, esto indica que los materiales obtenidos en este trabajo poseen características estructurales semejantes a otros que se obtienen mediante procesos térmicos con activación y dopaje.^{30,36,56}

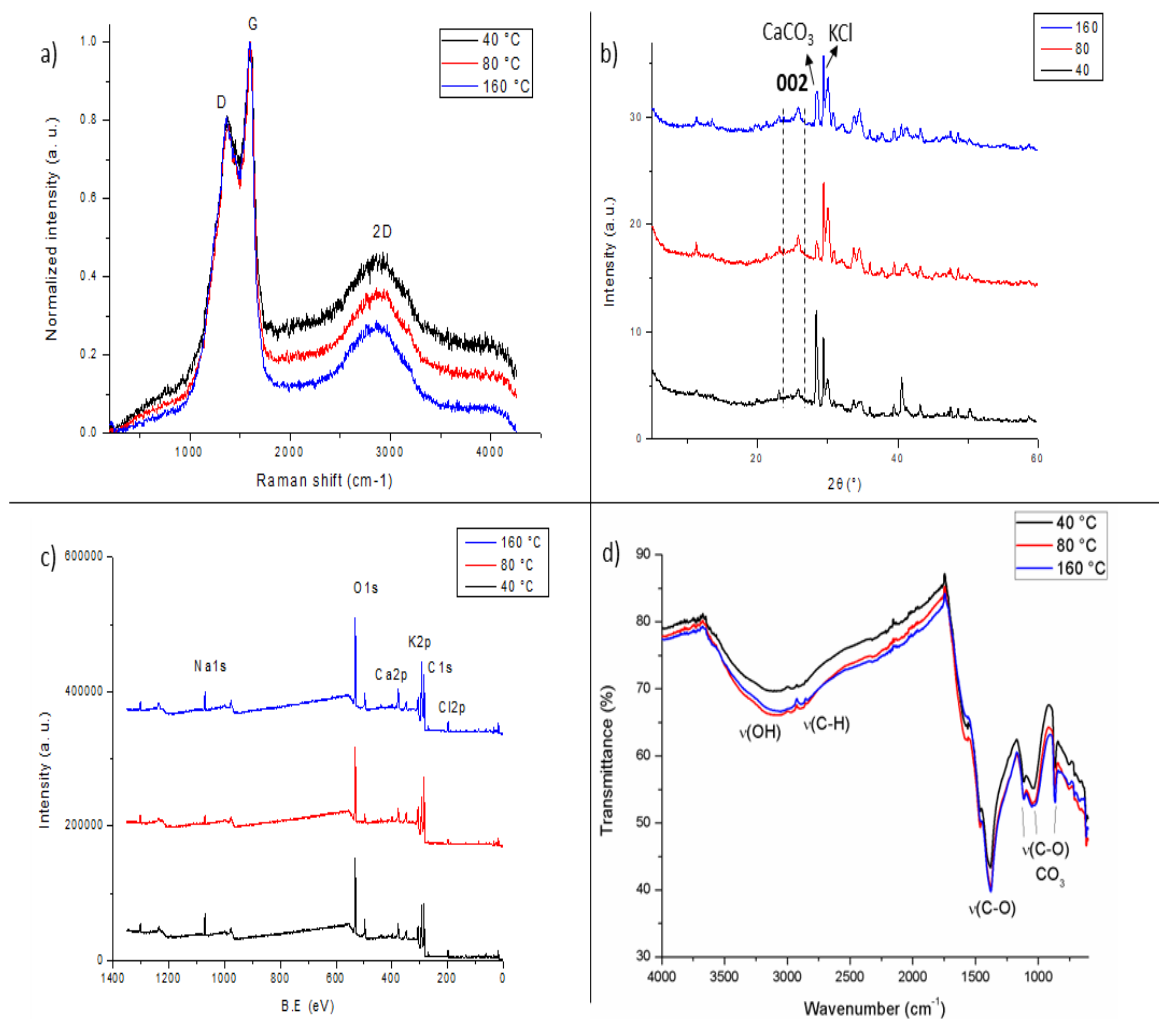


Fig. 25. Caracterización combinada de los materiales carbonosos obtenidos: a) Espectroscopia Raman, b) Difracción de Rayos X, c) Espectroscopia XPS y d) Espectroscopia FT-IR

Mediante el empleo de la espectroscopia infrarroja (figura 24 d)) se puede sugerir el carácter tipo óxido de grafeno de los tres materiales carbonosos obtenidos, ya que se aprecian señales características de grupos funcionales orgánicos como la banda en $\sim 3090\text{ cm}^{-1}$ asociada a grupos hidroxilo ($\nu(\text{OH})$), una banda debajo de 3000 cm^{-1} , asignada a carbonos alifáticos C_{sp^3} , una banda en $\sim 1384\text{ cm}^{-1}$ ($\nu(\text{C-O})$) asociada a fragmentos fenólicos debido a la descomposición de restos de lignina⁵⁷ y las bandas en ~ 1100 , 1032 y 866 cm^{-1} que se

asocian con las vibraciones de valencia y doblaje dentro y fuera del plano de los carbonatos presentes.⁵⁸ La caracterización realizada concuerda y corrobora la presencia de zonas bidimensionales (Raman y DRX), grupos funcionales orgánicos (XPS y FT-IR), además de impurezas en forma de sales (DRX), siendo estas características típicas de materiales tipo óxido de grafeno que se obtienen a partir de biomazas sin someterse a procesos de activación o lavado.

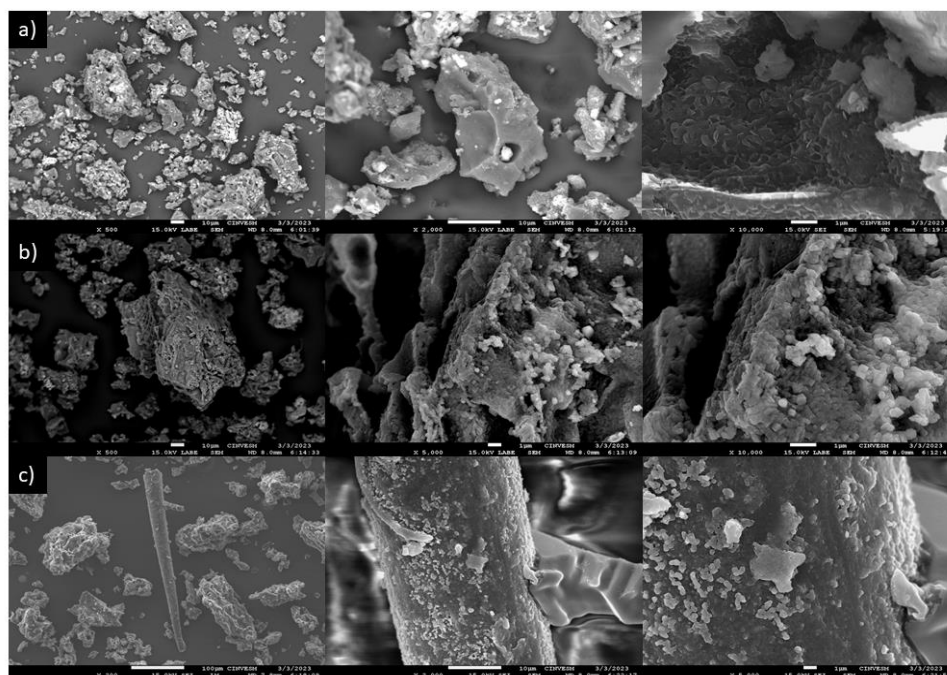


Fig. 26. Microscopía electrónica de barrido de los materiales carbonosos obtenidos de las biomazas residuales de las extracciones a las temperaturas de: a) 40 °C, b) 80 °C y c) 160 °C

Además de las técnicas discutidas, se realizó un análisis por microscopía SEM de los tres materiales carbonosos obtenidos del TT de las biomazas residuales de las extracciones a las tres temperaturas indicadas en la figura 26. En ella se observa la superficie irregular de los materiales carbonosos obtenidos, así como la porosidad en los mismos. Con el objetivo de conocer su composición cuantitativa se realizó además un análisis EDS (figura 27) donde se muestra una tabla con la composición cuantitativa de los elementos químicos presentes en los materiales carbonosos, dada la similitud de los tres materiales obtenidos a partir de las tres temperaturas de extracción se presenta una imagen y tabla representativa (material carbonoso obtenido de la biomasa residual de la extracción a 80 °C), donde se aprecia que tanto el carbono como el oxígeno son los elementos con mayor porcentaje en masa. Otros

elementos se identifican formando sales como K, Cl, Na, N, Mg y Ca y también aparecen algunas impurezas poco significativas de Si, P, S y Al.

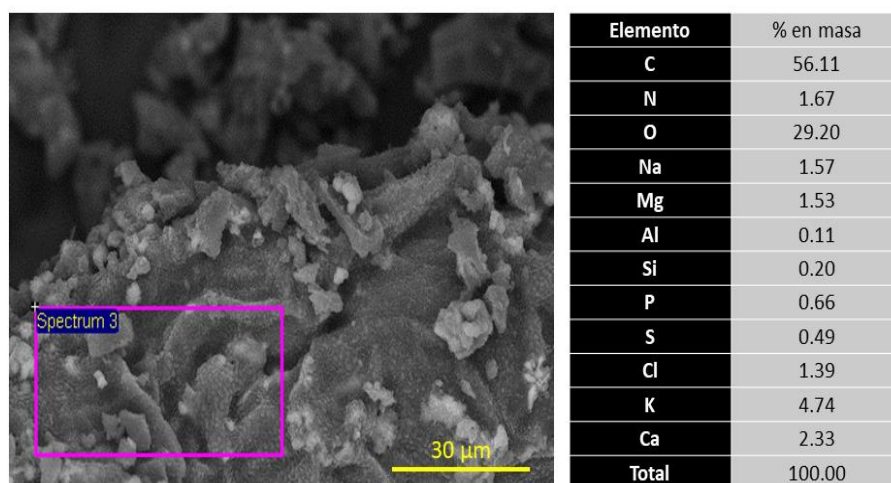


Fig. 27. Análisis EDS representativo de los tres materiales carbonosos obtenidos

Toda la información estructural y morfológica realizada a los materiales carbonosos obtenidos a partir de la biomasa restante de las extracciones con isopropanol a las temperaturas de 40, 80 y 160 °C permite concluir que los materiales obtenidos tienen características similares independientemente de la temperatura que fue aplicada a la biomasa en la extracción de los metabolitos.

5.4. Descomposición de azul de metileno

Se sintetizó TiO₂ al 6%, el resultado de la síntesis se corroboró con DRX, al igual que el material compuesto C-TiO₂. Los difractogramas se muestran en la figura 27.

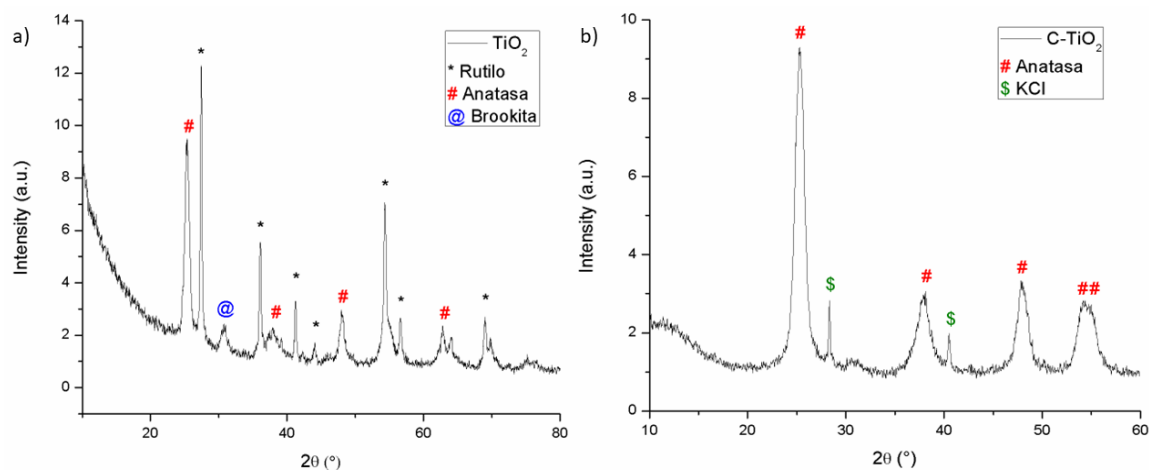


Fig. 28. Difracción de rayos X: a) TiO₂ al 6 % en masa y b) C-TiO₂

Mediante la difracción de rayos X del TiO_2 al 6% en masa obtenido (figura 28 a)) se puede observar como producto TiO_2 en las tres fases cristalinas, rutilo, anatasa y brookita, siendo la fase rutilo predominante, seguida de anatasa y por último brookita. Los valores de tamaño de cristalito calculado según la ecuación de Debye-Sherrer son 7.4 nm para la anatasa en el TiO_2 sintetizado y 5.8 nm para la anatasa obtenida sobre el material carbonoso, estos valores resultaron menores que los reportados en la literatura,^{44,59} lo cual favorece la actividad fotocatalítica de los materiales compuestos obtenidos en este trabajo. Sin embargo, es la fase anatasa, por sus propiedades, la más utilizada como fotocatalizador. Para el material compuesto C- TiO_2 se puede apreciar la difracción de rayos X en la figura 28 b), en esta se observa que la fase cristalina anatasa es la predominante en este material y presenta algunas impurezas de KCl, las impurezas de los óxidos metálicos fueron removidas por el ácido utilizado. También se realizó un análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido, el cual se presenta en la figura 29.

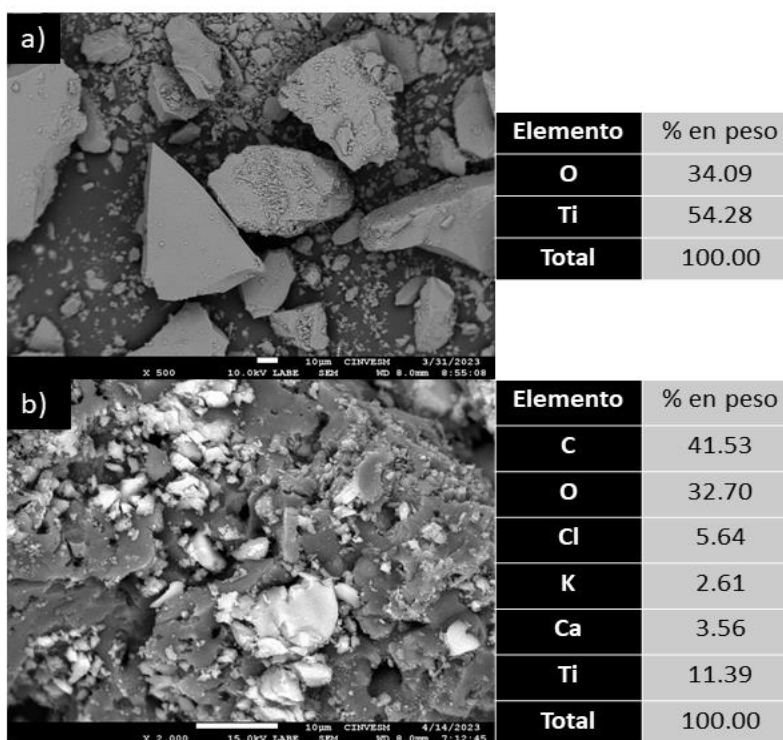


Fig. 29. Microscopía SEM y análisis estructural EDS en: a) TiO_2 al 6 % y b) C- TiO_2

El estudio morfológico revela en la figura 29 a) que el dióxido de titanio sintetizado es probablemente nanoestructurado pero forma aglomerados muy grandes. En la figura 29 b) puede observarse que, a pesar de no distinguirse el tamaño de nanopartícula del TiO_2 , este se

encuentra en los poros de la estructura del material carbonoso, de modo que se logró obtener un material compuesto C-TiO₂. El análisis elemental en ambos casos corrobora lo obtenido en DRX.

Para analizar el efecto fotocatalizador del material compuesto obtenido, siguiendo el procedimiento del capítulo anterior, este fue puesto en contacto con una disolución de azul de metileno, al igual que el TiO₂ y el polvo carbonoso por sí solo. En la figura 30 se muestra una imagen del experimento antes y después de la exposición al sol.

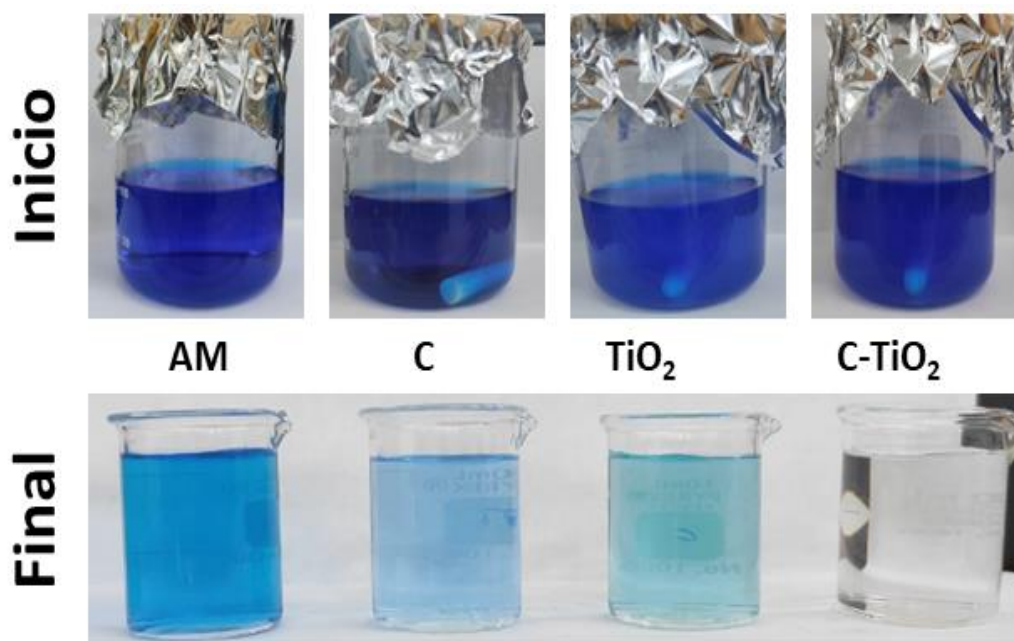


Fig. 30. Experimento de degradación de azul de metileno

En la figura 30 se aprecia como por la acción del sol el color en la disolución de azul de metileno disminuye su intensidad, lo que cualitativamente implica una degradación. De izquierda a derecha, al inicio los frascos contenían: 100 ml de disolución de azul de metileno (AM) de concentración 25 mg/L, en las tres restantes, además de los 100 ml de disolución contenían 20 mg de material carbonoso (C), el siguiente 20 mg de TiO₂ y la última de la derecha 20 mg de material compuesto C-TiO₂. Este experimento se monitoreo por espectroscopía UV-Vis, el espectro de absorción de cada muestra posterior a la exposición al sol se muestra en la figura 31.

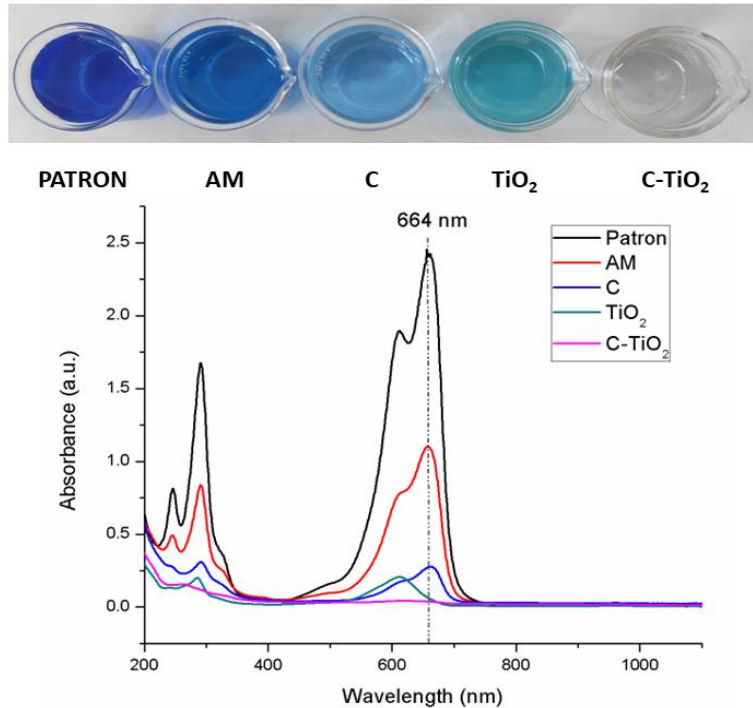


Fig. 31. Espectro de absorción UV-Vis de las disoluciones posterior al proceso de descomposición del azul de metileno

En el espectro se observa sobre los 664 nm la banda asociada al azul de metileno, con respecto al patrón (línea en negro, $A = 2.4$ a.u.). Por otra parte, las 4 disoluciones expuestas al sol muestran una disminución considerable de la absorbancia. En rojo se muestra el espectro correspondiente al azul de metileno ($A = 1.1$ a.u.), lo que evidencia que la luz descompone en cierta medida por sí sola a la molécula. Sin embargo, para las líneas en azul ($A = 0.5$ a.u.) y verde ($A = 0.4$ a.u.), los espectros de las disoluciones que contenían material carbonoso y TiO_2 respectivamente muestran una absorbancia considerablemente por debajo de las curvas del patrón y de la descomposición propia de la molécula, aunque mantienen la señal característica de esta. Por otra parte, en rosa ($A = 0$ a.u.) se observa el espectro correspondiente a la disolución que contenía el material compuesto (C-TiO_2), este espectro muestra que la acción de este logró la descomposición completa de la molécula de azul de metileno. Por lo tanto, el TiO_2 actúa como fotocatalizador según el mecanismo que se explica al inicio de esta tesis en el capítulo III, pero como la fase anatasa no es la predominante en este caso no se logra una descomposición completa. En el caso del material carbonoso, este debe de actuar como adsorbente de las moléculas de azul de metileno debido a la superficie porosa del material. En el material compuesto, el TiO_2 actúa como fotocatalizador y los poros

que puedan quedar disponibles actúan como adsorbentes, creando una sinergia entre los dos materiales que se encargan de desintegrar la molécula. Una vez filtradas las disoluciones, después de la reacción, se secaron los sólidos y se analizaron por SEM para comprobar lo discutido.

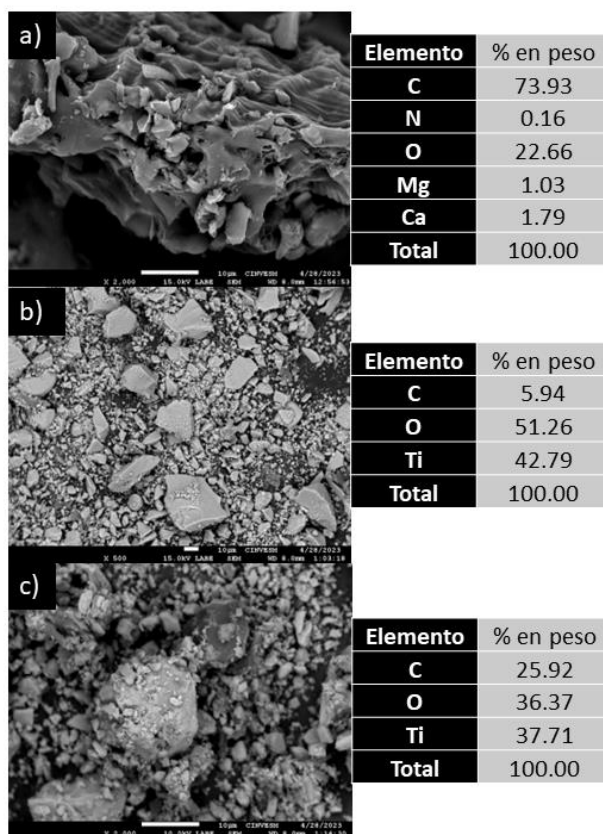


Fig. 32. Microscopía SEM y análisis EDS de los materiales posterior a la exposición con azul de metileno: a) material carbonoso, b) TiO_2 y c) C-TiO_2

En la figura 32 se observa la morfología de los tres sólidos expuestos al azul de metileno, en el caso del material carbonoso (figura 32 a)) se observa una superficie menos irregular, con poros apreciablemente cubiertos y un aumento del porcentaje en peso del C fundamentalmente, lo que indica una adsorción de la molécula sobre la superficie porosa. En la figura 32 b) se observa que el tamaño de las partículas del TiO_2 es significativamente menor que antes de la exposición al azul de metileno, esto puede deberse a la agitación a la que fue sometida la disolución, en este caso aparece un 5.94 % en peso de C, que se asocia a los rastros de los resultados de la descomposición fotocatalítica del azul de metileno. Por último, en la figura 32 c) se observa titanio en el análisis por EDS, el cuál actuó como catalizador y a su vez no se observan poros visibles en la superficie del material carbonoso.

En este sentido, se puede concluir que el material compuesto sintetizado alcanzó una sinergia que le permitió tener el mejor desempeño en la descomposición de la molécula de azul de metileno por fotocatalisis, lo que se explica en trabajos previamente publicados.^{44,59,60}

VI. Conclusiones

- La influencia de la temperatura en la extracción de los metabolitos secundarios de hojas de chaya fue evaluada, de modo que se determinó que a temperaturas superiores a 80 °C se logra una extracción adecuada y se escoge el método de extracción por reflujo debido a la practicidad que este aporta.
- La influencia de tres disolventes en la extracción de metabolitos secundarios en hojas de chaya fue estudiada: hexano, acetato de etilo e isopropanol, siendo este último disolvente el que aportó mayor cantidad de fracciones de extracción y en la evaluación cualitativa de la CCF estas se muestran más intensas, por tanto, se eligió el isopropanol como disolvente para realizar las extracciones.
- Por cromatografía de columna tipo *flash* se separaron cuatro fracciones metabólicas clasificadas como M1, M2, M4 y M5, estas fracciones contienen fundamentalmente grupos funcionales derivados de ácidos carboxílicos, por tanto, deben ser mezclas de ácidos grasos. Además, se aisló un metabolito clasificado como C1R1, para el cual, con base en el análisis espectroscópico, se propone la estructura del saliramofenol.
- A partir de la biomasa residual de las extracciones de hojas de chaya se obtuvo un material carbonoso, el cual fue caracterizado y presenta propiedades similares a materiales tipo óxido de grafeno.
- La actividad fotocatalítica del material carbonoso compuesto con dióxido de titanio fue evaluada, obteniéndose la descomposición completa de la molécula de azul de metileno.

Este trabajo de investigación tiene un alto impacto ya que pone en valor un producto endémico de la región tan importante como es la chaya, a partir de la extracción y caracterización de sus componentes químicos, así como el aprovechamiento de la biomasa residual, a partir de la cual se obtuvo un material con propiedades importantes, estos resultados fueron posibles gracias a la aplicación de herramientas fisicoquímicas. Los productos obtenidos pueden aplicarse potencialmente en la industria medioambiental, en el avance científico para el desarrollo de productos naturales y, por tanto, representan provecho a la sociedad.

VII. Perspectivas

- Aislar e identificar los metabolitos secundarios obtenidos en las fracciones de la extracción con isopropanol.
- Continuar profundizando en la caracterización del producto natural obtenido C1R1 para corroborar la estructura propuesta o plantear una estructura más adecuada.
- Estudiar la cinética de descomposición de azul de metileno con el material compuesto C-TiO₂ con una fuente de luz UV controlada.

Referencias Bibliográficas

- (1) Petrovska, B. B. Historical Review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews* **2012**, *6*, 1-5.
- (2) Hao, D.-C.: Chapter 1 - Genomics and Evolution of Medicinal Plants. In *Ranunculales Medicinal Plants*; Hao, D.-C., Ed.; Academic Press, 2019; pp 1-33.
- (3) Ohadoma, S. Phytochemical constituents and antibacterial activities of aqueous and hydromethanolic leaf extracts of chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*). *Futo J. Ser* **2016**, *2*, 195-204.
- (4) Kuri-García, A.; Guzmán, S. Phenolic profile and antioxidant capacity of *Cnidoscolus chayamansa* and *Cnidoscolus aconitifolius*: A review. *Journal of Medicinal Plants Research* **2017**, *11*, 713-727.
- (5) Manzanilla Valdez, M. L.; Acevedo Fernández, J. J.; Segura Campos, M. R. Antidiabetic and hypotensive effect of *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill) IM Johnst leaves extracts. *Journal of Food Measurement and Characterization* **2021**, *15*, 5245-5255.
- (6) Padilla-Camberos, E.; Torres-Gonzalez, O. R.; Sanchez-Hernandez, I. M.; Diaz-Martinez, N. E.; Hernandez-Perez, O. R.; Flores-Fernandez, J. M. Anti-Inflammatory activity of *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) ethyl acetate extract on croton oil-induced mouse ear edema. *Applied Sciences* **2021**, *11*, 9697.
- (7) Chin-Chan, T.; Ortiz-García, M.; Ruiz-Gil, P.; Martínez-Castillo, J. Diversidad genética de la chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) IM Johnst. ssp. *aconitifolius*) en Yucatán, México, su posible centro de domesticación. *Polibotánica* **2021**, 185-201.
- (8) Ross-Ibarra, J.; Molina-Cruz, A. The ethnobotany of Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* SSP. *Aconitifolius breckon*): A nutritious Maya Vegetable. *Economic Botany* **2002**, *56*, 350-365.
- (9) Cressey, P.; Saunders, D.; Goodman, J. Cyanogenic glycosides in plant-based foods available in New Zealand. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2013**, *30*, 1946-1953.
- (10) García-Rodríguez, R. V.; Gutiérrez-Rebolledo, G. A.; Méndez-Bolaina, E.; Sánchez-Medina, A.; Maldonado-Saavedra, O.; Domínguez-Ortiz, M. Á.; Vázquez-

Hernández, M.; Muñoz-Muñiz, O. D.; Cruz-Sánchez, J. S. *Cnidoscopus chayamansa* Mc Vaugh, an important antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective plant used in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* **2014**, *151*, 937-943.

(11) Rodrigues, L. G. G.; Mazzutti, S.; Siddique, I.; da Silva, M.; Vitali, L.; Ferreira, S. R. S. Subcritical water extraction and microwave-assisted extraction applied for the recovery of bioactive components from Chaya (*Cnidoscopus aconitifolius* Mill.). *The Journal of Supercritical Fluids* **2020**, *165*, 104976.

(12) González-Laredo, R.; Flores De La Hoya, M.; Quintero-Ramos, M.; Karchesy, J. Flavonoid and cyanogenic contents of chaya (spinach tree). *Plant Foods for Human Nutrition* **2003**, *58*, 1-8.

(13) Ajiboye, B. O.; Ojo, O. A.; Okesola, M. A.; Oyinloye, B. E.; Kappo, A. P. Ethyl acetate leaf fraction of *Cnidoscopus aconitifolius* (Mill.) I. M. Johnst: antioxidant potential, inhibitory activities of key enzymes on carbohydrate metabolism, cholinergic, monoaminergic, purinergic, and chemical fingerprinting. *International Journal of Food Properties* **2018**, *21*, 1697-1715.

(14) Numa, S.; Rodríguez, L.; Rodríguez, D.; Coy-Barrera, E. Susceptibility of *Tetranychus urticae* Koch to an ethanol extract of *Cnidoscopus aconitifolius* leaves under laboratory conditions. *SpringerPlus* **2015**, *4*, 338.

(15) Zhang, Q.-W.; Lin, L.-G.; Ye, W.-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine* **2018**, *13*, 20.

(16) Fongang Fotsing Yannick, S.; Bankeu Kezetas Jean, J.; Gaber El-Saber, B.; Iftikhar, A.; Lenta Ndjakou, B.: Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Plants and Herbs. In *Natural Medicinal Plants*; Hany, A. E.-S., Ed.; IntechOpen: Rijeka, 2021; pp Ch. 9.

(17) Bucar, F.; Wube, A.; Schmid, M. Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds. *Natural Product Reports* **2013**, *30*, 525-545.

(18) Elsa Lundanes, L. R., Tyge Greibrokk: *Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*, 2013.

(19) Shanmugam, V. *Green extraction of natural products: theory and practice*. **2015**, *4*, 453-454.

- (20) Bimakr, M.; Rahman, R. A.; Taip, F. S.; Ganjloo, A.; Salleh, L. M.; Selamat, J.; Hamid, A.; Zaidul, I. S. M. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata L.*) leaves. *Food and Bioproducts Processing* **2011**, *89*, 67-72.
- (21) Jadhav, D.; B.N, R.; Gogate, P. R.; Rathod, V. K. Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Engineering* **2009**, *93*, 421-426.
- (22) Virot, M.; Tomao, V.; Colnagui, G.; Visinoni, F.; Chemat, F. New microwave-integrated Soxhlet extraction: An advantageous tool for the extraction of lipids from food products. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1174*, 138-144.
- (23) Falletti, P.; Barrera Vázquez, M. F.; Cabrera, J. L.; Martini, R. E.; Comini, L. R. Valorization of Biomass Generated by Weeding of *Flaveria bidentis*: Optimization of the Process of Extraction Sulfated Flavonoids Using a Doehlert Experimental Design. *Waste and Biomass Valorization* **2023**.
- (24) Kumari, P.; Samadder, S. R. Valorization of carbonaceous waste into graphene materials and their potential application in water & wastewater treatment: a review. *Materials Today Chemistry* **2022**, *26*, 101192.
- (25) Liu, Y.-h.; Ma, Z.-k.; He, Y.; Wang, Y.; Zhang, X.-w.; Song, H.-h.; Li, C.-x. A review of fibrous graphite materials: graphite whiskers, columnar carbons with a cone-shaped top, and needle- and rods-like polyhedral crystals. *New Carbon Materials* **2023**, *38*, 18-35.
- (26) Ren, W.; Cheng, H.-M. The global growth of graphene. *Nature Nanotechnology* **2014**, *9*, 726-730.
- (27) Mbayachi, V. B.; Ndayiragije, E.; Sammani, T.; Taj, S.; Mbuta, E. R.; Khan, A. u. Graphene synthesis, characterization and its applications: A review. *Results in Chemistry* **2021**, *3*, 100163.
- (28) Mas, A. M. P.: Diseño y optimización de la estructura y propiedades de materiales grafénicos. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo **2017**.
- (29) Pérez-Salcedo, K. Y.; Alonso-Lemus, I. L.; Quintana, P.; Mena-Durán, C. J.; Barbosa, R.; Escobar, B. Self-doped *Sargassum* spp. derived biocarbon as electrocatalysts

for ORR in alkaline media. *International Journal of Hydrogen Energy* **2019**, *44*, 12399-12408.

(30) Pareja-Rodríguez, R.; Freile-Pelegrín, Y.; Robledo, D.; Ruiz-Gómez, M.; Martínez-Flores, R.; Rodríguez-Gattorno, G. Self-generated active sites in graphene oxide-like materials by controlling the oxidative decomposition reactions of *Sargassum*. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2021**, *9*, 106551.

(31) C.Q. Teong, H. D. S., N.A.S. El-Arish, M.B. Bahari, L.P. Teh. Vatica rassak wood waste-derived activated carbon for effective Pb(II) adsorption: Kinetic, isotherm and reusability studies. *Materials Today: Proceedings* **2019**, *42*, 165–171.

(32) Liu, H.; Chen, W.; Zhang, R.; Xu, C.; Huang, X.; Peng, H.; Huo, C.; Xu, M.; Miao, Z. Bioinspired in situ self-catalyzing strategy towards graphene nanosheets with hierarchical structure derived from biomass for advanced supercapacitors. *Applied Surface Science* **2021**, *566*, 150692.

(33) Yuan, S.-J.; Dong, B.; Dai, X.-H. Facile and scalable synthesis of high-quality few-layer graphene from biomass by a universal solvent-free approach. *Applied Surface Science* **2021**, *562*, 150203.

(34) Sankar, S.; Lee, H.; Jung, H.; Kim, A.; Ahmed, A. T. A.; Inamdar, A. I.; Kim, H.; Lee, S.; Im, H.; Young Kim, D. Ultrathin graphene nanosheets derived from rice husks for sustainable supercapacitor electrodes. *New Journal of Chemistry* **2017**, *41*, 13792-13797.

(35) Somanathan, T.; Prasad, K.; Ostrikov, K.; Saravanan, A.; Krishna, V. M. Graphene Oxide Synthesis from Agro Waste. *Nanomaterials*, 2015.

(36) Herrera-Zamora, D. M.; Pareja-Rodríguez, R.; Ruiz-Gómez, M.; González-Gómez, W. S.; Velasco-Arias, D.; García-Valladares, O.; Escobar, S.; Rodríguez-Gattorno, G.; Martínez-Flores, R. Dispersibility study of GO-like biocarbons obtained from the thermal decomposition of biomass: *Phragmites australis* and *Carya illinoensis*. *Biomass and Bioenergy* **2023**, *172*, 106749.

(37) Clifton, J. I.; Leikin, J. B. Methylene Blue. *American Journal of Therapeutics* **2003**, *10*, 289-291.

- (38) Khan, I.; Saeed, K.; Zekker, I.; Zhang, B.; Hendi, A. H.; Ahmad, A.; Ahmad, S.; Zada, N.; Ahmad, H.; Shah, L. A.; Shah, T.; Khan, I. Review on Methylene Blue: Its Properties, Uses, Toxicity and Photodegradation. *Water*, 2022.
- (39) Ginimuge, P. R.; Jyothi, S. D. Methylene blue: revisited. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology* **2010**, *26*, 517-520.
- (40) Bužga, M.; Machytka, E.; Dvořáčková, E.; Švagera, Z.; Stejskal, D.; Máca, J.; Král, J. Methylene blue: a controversial diagnostic acid and medication? *Toxicology Research* **2022**, *11*, 711-717.
- (41) West, A. R.: *Solid State Chemistry and its Applications*; John Wiley & Sons, 2014.
- (42) Ochoa, Y.; Ortegón, Y.; Rodríguez Páez, J. E. Synthesis of TiO₂, anatase phase by the sol-gel method: study of the effect of the presence of AcacH in the system. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia* **2013**, *0*, 29-40.
- (43) Thakre, K. G.; Barai, D. P.; Bhanvase, B. A. A review of graphene-TiO₂ and graphene-ZnO nanocomposite photocatalysts for wastewater treatment. *Water Environment Research : a research publication of the Water Environment Federation* **2021**, *93*, 2414-2460.
- (44) Aqeel, M.; Anjum, S.; Imran, M.; Ikram, M.; Majeed, H.; Naz, M.; Ali, S.; Ahmad, M. A. TiO₂ @ RGO (reduced graphene oxide) doped nanoparticles demonstrated improved photocatalytic activity. *Materials Research Express* **2019**, *6*, 086215.
- (45) JAIN, A.; VAYA, D. Photocatalytic activity of TiO₂ nanomaterial. *Journal of the Chilean Chemical Society* **2017**, *62*, 3683-3690.
- (46) Yang, H.; Yang, B.; Chen, W.; Yang, J. Preparation and Photocatalytic Activities of TiO₂-Based Composite Catalysts. *Catalysts*, 2022.
- (47) Raynie, D. E. Modern extraction techniques. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 3997-4004.
- (48) Gomes, J.; Batra, J.; Chopda, V. R.; Kathiresan, P.; Rathore, A. S.: Chapter 25 - Monitoring and Control of Bioethanol Production From Lignocellulosic Biomass. In *Waste Biorefinery*; Bhaskar, T., Pandey, A., Mohan, S. V., Lee, D.-J., Khanal, S. K., Eds.; Elsevier, 2018; pp 727-749.

- (49) Atkins, P. J., Julio De Paula, and James Keeler: *Atkins Physical Chemistry*; 11th ed. ed.; Oxford University Press: Oxford, 2018.
- (50) Carlos S. Pérez Martínez, P. J. O. d. T.: *Espectroscopía. Tomo I*; Empresa Editorial Poligráfica Félix Varela: Plaza de la Revolución, Cuba, 2014.
- (51) Martínez-Flores, R.; Canto-Aguilar, E. J.; Rodríguez-Gattorno, G.; Oskam, G.; Meneses-Rodríguez, D.; Ruiz-Gómez, M. A. Inkjet-Printed Reduced Graphene Oxide (rGO) Films For Electrocatalytic Applications. *Journal of The Electrochemical Society* **2019**, *166*, H3279.
- (52) Ferrari, A. C.; Meyer, J. C.; Scardaci, V.; Casiraghi, C.; Lazzeri, M.; Mauri, F.; Piscanec, S.; Jiang, D.; Novoselov, K. S.; Roth, S.; Geim, A. K. Raman Spectrum of Graphene and Graphene Layers. *Physical Review Letters* **2006**, *97*, 187401.
- (53) Skoog, D. A. H., F. J.; Crouch, S. R.: *Principles of instrumental analysis*. Cengage learning: USA, 2017.
- (54) Gao, W.: *Graphene oxide: reduction recipes, spectroscopy, and applications*; Springer, 2015.
- (55) Isca, V. M. S.; Seca, A. M. L.; Pinto, D. C. G. A.; Silva, H.; Silva, A. M. S. Saliramophenol, an unprecedented natural t-butylphenol derivative from *Salicornia ramosissima* J. Woods. *RSC Advances* **2015**, *5*, 61380-61382.
- (56) Stobinski, L.; Lesiak, B.; Malolepszy, A.; Mazurkiewicz, M.; Mierzwa, B.; Zemek, J.; Jiricek, P.; Bieloshapka, I. Graphene oxide and reduced graphene oxide studied by the XRD, TEM and electron spectroscopy methods. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **2014**, *195*, 145-154.
- (57) Liu, Y.; Hu, T.; Wu, Z.; Zeng, G.; Huang, D.; Shen, Y.; He, X.; Lai, M.; He, Y. Study on biodegradation process of lignin by FTIR and DSC. *Environmental Science and Pollution Research* **2014**, *21*, 14004-14013.
- (58) Rehman, I.; Bonfield, W. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. *Journal of Materials Science : Materials in Medicine* **1997**, *8*, 1-4.
- (59) Bilge, S.; Sinağ, A. TiO₂/core-shell structured carbon support materials derived from hydrothermal carbonization of waste masks biomass: A green photocatalyst. *Inorganic Chemistry Communications* **2022**, *144*, 109911.

(60) Donar, Y. O.; Bilge, S.; Sinağ, A. Utilisation of lignin as a model biomass component for preparing a highly active photocatalyst under UV and visible light. *Materials Science in Semiconductor Processing* **2020**, *118*, 105151.