



ESTUDIO DE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN E IMPREGNACIÓN DE EXTRACTOS NATURALES EN TELAS DE POLIÉSTER.

TRABAJO FIN DE GRADO

FACULTAD DE CIENCIAS

Memoria del Trabajo Fin de Grado presentado por la Alumna **Dña. Noelia Guerrero Muñoz**, para optar al título de **Grado en Biotecnología**

Puerto Real, Cádiz, Septiembre de 2017

Fdo. Noelia Guerrero Muñoz

DEPARTAMENTO: Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos

TUTORES: Dr. Casimiro Mantell Serrano
Dra. Lourdes Casas Cardoso

Fdo.: Dr. Casimiro Mantell Serrano

Fdo.: Dra. Lourdes Casas Cardoso

Índice

1. Resumen.....	3
2. Abstract.....	4
3. Introducción	5
3.1. Utilidad de los compuestos naturales	5
3.2. Familia Annonaceae.....	6
3.3. Tratamiento de extractos naturales empleando técnicas de alta presión	7
3.3.1. Fluidos supercríticos.....	7
3.3.2. Extracción mediante fluidos supercríticos.....	8
3.3.3. Extracción mejorada.....	9
3.3.4. Impregnación mediante fluidos supercríticos.....	10
4. Objetivos.....	12
5. Solución técnica	13
5.1. Material y métodos	13
5.1.1. Materias primas	13
5.1.2. Otros materiales	14
5.1.3. Equipos.....	15
5.1.4. Procesos de extracción	18
5.1.4.1. Condiciones de operación.....	18
5.1.4.2. Caracterización de los extractos obtenidos.....	19
5.1.4.2.1. Rendimientos de extracción.....	19
5.1.4.2.2. Actividad antioxidante.....	20
5.1.4.2.3. Actividad antimicrobiana.....	23
5.1.5. Proceso de impregnación en telas de poliéster.....	24
5.1.5.1. Condiciones de operación.....	25
5.1.5.2. Caracterización de las telas impregnadas.....	26
5.1.5.2.1. Carga impregnada.....	26
5.1.5.2.2. Actividad antioxidante.....	27
5.1.5.2.3. Actividad antimicrobiana.....	28
5.1.5.2.4. Microscopio electrónico de barrido (SEM).....	31

5.2. Discusión de los resultados experimentales.....	32
5.2.1. Caracterización de los extractos obtenidos.....	32
5.2.1.1. Rendimientos de extracción.....	32
5.2.1.2. Actividad antioxidante.....	34
5.2.1.3. Actividad frente a microorganismos.....	36
5.2.2. Caracterización de las telas impregnadas.....	37
5.2.2.1. Estudio del proceso de impregnación.....	37
5.2.2.2. Estudio de homogeneidad en las telas impregnadas.....	40
5.2.2.3. Actividad frente a microorganismos.....	42
5.2.2.4. Estudio de la matriz por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	44
6. Conclusiones.....	46
7. Perspectivas futuras.....	47
8. Bibliografía.....	48

1. Resumen

Los frutos de la familia *Annonaceae* presentan altas cualidades organolépticas, digestivas y nutritivas. También se conoce que todas las partes del árbol, incluidas las hojas, son apreciadas por sus propiedades medicinales, aunque están aún sin explotar. Estos desechos agro-industriales destacan por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y anticancerígenas, por lo que pueden ser aprovechados en la fabricación de productos dentro del campo de la cosmética, farmacia y alimentación.

En particular, este trabajo de Fin de Grado (TFG) se centra en obtener extractos naturales de elevada capacidad antioxidante y antimicrobiana a partir de subproductos de los frutos de chirimoya y *Annona montana*, así como de su posterior impregnación en telas de poliéster para la creación de telas inteligentes.

Primero, se realizan extracciones a partir de hojas de árboles de la familia *Annonaceae*. En el siguiente trabajo se han estudiado dos especies: *Annona montana* y *Annona cherimola* (variedad Fino de Jete y Alborán). Las extracciones se llevaron a cabo mediante un proceso de extracción mejorada con fluidos supercríticos, usando CO₂ y un 50% de etanol o acetona como codisolvente. Para evaluar el comportamiento de las especies frente a los dos sistemas de extracción empleados, se analizó el rendimiento de extracción, así como la capacidad antioxidante y antimicrobiana. Las mejores condiciones se obtuvieron con hojas de chirimoyo Alborán utilizando etanol: CO₂ (50:50 (v/v)) a una presión de 100 bar y una temperatura de 80 °C, durante 2 horas. La capacidad antioxidante de este extracto fue elevada y los ensayos antimicrobianos frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mostraron actividad bacteriostática.

Posteriormente, se utilizó dicho extracto etanólico para la impregnación de telas de poliéster usando dióxido de carbono supercrítico. Se evaluaron diferentes condiciones de operación como la masa de extracto (8000 y 16000 µg) y el volumen de etanol (5 y 10 mL). La matriz, una vez impregnada, se analizó en función de su carga impregnada y actividad antioxidante. La mejor condición de impregnación se obtuvo utilizando 10 mL de etanol con 16000 µg de masa y operando a 400 bar de presión y 60 °C. Las telas resultantes de dicho experimento se emplearon para realizar ensayos antimicrobianos, con las mismas bacterias usadas para la caracterización del extracto, siendo los resultados satisfactorios.

Además, las telas obtenidas a la mejor condición de impregnación se analizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) para comprobar el efecto de impregnación sobre la matriz y analizar que las extremas condiciones empleadas en el proceso no dañaban la estructura de la matriz.

2. Abstract

Annonaceae's family fruits have high organoleptic, digestive and nutritive qualities. It is also known that all parts of the tree, including leaves, are appreciated for their medicinal properties, though continue unexploited. These agroindustrial wastes stand out by their antioxidant, antimicrobial and anticancer properties, so they can be used in the manufacture of different products in the field of cosmetics, pharmacy and food.

In particular, this final project focuses on obtaining natural extracts with high antioxidant and antimicrobial power from the commercialization's waste of the fruits of cherimoya and *Annona montana*, as well as their subsequent impregnation in polyester fabric for the creation of intelligent fabrics.

Firstly, several extractions are made from tree leaves of *Annonaceae*'s family. In the following work the species were studied: *Annona montana* and *Annona cherimola* ("Fido de Jete" and "Alborán" variety). The extractions were an improved extraction process with supercritical fluids, using CO₂ and 50% of ethanol or acetone. To evaluate the conduct of the compared species to the two extraction systems used, extracts were characterized according to their operating performance, antioxidant power and antimicrobial capacity. The best operating condition was obtained with Alboran cherimoya leaves using ethanol: CO₂ (50:50) at 100 bar pressure and 80°C during 2 hours process. Its antioxidant capacity was high and the antimicrobial tests against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* showed bacteriostatic activity.

Later, this ethanolic extract was used for the impregnation of polyester fabrics using supercritical carbon dioxide. Different operating conditions such as extract mass (8000 and 16000 µg) and ethanol (5 and 10 mL) volume were evaluated. The matrix, once impregnated, was analyzed according to its impregnated charge and antioxidant activity. The best impregnation condition was obtained by using 10 ml of ethanol with 16000 µg of mass at 400 bars pressure and 60 °C. The fabrics resulting from this experiment were used in antimicrobial tests, with the same bacteria used for the characterization of the extract. It had satisfactory results.

In addition, the fabrics obtained from the best impregnation condition were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) to check the effect of the impregnation on the matrix and analyze if the extreme conditions employed in the process didn't damage the structure of the matrix.

3. *Introducción*

3.1. Utilidad de los compuestos naturales

Los productos naturales comprenden una gran familia de compuestos de amplia variedad estructural e importante potencial como compuestos bioactivos, por lo que, desde mitad del siglo XIX, han sido empleados en casi todos los campos industriales, destacando su uso en cosmética y como fuente de fármacos. Según Newman y Cragg, de los 1355 nuevos fármacos que fueron aprobados entre 1981 y 2010, un 4% son productos naturales (PN), un 22% derivan de PN y poseen alguna modificación semi-sintética, un 11% son PN de síntesis química y finalmente, un 9% son modelados a partir de PN [1].

De hecho, las plantas poseen un alto contenido en compuestos naturales bioactivos, por lo que son consideradas la principal fuente de obtención de los mismos. Alrededor del 25% de los fármacos prescritos en el mundo provienen de plantas. De los 252 medicamentos considerados básicos y esenciales por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 11% son exclusivamente de origen vegetal y un número significativo de drogas sintéticas están obtenidas a partir de precursores naturales [2]. Además, existe una gran variedad de especies vegetales presentes en todo el planeta, por lo que es posible encontrar multitud de estructuras moleculares bioactivas.

La estrategia clásica de aislamiento de productos naturales a partir de plantas consiste en obtener la planta seca, molerla y extraer los compuestos con el uso de disolventes, seguido de la concentración del extracto, separación y purificación de los compuestos presentes en él. Dichos extractos y fracciones resultantes se van sometiendo a bioensayos para analizar la bioactividad de los compuestos naturales obtenidos [2].

Existen multitud de técnicas de extracción de compuestos naturales, las cuales se pueden clasificar como técnicas de extracción convencional o nuevas técnicas de extracción. Dentro del primer grupo se encuentran la extracción por maceración, la extracción convencional líquido-líquido con embudo de decantación o la extracción sólido-líquido con soxhlet, mientras que, en el segundo grupo, se encontrarían, entre otras, algunas como la extracción asistida por ultrasonidos o la extracción con fluidos supercríticos.

Muchos tipos de bioactividad han sido evaluados en productos naturales tales como actividad antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, antiinflamatoria, etc. [3, 4]. Se estima que el 60% de los fármacos antitumorales y anti-infecciosos que ya están en el mercado o en ensayos clínicos son de origen natural [2]. Así, por ejemplo, la actividad antioxidante detectada en diversas familias de compuestos es la responsable de que estos sean capaces de actuar sobre radicales libres impidiendo que se oxiden y

degraden componentes celulares, lo cuales terminan causando envejecimiento celular y una pérdida progresiva de su funcionalidad [4, 5].

Por otra parte, los productos naturales de extractos vegetales también son reconocidos por poder combatir infecciones por parásitos como bacterias, hongos, etc. que por diversas rutas son capaces de causar graves enfermedades o destruir multitud de productos agroalimentarios [4, 6, 7].

En los últimos años, se ha venido trabajando en la impregnación de compuestos naturales con propiedades antioxidantes [8] y bactericidas en plásticos con el objetivo de generar envases inteligentes para la preservación de alimentos [9].

De igual modo, se ha trabajado en impregnar matrices para su aplicación en medicina, es decir, se ha estudiado la impregnación de antibióticos y compuestos antiinflamatorios en lentes intraoculares para obtener un sistema controlado de liberación de fármacos [10].

3.2. Familia Annonaceae

La familia *Annonaceae* está formada por alrededor de 2.500 especies agrupadas entre 130 y 140 géneros. Está constituida por árboles y arbustos distribuidos por regiones tropicales y subtropicales [11, 12]. Sin embargo, su cultivo ha sido introducido, recientemente, en regiones del sur de España, especialmente en la provincia de Málaga.

El cultivo de árboles de la familia *Annonaceae* se caracteriza por el interés económico de sus frutos, sin embargo, su investigación ha sido intensificada gracias al descubrimiento del gran potencial que poseen los productos naturales que contienen.

Una gran variedad de sustancias bioactivas, de diversa naturaleza química, han sido detectadas en sus hojas, raíces, frutas y semillas, resultando interesante la revalorización de los sub-productos agrícolas. Entre estos compuestos se encuentran, entre otros, alcaloides, terpenoides, flavonoides, aceites y en especial, acetogeninas [11]. En la tabla 3.1 quedan recogidas algunas de las actividades biológicas más detectadas que han sido encontradas en extractos de *Annonaceae*, especialmente en extractos de *Annona cherimola* [11, 13], aunque también en otros obtenidos a partir de *A. cornifolia* [14], *A. muricata* [15], *A. squamosa* y *A. glabra* [12, 16].

Tabla 3. 1. Actividades biológicas encontradas en extractos de *Annonaceas*.

Actividad	Referencia
Citotóxica	[11], [13]
Antiinflamatoria	[13], [15]
Antitumoral	[12], [13], [15], [16]
Antioxidante	[14], [16]
Antibacteriana	[11]
Insecticida	[12], [16]
Antiparasitaria	[11], [16]

Gran cantidad de las actividades biológicas detectadas en los extractos de árboles de la familia *Annonacea* se atribuyen a las acetogeninas, que son policétidos que actúan como metabolitos secundarios y que se caracterizan por presentar una larga cadena carbonada con algunos grupos funcionales oxigenados, siendo su polaridad relativamente baja [12].

Como se puede observar los extractos obtenidos de las plantas de *Annonaceae* exhiben una amplia gama de actividades biológicas. Sin embargo, sus estructuras y efectos pueden cambiar con la temperatura y naturaleza del disolvente de extracción; además, sus rendimientos de extracción son generalmente bajos [17, 18]. Estos inconvenientes del proceso de extracción se pueden mejorar utilizando técnicas de extracción a alta presión, que en el caso de esta familia de compuestos ha sido muy poco estudiada.

3.3. Tratamiento de extractos naturales empleando técnicas de alta presión

El uso de técnicas de extracción e impregnación a alta presión conlleva una serie de ventajas respecto a los métodos tradicionales. Entre ellas se encuentra el ser considerada una técnica sostenible, ya que hace uso de disolventes no tóxicos, como el agua o el dióxido de carbono, o de baja toxicidad, como la acetona y el etanol, en proporciones menores a las empleadas en las técnicas de extracción tradicional.

3.3.1. Fluidos supercríticos

El diagrama típico de presión-temperatura de una sustancia pura muestra tres regiones diferenciadas. Estas se corresponden con los tres estados de agregación de la materia, es decir, sólido, líquido y gaseoso. Sin embargo, en dicho diagrama también queda reflejado un punto denominado punto

crítico, el cual representa las condiciones de presión y temperatura a las que dejan de existir las fases líquida y gaseosa para dar lugar a una región distinta, la región de los fluidos supercríticos (Figura 3.1).

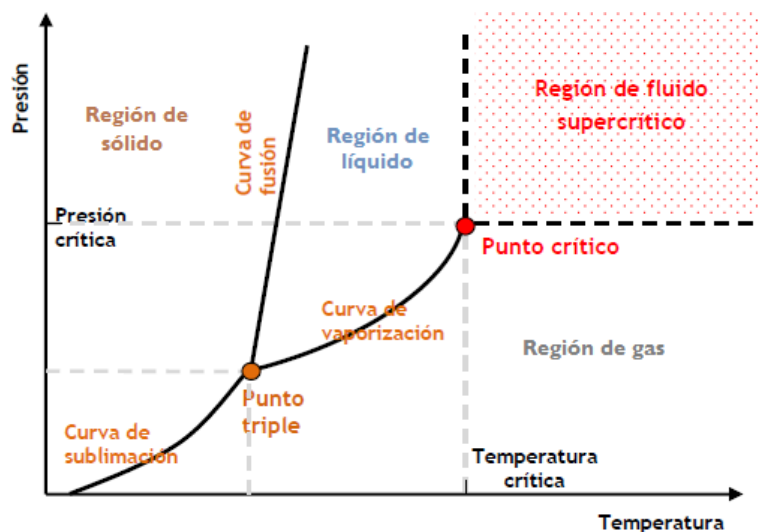


Figura 3. 1. Diagrama de fases sólido/líquido/gaseoso/fluido supercrítico.

En definitiva, un fluido supercrítico (FSC) es una sustancia o mezcla de sustancias cuyas condiciones de presión y temperatura son superiores a su punto crítico. Los FSC muestran propiedades físico-químicas poco comunes e intermedias entre los líquidos y los gases, que son responsables de su efectividad como disolvente. Estas son: alta densidad y difusividad así como baja viscosidad. Dichas propiedades les otorga a los FSC un elevado poder de penetración dentro de la matriz del soluto [19].

Pequeñas variaciones de presión y temperatura, próximas al punto crítico, permiten modificar las propiedades de los FSC y, por tanto, su selectividad y capacidad para disolver sustancias [20].

3.3.2. Extracción mediante fluidos supercríticos

La extracción con FSC es una operación de transferencia de materia llevada a cabo en condiciones de presión y temperatura superiores al punto crítico del disolvente.

La principal ventaja de esta técnica es que permite la utilización de moderadas temperaturas de trabajo, siendo posible la extracción de productos naturales de carácter termolábil. Además, permite el uso de una gran variedad de disolventes, lo que favorece la posibilidad de modificar el rango de polaridades y tamaño molecular con el que trabajar. A su vez, el uso de FSC se ve potenciado por su gran capacidad de penetración en sólidos.

Dentro de los FSC, el CO_2 es el disolvente más empleado. Esto radica en sus numerosas ventajas, es decir, bajo coste, fácil disponibilidad, baja toxicidad, inflamabilidad y corrosividad [21]. Además de

éstas, se encuentra su estado gaseoso en condiciones atmosféricas, lo que permite su fácil separación del producto sin dejar residuos en él [22]. Asimismo, sus condiciones críticas son fácilmente alcanzables, siendo su temperatura, presión y densidad crítica de 31°C, 73,86 bar y 467,6 kg/m³ respectivamente [20].

Sin embargo, la principal limitación que posee el CO₂ como disolvente para la extracción con FSC reside en su baja polaridad, es decir, es inadecuado para extraer compuestos polares. Pues, el factor clave para que una extracción se vea favorecida es que el disolvente sea de polaridad similar al compuesto. Por este motivo, a la hora de usar el CO₂ en extracción de analitos polares se hace uso de modificadores o co-disolventes, los cuales permiten variar su polaridad.

3.3.3. Extracción mejorada

La extracción mejorada utiliza como sistema disolvente una mezcla líquida que consiste en una gran proporción de un disolvente líquido combinado con un solvente de alta fluidez o baja viscosidad, como el CO₂. Al utilizar altas concentraciones de disolventes líquidos el punto crítico de la mezcla es muy superior al del CO₂ y resulta necesario trabajar en condiciones subcríticas.

Las mezclas líquidas a alta presión son interesantes para los procesos de extracción porque al combinar el CO₂ con altas concentraciones de disolventes, como agua o mezclas hidro-alcohólicas, se incrementa la polaridad del sistema disolvente al tiempo que se mantienen las ventajas del CO₂ respecto a su difusividad. La presencia del CO₂, aún en pequeñas cantidades, mejora la cinética de desorción de los solutos, minimiza el uso de disolventes líquidos y de posteriores etapas de evaporación del solvente, y también limita la presencia de oxígeno en la celda de extracción, evitando la oxidación de compuestos.

La extracción con mezclas líquidas tiene el propósito de mejorar la recuperación de solutos de media a alta polaridad, en función del tipo de disolvente seleccionado. Estos compuestos tienen una escasa solubilidad en el CO₂ puro. La cantidad y el tipo de disolvente a añadir dependen de la composición de la matriz y de la polaridad de los compuestos a extraer.

Este tipo de extracción supone una ventaja frente a la extracción convencional ya que contribuye a minimizar el consumo de disolventes líquidos y reduce el esfuerzo de evaporar el solvente en las etapas posteriores de concentración.

Además, al poderse aumentar la temperatura, es posible mejorar la solubilidad, aumentar la velocidad de difusión, disminuir la viscosidad y la tensión superficial de los disolventes. Se favorece la rotura de las fuertes interacciones soluto-matriz, permitiendo una mayor penetración del disolvente en la matriz [23].

De igual modo, al usar alta presión, se favorece el proceso de extracción ya que se fuerza al disolvente a penetrar en zonas de la matriz que contienen compuestos de interés y que, en condiciones normales (de presión atmosférica), no entrarían en contacto debido a la presencia de burbujas de aire que sellan los poros de dicha matriz [23].

3.3.4. Impregnación mediante fluidos supercríticos

La posibilidad de crear envases inteligentes y funcionales con propiedades antibacterianas y antioxidantes para la conservación de alimentos de gama IV (frutas y verduras frescas, limpias, peladas y troceadas envasadas para el consumo con la menor manipulación posible), así como la obtención de materiales con propiedades medicinales adquiridas, ha llevado al desarrollo de numerosos trabajos enfocados en la impregnación de compuestos con técnicas que impliquen baja toxicidad.

Un ejemplo de impregnación en el campo farmacológico es el desarrollado por el profesor De Souza en los últimos años, el cual se basa en el estudio de la impregnación de policaprolactonas [24] y una serie de derivados de quitosano [25] sobre lentes de contacto con el objetivo de desarrollar sistemas de liberación controlada capaces de tratar el glaucoma.

Se denomina impregnación a la introducción de compuestos sobre matrices. Los métodos tradicionales de impregnación se basan en sumergir la matriz en el disolvente que contiene los compuestos de interés. Estas técnicas conllevan una serie de inconvenientes tales como el uso de disolventes orgánicos a veces tóxicos, tiempos de operación largos, baja especificidad y bajos rendimientos [26]. Por esta razón, se han desarrollado otras metodologías de impregnación más eficientes basadas en uso de FSC.

Las ventajas de la técnica de impregnación con FSC son [27]: desarrollo del proceso de impregnación a temperaturas relativamente bajas para que no haya degradación de compuestos, control de las principales variables de impregnación, modulando de éste modo los compuestos a impregnar y sobre qué matriz y finalmente, no generación de daños o alteraciones sobre las propiedades físicas, químicas o mecánicas de la matriz en uso.

Es preciso comentar que el proceso de impregnación con FSC es muy complejo, ya que en él intervienen gran cantidad de variables y algunas, posiblemente, aún por estudiar. Entre las condiciones a tener en cuenta están las variables de operación establecidas (temperatura, presión, tiempo de impregnación, etc.), el disolvente en el que se encuentran disueltos los compuestos, los propios compuestos presentes en el extracto, así como su concentración, la despresurización del reactor y, sobre todo, la matriz sobre la que se realiza la impregnación [28].

El CO₂ supercrítico es de los más usado en el desarrollo de impregnaciones con FSC. Sin embargo, los compuestos a impregnar se encuentran disueltos en otro tipo de disolvente, por lo que, para que se desarrolle la impregnación, el CO₂ ha de entrar en contacto con este, generándose de éste modo una variación en la fase fluida. Dos equilibrios tienen lugar durante el proceso de impregnación. Primero, ocurre un equilibrio entre el CO₂ y el disolvente del extracto, permitiendo que los compuestos de éste pasen a solubilizarse en el CO₂, y segundo, tiene lugar un equilibrio entre los compuestos disueltos en el CO₂ y las telas en las que se depositarán [29]. El CO₂ tiene función de intermediario.

Como consecuencia de los equilibrios que tienen lugar durante el proceso de impregnación es posible que no todos los compuestos se comporten de igual modo y que, algunas de las condiciones usadas en el proceso, sean favorables para algunos de ellos, pero perjudiciales para otros. Por este motivo, es preciso encontrar las condiciones de operación más adecuadas que permitan un consenso entre ambos equilibrios y así obtener una impregnación satisfactoria.

Los rangos de presión y temperatura del proceso varían en función del tipo de compuestos a impregnar [29]. En el caso de impregnación de colorantes se han obtenido datos de que la carga impregnada aumenta conforme lo hace la presión y la temperatura. Respecto al tiempo de operación, los valores van desde varios minutos hasta varias horas, sin embargo, se ha demostrado que 1h es un tiempo adecuado para obtener buenos resultados [30].

Finalmente, la velocidad de despresurización es un parámetro operativo a tener en cuenta, ya que una despresurización rápida puede conllevar un aumento de la carga de extracto impregnada sobre la matriz, pero a su vez, puede originar un daño mecánico sobre el material, mientras que, por el contrario, una despresurización lenta puede causar una pérdida excesiva de soluto, aunque preservando la integridad de la matriz. En impregnación sobre telas de poliéster y plásticos PET/PP se han obtenido mejores resultados empleando una despresurización rápida del reactor [9, 30].

4. Objetivos

Este proyecto se ha desarrollado dentro del grupo de investigación “Análisis y Diseño de Procesos con Fluidos Supercríticos”, del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos.

El propósito a largo alcance del proyecto es el de obtener telas “inteligentes” que presenten nuevas propiedades adquiridas de interés y que le aporten funcionalidad, mediante el uso de compuestos naturales respetuosos con el medio ambiente y la salud humana.

El objetivo global de este proyecto es el estudio del proceso de extracción de compuestos bioactivos, procedentes de las hojas de árboles de la familia *Annonaceae*, así como el estudio del proceso de impregnación del extracto con mejor capacidad antioxidante y/o antimicrobiana sobre telas de poliéster.

Para el desarrollo de dicho objetivo global, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Estudio de la influencia del co-disolvente en el proceso de extracción de compuestos presentes en las hojas de *Annona montana* y *Annona cherimola* respecto al rendimiento y la actividad antioxidante de los mismos.
- Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto de mejores condiciones.
- Estudio de la influencia de variables en el proceso de impregnación de telas de poliéster (cantidad inicial de extracto y volumen de disolvente).
- Caracterización de la tela impregnada en cuanto a la carga de compuestos y su actividad antioxidante.
- Puesta a punto de la técnica de evaluación de la capacidad antimicrobiana de las telas de poliéster impregnadas.
- Evaluación de los cambios sufridos en la tela mediante microscopía electrónica de barrido.

5. Solución técnica

En este capítulo se explica todo lo relacionado con los materiales y métodos empleados en el desarrollo del proyecto, así como la discusión de los resultados que se han obtenido.

5.1. Material y métodos

5.1.1. Materias primas

Para la obtención de extractos naturales se han utilizado las hojas de árboles de la familia de las *Annonaceae*: *Annona montana* y *Annona cherimola*. De esta última se han escogido dos variedades españolas distintas, la Fino de Jete y la Alborán (Figura 5.1). Todas ellas han sido suministradas por la Finca Experimental “La Mayora”, Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Málaga, en noviembre de 2016.

El pretratamiento de las muestras consistió en secar las hojas en un horno a 40°C hasta que su peso se mantuviese constante. Una vez secas se daba paso bien a su almacenamiento directo a temperatura ambiente y protegido de la luz, o a su triturado y posterior almacenamiento en las mismas condiciones. En cualquiera de los dos casos, es importante tener presente que, antes del proceso de extracción, era necesaria la trituración de las hojas, con una batidora de vaso (Bosch Mmb2000 de 200w), para reducir el tamaño de partícula y que se facilitase así la extracción.

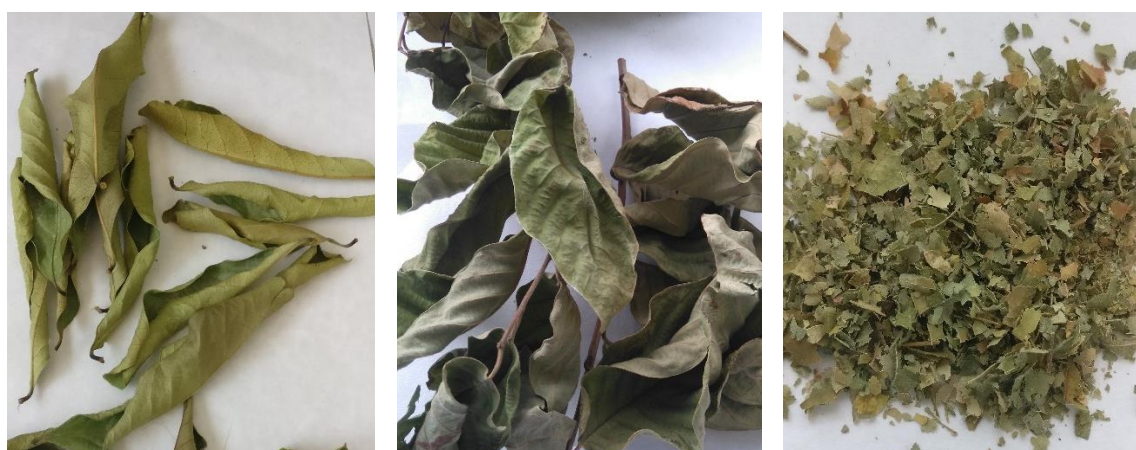


Figura 5. 1. Hojas secas, sin triturar o trituradas, de *Annona Montana*, chirimoyo Alborán y chirimoyo Fino de Jete consecutivamente.

Para realizar el proceso de impregnación se seleccionaron telas de poliéster como polímero. Esto se debe a que es un material fácil de conseguir y manipular, es resistente, duradero y ha sido empleado, usualmente, para la impregnación de tintes, por lo que podría favorecer la impregnación de sustancias activas.

Las telas se cortaron de forma redondeada (diámetro en torno a 2.5cm) y de manera que todas tuviesen aproximadamente la misma masa, es decir, entre 60 y 70 mg. Esto se hizo así para poder aprovechar al máximo el espacio disponible en el reactor. En el proceso de impregnación se emplearon 4 telas, las cuales se dispusieron en paralelo y de tal modo que no se tocasen entre sí, ni con el extracto (Figura 5.2). Para poder distinguir las telas y reconocer el orden que habían adoptado en el reactor (de mayor a menor proximidad a la zona en la que se encontraba el extracto), las telas se marcaron con diferentes cortes de la siguiente forma: la más próxima al extracto ausente de marca, la siguiente con un corte triangular, la siguiente con un solo corte, y finalmente, la más lejana al extracto, con dos cortes (Figura 5.3).



Figura 5. 2. Disposición de las telas sobre el reactor.



Figura 5. 3. Telas empleadas en el proceso de Impregnación junto a las marcas realizadas sobre ellas.

5.1.2. Otros materiales

- Dióxido de Carbono (CO_2): de la casa comercial Linde, pureza del 99.95%, empleado en los procesos de extracción e impregnación con fluidos supercríticos.
- Acetato de etilo ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$): de la casa Panreac, pureza del 99.9%, utilizado en el ensayo de capacidad antioxidante de extractos en acetona.
- Acetona ($\text{CH}_3\text{CHOCH}_3$): de la casa Panreac, pureza del 99.9%. utilizada como co-disolvente en extracciones.

- Agua destilada: utilizada en ensayos de actividad antimicrobiana.
- Etanol (C₂H₅OH): de la casa Panreac, Pureza del 99.9%, utilizado como co-disolvente en extracciones, ensayo de capacidad antioxidante y limpieza de algunos equipos.
- Dimetilsulfóxido (DMSO; C₂H₆OS): de la casa Panreac, pureza del 99%, M_w=78.13gmol⁻¹, empleado en el ensayo de actividad antimicrobiana.
- 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH): de la casa Sigma-Aldrich, M_w=394.32gmol⁻¹, empleado en los ensayos de capacidad antioxidante.
- Cloruro de sodio (NaCl): de la casa Panreac, pureza del 99.5%, usado en los ensayos de capacidad antimicrobiana.
- Triptona: de la casa Panreac, pureza del 100%, empleado en los en los ensayos de capacidad antimicrobiana.
- Extracto de levadura: de la casa Merck, para los ensayos de capacidad antimicrobiana.
- Medio LB agar Lennox: de laboratorios Conda, para los en los ensayos de capacidad antimicrobiana.
- Acetona industrial de la casa PQS, para la limpieza de equipos y material.
- *Escherichia coli* (CECT101) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), usadas para los ensayos antimicrobianos.

5.1.3. Equipos

- Equipos de alta presión y sus componentes

Los experimentos de extracción e impregnación con fluidos supercríticos han sido realizados en el mismo equipo de alta presión. Este pertenece a Thar Technology (Figura 5.4); Los componentes de la planta de extracción/impregnación son los siguientes:



Figura 5. 4. Equipo de alta presión utilizado en los experimentos.

- Extractor/ Reactor. Se empleó un recipiente cilíndrico de acero inoxidable de 100 ml de capacidad. Este cumplía la función de extractor o reactor en función del tipo de proceso que se llevase a cabo en él. Presenta un sistema de cierre hermético, gracias a una junta de sellado, que le permite mantener la presión de trabajo. Para verificar la presión del interior, dispone de un manómetro, y para controlar la temperatura del proceso, dispone de una camisa calefactora y dos termopares. Uno de ellos, mide la temperatura del interior del reactor y el otro, la temperatura externa en la camisa calefactora. Finalmente, para impedir que se diese un arrastre de la muestra o la salida de residuos, en las zonas de entrada y salida de muestra, el equipo presentaba un filtro de 2 μm .
- Bombas de alta presión. En el proceso de extracción se emplearon dos bombas, una para el CO_2 , y otra responsable de impulsar el co-disolvente. Para el proceso de impregnación, en cambio, tan solo se precisa de la bomba de CO_2 . Esta bomba consigue que se bombee CO_2 desde la botella al reactor, pero para que este proceso tenga lugar, es preciso que el CO_2 se encuentre en estado líquido, por lo que se requiere de la presencia de un criotermostato que disminuya la temperatura por debajo de 5°C . Una vez enfriado, pasa por un caudalímetro másico hasta llegar a la bomba. Tras ello, el CO_2 se precalienta en un intercambiador de alta presión antes de llegar al reactor. Respecto a la bomba de co-disolvente requerida para la extracción, decir que trabaja de la misma manera que la anterior, pero sin la necesidad de que haya un enfriado previo del disolvente, pues éste ya se encuentra en estado líquido.
- Válvula automatizada de regulación de presión (BPR). Válvula automática y termostatizada situada tras el extractor/reactor. Posee sensores de temperatura y presión para regular ambas variables durante la operación, además de ser capaz de evitar la congelación debido a la despresurización del CO_2 . Es aquí donde el fluido disminuye su presión por debajo de la crítica.
- Separador ciclónico. Recipiente de acero inoxidable de 500 ml usado en el proceso de extracción. Es el encargado de coleccionar el extracto obtenido y permitir el paso de éste hacia una botella ámbar en la que, al finalizar el proceso, se almacena.
- Válvulas y tuberías. Todo el sistema se encuentra conectado por una serie de tuberías de acero inoxidable (de 1/8 de pulgada) y de diferentes tipos de válvulas.
- Software. El software Process Suite (Thar Technology, Pittsburg, PA (USA)) permite controlar de manera automatizada las principales variables del proceso, es decir, presión, temperatura y caudales de CO_2 y co-disolvente.

Esquema de la planta descrita para operar con fluidos supercríticos (Figura 5.5.).

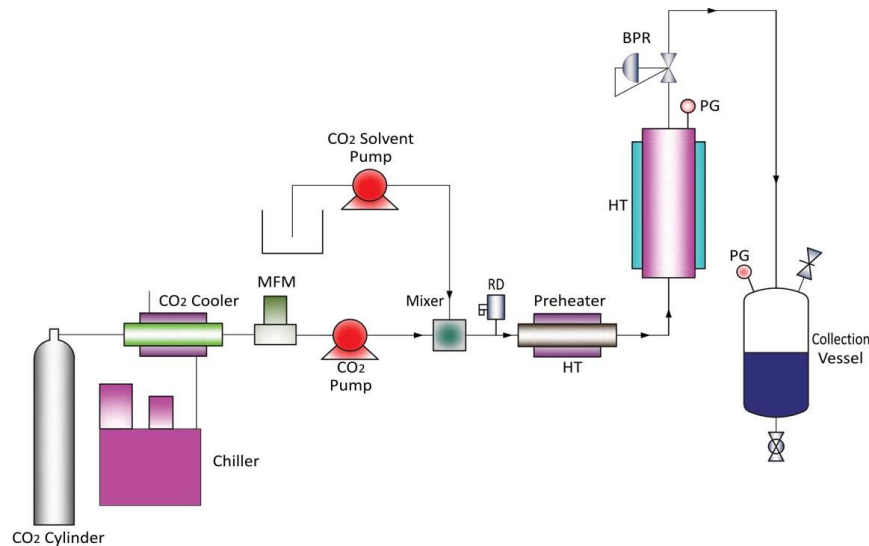


Figura 5. 5. Diagrama del equipo.

- Cabina de seguridad biológica A-100. De Burlidona. Usada para mantener la esterilidad en los ensayos de actividad antimicrobiana.
- Baño ultrasónicos Mod.514. De SELECTA. Necesario para la homogenización de extractos y disoluciones (DPPH, patrones Mcfarland, etc).
- Espectrofotómetro UVmini-1240. De Shimadzu Scientific Instruments. Empleado en los ensayos de actividad antioxidante y antimicrobiana.
- Balanza serie STB-8K. Empleado para pesar los componentes del medio de cultivo en ensayos de actividad antimicrobiana.
- Balanza de precisión Mettler Toledo AG135. Balanza empleada para ensayos que precisan de exactitud y cuando las cantidades a pesar son inferiores a 1g.
- Incubadores. De Ibercex y optic ivymen system de COMECTA. En ensayos de actividad antimicrobiana.
- Autoclave. De P-selecta. Empleado en ensayos de actividad antimicrobiana.
- Evaporador rotativo Laborota 4000-efficient. De Heidolph Instruments. Usado en la concentración de extractos, análisis de rendimiento de extracción, capacidad antioxidante y antimicrobiana.
- Cámara frigorífica. Usada en la conservación de extractos.
- Batidora de vaso Bosch Mmb200. Equipo de 600w y 1,75 L de capacidad usada en la molienda de la materia prima para las extracciones.

5.1.4. Procesos de extracción

Para comenzar el proceso de extracción el primer paso es encender el criotermostato, ya que la extracción no puede comenzar hasta que la temperatura no sea inferior a 5°C. A continuación, se toman entre 20 y 30 g de materia prima seca y triturada (hojas de *Annona montana* o *Annona cherimola*, variedad Fino de Jete o Alborán), se introducen en el extractor, se cierra, y se conectan las tuberías. Tras ello, se conectan los termopares y se enciende la manta calefactora, además de encenderse la BPR para regular la presión máxima que puede alcanzar el extractor. Como la extracción se realiza en continuo, la presión de la BPR debe ser igual a la presión de trabajo.

Una vez se han estabilizado las temperaturas y el criotermostato está a una temperatura adecuada, se abre la botella de CO₂ y se ponen a funcionar las bombas (también la de co-disolvente) a un caudal determinado. En el caso de la bomba de co-disolvente, también se observa y controla el caudal másico de manera indirecta, es decir, poniendo la botella que contiene el co-disolvente sobre una balanza y midiendo el peso a cada minuto. Esto se lleva a cabo para evitar posibles errores de calibrado de la bomba.

Cuando el extractor alcanza la presión de trabajo determinada, la BPR comienza a abrirse de forma automática para poder mantener la presión constante e igual a la presión de trabajo y que la extracción tenga lugar en continuo.

Trascurrido el tiempo de extracción (2h), se paran ambas bombas, se apagan las temperaturas, se cierra la botella de CO₂ y se da comienzo al proceso de despresurización. Esto se consigue disminuyendo gradualmente la presión del sistema, haciendo que la BPR se vaya abriendo, hasta que finalmente, se encuentra completamente abierta y con cero bar de presión en el extractor.

El extracto, que sale del extractor por la BPR, llega al separador ciclónico, donde, debido al cambio de presión, el CO₂ vuelve a estado gaseoso y se separa de los compuestos de interés. El extracto se recoge y se almacena en botellas de vidrio ámbar a -18°C y preservado de la luz.

Una vez recogido el extracto, se cambia el recipiente colector, se desconecta el extractor y se pone el sistema de cables para el lavado de la planta. Se bombea acetona para que arrastre toda la suciedad que pueda quedar en los conductos y se limpia el extractor. Una vez limpio, se puede pasar a bombear el disolvente con el que se vaya a realizar la próxima extracción.

5.1.4.1. Condiciones de operación

El presente proyecto pretende estudiar la influencia de la naturaleza del co-disolvente empleado en la extracción, así como la variedad de *Annona* (materia prima) sobre la que se lleva a cabo dicho

proceso. Para ello, se mantuvieron constantes una serie de parámetros, los cuales se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5. 1. Variables de extracción

Parámetros variables		Parámetros constantes
Variedad de materia prima	Disolvente	
<i>Annona montana</i>	Etanol	Temperatura: 80 °C
	Acetona	Presión: 100 bar
<i>Annona cherimola</i> variedad Fino de Jete	Etanol	Tiempo de extracción: 2 horas
	Acetona	Caudales de las bombas (CO ₂ : co-disolvente): 1:1 v/v a 5 g/min
<i>Annona cherimola</i> variedad Alborán	Etanol	Masa inicial de materia prima: 20-30g
	Acetona	

5.1.4.2. Caracterización de los extractos obtenidos

La caracterización de los extractos obtenidos es muy importante, ya que permitirá seleccionar qué extracto es el más adecuado para seguir con la investigación. Esta caracterización se llevará a cabo teniendo en cuenta los rendimientos de extracción, así como la actividad antioxidante y/o actividad antimicrobiana.

5.1.4.2.1. Rendimiento de extracción

El rendimiento de extracción establece la cantidad de extracto seco obtenido en función de la cantidad de materia prima inicial (hojas de plantas de la familia *Annonaceae*) colocada en el extractor. Para su determinación, se toma un cierto volumen (vol.) de extracto recogido y se añade a un tarro previamente tarado. Luego, dicho extracto se pone a secar en el rotavapor y se pesa. Gracias a la diferencia de pesos entre ellos, se consigue determinar la cantidad de extracto seco existente en el volumen empleado. Este proceso se realiza por duplicado. Finalmente, teniendo en cuenta el volumen total de extracto recogido tras el proceso de extracción, la cantidad de materia prima seca introducida en el reactor y la cantidad de extracto seco que se puede obtener de un cierto volumen de extracto, se puede calcular el rendimiento de extracción por la siguiente ecuación (Ecuación 5.1).

$$\% \text{ Extracción} = \text{Vol. total de extracto} * \frac{\text{masa de extracto seco}}{\text{Vol. de extracto evaporado} * \text{masa de materia prima}} * 100 \quad [5.1]$$

5.1.4.2.2. Actividad antioxidante

Para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos, se usó el método descrito por Brand-Williams y Scherer y Godoy [31, 32]. Este ensayo consiste en la reacción de los compuestos activos del extracto con un radical libre estable, el 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). La reducción de la molécula de DPPH se mide mediante el descenso de la absorbancia a 515 nm. Esto se debe a que, a dicha longitud de onda, el DPPH absorbe sólo si se encuentra en su forma de radical y no en su forma reducida (Figura 5.6).

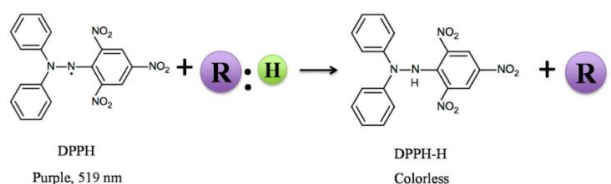


Figura 5. 6. Reacción del DPPH con un compuesto antioxidante [33].

Para la determinación de la actividad antioxidante, el primer paso a realizar es la preparación de la disolución de DPPH y la curva de calibrado. En este proyecto son necesarias la preparación de dos curvas de calibrado, una empleando una disolución de DPPH en etanol, para las extracciones que poseen como co-disolvente etanol y otra, empleando una disolución de DPPH en acetato de etilo, para las extracciones realizadas con acetona. Para ello, primero se prepara una disolución madre $8 \cdot 10^{-5} \text{M}$ de DPPH en el disolvente (se conserva a -4°C en oscuridad) y, posteriormente, a partir de esta disolución madre anterior, se prepara una disolución de DPPH $6 \cdot 10^{-5} \text{M}$ que se emplea para preparar una batería de diluciones que permitan desarrollar una recta de calibrado. Esta recta permite relacionar distintas absorbancias medidas a 515 nm con las diferentes concentraciones del patrón DPPH. Las rectas de calibrado (en etanol y acetato de etilo) se representan a continuación en las Figuras 5.7 y 5.8.

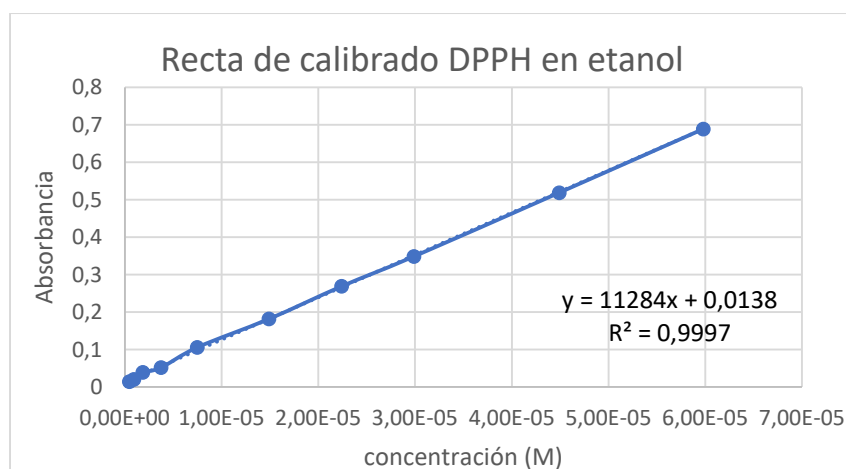


Figura 5. 7. Recta de calibrado DPPH en etanol en estado estacionario.

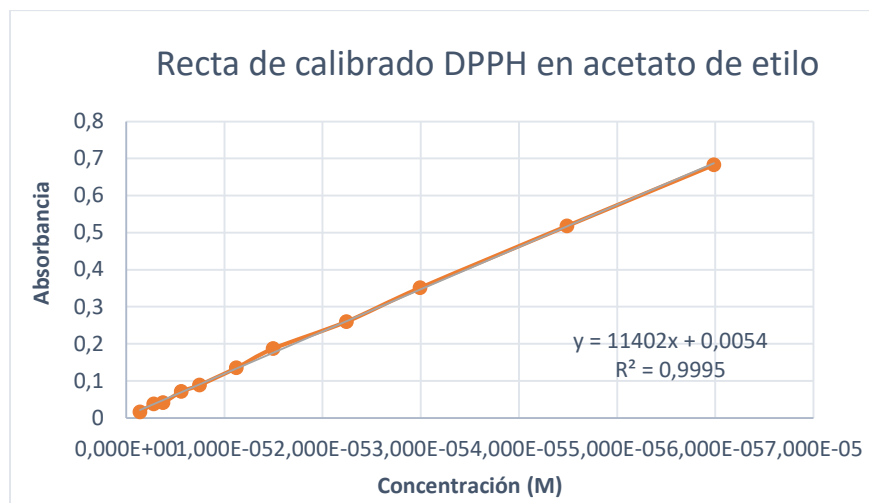


Figura 5. 8. Recta de calibrado DPPH en acetato de etilo en estado estacionario.

El ensayo de DPPH comienza por estudiar la cinética de reacción de este reactivo con varias concentraciones de un mismo extracto. Para ello, se preparan 6 cubetas de vidrio en las que se añaden cantidades constantes de DPPH ($3,9 \text{ mL } 6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ en etanol o acetato de etilo, según corresponda) y de extracto (0,1 mL) a distintas concentraciones. Se mide la absorbancia cada 2 minutos, a 515nm, en el espectrofotómetro, hasta que se alcanza el estado estacionario. En este caso, los ensayos se realizaron durante 3 horas y por triplicado, de modo que las absorbancias de DPPH remanente en el estado estacionario, de las 6 concentraciones, quedasen separadas entre sí.

Finalmente, la concentración de DPPH tras el ensayo se determina mediante las rectas de calibrado realizadas previamente. El DPPH remanente se calcula haciendo uso de la ecuación 5.2.

$$\% \text{ DPPH}_{\text{REMANENTE}} = \frac{C_{\text{DPPH } t}}{C_{\text{DPPH } 0}} * 100 \quad [5.2]$$

Donde $C_{\text{DPPH } 0}$ es la concentración de DPPH a tiempo 0 y $C_{\text{DPPH } t}$ es la concentración de DPPH en el tiempo t.

Cada una de las concentraciones de extracto da lugar a un porcentaje de DPPH remanente en estado estacionario al cabo de un determinado tiempo, por lo que, finalmente, se puede representar una gráfica de DPPH remanente vs tiempo (Figura 5.9).

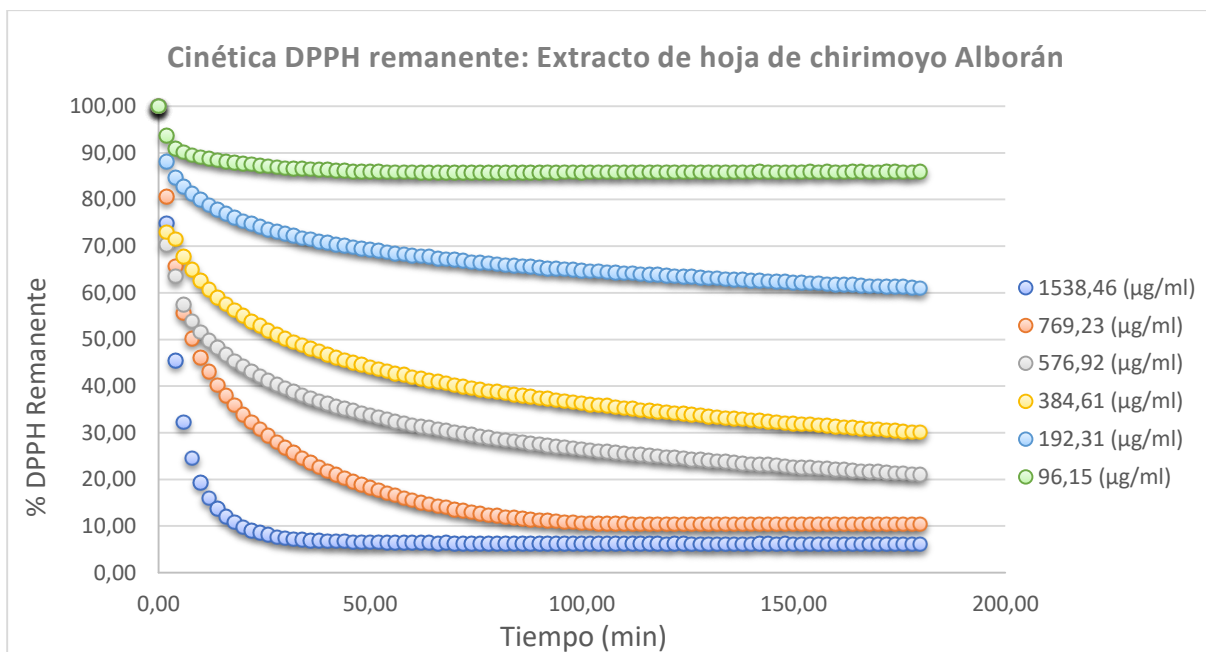


Figura 5. 9. Ejemplo de gráfico %DDPPH remanente vs tiempo (Extracto de hoja de *Annona cherimola* variedad Alborán).

Los valores de %DPPH remanente en estado estacionario también se representan frente a la concentración de extracto (Figura 5.10), permitiendo de este modo determinar el valor de EC_{50} (concentración eficiente). Dicho valor equivale a la concentración de extracto que se necesita para poder inhibir el 50% de la actividad de los radicales libres del DPPH.

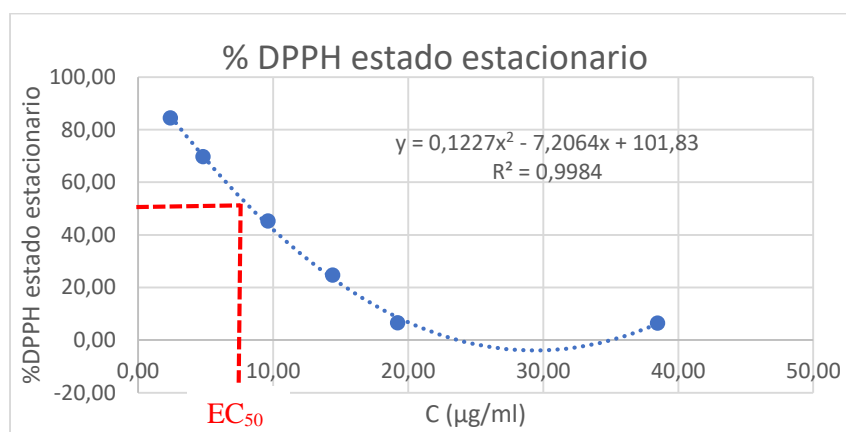


Figura 5. 10. Ejemplo de gráfico DPPH remanente en el estado estacionario vs concentración (extracto de chirimoyo alborán). Marcado en rojo el EC_{50} .

La actividad antioxidante también se puede definir por el poder antirradical o índice de actividad antioxidante (AAI), el cual se expresa según la ecuación 5.3.

$$AAI = \frac{\text{Concentración inicial de DPPH } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})}{EC_{50}(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})} \quad [5.3]$$

5.1.4.2.3. Actividad antimicrobiana

La determinación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo para aquel extracto que había resultado tener la mayor actividad antioxidante de todos los ensayados.

Para realizar el experimento, se tomó un cierto volumen del extracto elegido y se concentró en el rotavapor. Tras ello, se elaboró una batería de concentraciones de extracto disuelto en DMSO. La concentración más alta de extracto por la que se comenzó a probar fue de 50 mg/mL, de modo que la concentración fuese lo suficientemente alta como para provocar un posible efecto y sin que hubiese interferencias con la cantidad de nutrientes presentes en el medio de cultivo. El medio de cultivo empleado para el ensayo fue LB agar Lennox.

La actividad antimicrobiana se determinó mediante el uso de la técnica de cultivo en pocillo. Para ello, se coloca sobre una placa de agar que contiene microorganismos sembrados en cultivo sumergido, una determinada cantidad del extracto. Se considerará que el extracto posee actividad antimicrobiana cuando se observa un halo de inhibición alrededor del compuesto activo. La actividad se probó frente a las bacterias: *S.aureus* (Gram +) y *E.coli* (Gram -).

Para comenzar el ensayo de la actividad antimicrobiana, se prepararon tubos de vidrio pirex ® con medio de cultivo LB líquido, cuya composición aparece en la tabla 5.2.

Tabla 5. 2. Componentes del medio LB líquido.

Componentes	Cantidad
Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L

En el medio LB líquido, se sembraron las dos bacterias a ensayar y se incubaron durante 24h a 37°C con agitación. Pasadas 24h, los cultivo en fase exponencial, se ajustaron mediante espectrometría a 625 nm, hasta la misma turbidez que presenta el patrón McFarland 0.5. A esta turbidez, la concentración celular es de $1.5 \cdot 10^8$ cel/mL [34]. Tras esto, se diluyeron en medio de cultivo estéril LB agar Lennox atemperado para conseguir que la concentración celular inicial del cultivo sumergido fuese de $1.5 \cdot 10^6$ cel/mL y se plaqueó. Se dejó reposar las placas durante una media hora. Una vez solidificadas, se procedió a realizar, con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio, pocillos equidistantes de 5 mm de diámetro por 0,6 mm de profundidad. En cada pocillo se adicionó 60 µL de cada dilución del extracto a

ensayar, dejando uno para el DMSO, usado como control. Las placas se incubaron a 37 °C unas 24h. Pasado este tiempo, se observó si existía o no presencia de halo de inhibición.

En el ensayo se emplearon dos tipos de placas Petri. Unas de 150 mm de diámetro y 25 mm de altura, a las que se les añadió un volumen de 25 mL de medio y otras, de 60 mm de diámetro y 15 mm de altura, a las que se le añadió un volumen de 10 mL. En las placas más grandes se pusieron unos 5 pocillos y en las pequeñas unos 2 pocillos. El tipo de placa usada varió en función del número de concentraciones de extractos probados en cada momento.

Las concentraciones de extracto empleadas para determinar la concentración de mínima inhibición (MIC), fueron de: 50; 30; 15; 12; 10; 8; 6; 4; 3; 2,5; 1,5; 1 y 0,8 mg/mL. La MIC es el dato que permite determinar la actividad bacteriostática de un extracto, la cual se define como la capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento de un determinado microorganismo. Las diferentes concentraciones de extracto se ensayaron por duplicado y en diferentes placas.

5.1.5. Proceso de impregnación en telas de poliéster

Al igual que el proceso descrito para la extracción (5.1.4), el primer paso a llevar a cabo en una impregnación, es el de encender el criotermostato y esperar a que la temperatura descienda por debajo de 5 °C. Tras ello, hay que colocar las telas, ya pesadas y marcadas, en el orden correcto y de forma que no estén en contacto entre sí ni con el extracto, sobre un muelle (de diámetro similar al reactor) al que se le ha añadido unos pequeños soportes de alambre para mejorar la sujeción de las telas y evitar su desplazamiento con el flujo de CO₂. Se introduce una cantidad de extracto en el reactor (del extracto de mejores características antioxidantes). A continuación, se cierra el reactor y se establecen las condiciones de temperatura y presión de trabajo y se abre la botella de CO₂.

En esta ocasión y, a diferencia del proceso de extracción, se opera en discontinuo y, por ello, es preciso que la BPR durante el tiempo de impregnación, 1 hora, permanezca cerrada y estable a la presión de trabajo. Para cumplir este objetivo, la presión que se fija en la BPR es de unos 50 bar por encima de la de trabajo. Como paso previo, para que el reactor consiga llegar a la presión de trabajo, se opera por flujo a un caudal de 10g/min, y una vez llegue a la presión establecida, se cambia el modo de trabajo de la bomba para que opere a presión.

Trascurrido el tiempo de impregnación, se pone la BPR a unos 5 bar por encima de la presión de trabajo y se vuelve a operar por flujo a un caudal de 10 g/min por unos 30 minutos. Esto se lleva a cabo para que se produzca el secado de las telas y se terminen de arrastrar los compuestos.

Cuando finaliza el tiempo de secado, se cierra la botella de CO₂ y se programa rápidamente el método de despresurización. Este regula una velocidad constante y un tiempo en el que la presión del

reactor baja desde la presión de trabajo hasta 0 bar. El método de despresurización utilizado es el de despresurización rápida de unos 100 bar/min, por lo que el método tarda aproximadamente 4,5 minutos.

Tras la despresurización, se abre el reactor, se sacan las telas impregnadas, se pesan y se limpia el interior del reactor con acetona o etanol. Además, las telas serán caracterizadas posteriormente.

5.1.5.1. Condiciones de operación

En el grupo de investigación ya se había trabajado la impregnación en telas de poliéster, por lo que se mantuvieron como variables constantes aquellas que proporcionaron mejores resultados. Este es el caso del método de despresurización, el cual se había observado que era mejor (mayor carga de compuestos impregnados en las telas) a menor tiempo de despresurización. De igual modo ocurre con la presión de trabajo, a mayores presiones (400-500 bar), mejores resultados [30].

Sin embargo, son muchos más los factores que influyen en el proceso de impregnación, por lo que se decidió trabajar evaluando la influencia de otros factores que hasta el momento no habían sido investigadas por el grupo. Por este motivo, se estudió la influencia del volumen de etanol en el proceso de impregnación, es decir, si favorecía o no a la carga impregnada y, a su vez, se estudió la influencia de la masa de extracto utilizada mediante el uso de dos cantidades distintas.

Las condiciones de operación estudiadas y aquellos parámetros que se han mantenido constantes se muestran en la tabla 5.3.

Tabla 5. 3. Condiciones de operación empleados en el proceso de impregnación

Parámetros constantes	Parámetros variables	Valores
Presión: 400 bar	Volumen de etanol	5 y 10 mL
Temperatura: 60 °C	Masa de extracto	8000 y 16000 µg
Tiempo de impregnación: 1 hora		
Tiempo de secado: 30 minutos.		
Método de despresurización: rápido, sobre 5 minutos, a 100 bar/min		
Disposición de las telas: en paralelo.		

Respecto a las masas de extracto empleadas, se optó por usar la propia concentración del extracto obtenido y el doble. La razón de duplicar la concentración se debió a que se quería estudiar si un aumento de la concentración de extracto provocaba un aumento de la carga impregnada. El objetivo

de esto era que la eficiencia de las telas, frente a los ensayos de actividad antimicrobiana, fuesen mejores, es decir, se pretendía superar la concentración de mínima inhibición determinada para el extracto.

Las variables de presión y temperatura se encontraban dentro de los valores de condición crítica del CO₂ y, a pesar de que la temperatura usada era elevada, no se esperaba que fuese a haber problemas de degradación de las sustancias activas, dado que la extracción se realizó a cabo a 80 °C, y el extracto presentaba actividad.

Para analizar la influencia del etanol, así como la cantidad de extracto inicial introducida en el reactor sobre la carga, se realizó un Análisis de Varianza para comparar las medias de cada condición estudiada. Del mismo modo, se analizó la homogeneidad de carga entre las telas impregnadas. Todas las condiciones experimentales se repitieron 3 veces, para estimar el error de los resultados. Los datos se procesaron haciendo uso del programa STATGRAPHICS Plus 4.0 (1194-99, Statistical Graphics Copr.).

5.1.5.2. Caracterización de las telas impregnadas

La caracterización de las telas impregnadas es un proceso muy importante, pues será la que permita analizar si el proceso de impregnación ha sido exitoso, es decir, si se ha conseguido cumplir el objetivo de que las telas hayan adquirido nuevas propiedades y sin verse dañadas. Dicha caracterización se ha realizado en cuanto a carga impregnada y actividad antioxidante, y sólo aquella que presentaba las mejores condiciones fue analizada respecto a su capacidad antimicrobiana y SEM.

5.1.5.2.1. Carga impregnada

En un primer momento, para determinar la carga de compuestos impregnados sobre la tela de poliéster, se optó por probar dos metodologías y ver cuál de ellas resultaba ser más eficiente. Esto se planteó debido a la inseguridad de que la balanza fuese capaz de apreciar con exactitud la diferencia de pesos que presentaba la matriz antes y después de la impregnación.

El procedimiento seguido consistió en pesar todas las telas (4 por cada impregnación) antes y después del proceso. A su vez, de varias impregnaciones se tomó la tela numerada como uno, es decir, aquella que se encontraba sin marcaje aparente y cuya posición en el reactor era la más próxima al extracto, y se las sometió a la segunda metodología. Esta consistió en coger la tela impregnada e introducirla en un frasco limpio y seco. A este, se le añadió una cierta cantidad de etanol suficiente para dejar la tela cubierta y se sometió a unos 30 minutos de sonicado en el ultrasonido. Tras ello, se pasó todo el volumen de etanol, junto a todos los compuestos extraídos en él, a un matraz de evaporación de 100 mL de capacidad previamente tarado y sometido a desecación. Se evaporó todo el etanol, mediante un rotavapor, quedando sólo los compuestos de interés, aquellos extraídos de la tela impregnada.

Finalmente, se secó el matraz y se pesó. La diferencia de masa entre el matraz tarado y el mismo con los compuestos, permitía determinar la cantidad que se había depositado en las telas durante la impregnación.

Tras analizar los resultados de las dos metodologías, podía verse que los resultados eran próximos entre sí, aunque los de la segunda opción eran ligeramente superiores. Este hecho se debía a que por causa de todo el procesado que debían sufrir las telas para adquirir el valor, éstas se deshilachaban ligeramente (hecho visible). Por este motivo, se decidió que se iba a continuar el análisis usando únicamente la primera opción. Además, se hacía teniendo la certeza de que, esa diferencia de pesos que debía diferenciar la balanza, era certera, pues tal y como se ha indicado, en todos los casos, los resultados obtenidos por la opción uno, eran muy próximos a los de la dos, aunque con algo menos de peso.

El conocimiento de la masa (W) de extracto que se deposita sobre la matriz, permite conocer de una forma rápida el rendimiento de la operación, así como, las cargas de las telas. La ecuación 5.4 permite determinar la carga de compuestos impregnados sobre las telas, definida como masa de extracto impregnado (mg) por cada 100 (mg) de tela.

$$\text{Carga (loading, L)} = \frac{W_{\text{tela impregnada}} - W_{\text{tela sin impregnar}}}{W_{\text{tela sin impregnar}}} * 100 = \frac{W_{\text{Extracto impregnado}}}{W_{\text{tela sin impregnar}}} * 100 \quad [5.4]$$

Un aspecto de suma importancia a evaluar consistió en determinar la homogeneidad de la impregnación dentro del reactor, parámetro evaluado por primera vez en este tipo de proceso. Para ello se llevó a cabo un análisis de varianza donde se compararon las cargas de cada tela en función del lugar que ocupaban dentro del reactor. Las impregnaciones se repitieron al menos por triplicado para obtener datos confiables. Los datos se analizaron haciendo uso del programa STATGRAPHICS Plus 5.1.

El dato carga fue empleado además para determinar la concentración de extracto presente en el medio de cultivo durante la realización de los ensayos antimicrobianos.

5.1.5.2.2. Actividad antioxidante

Una vez las telas se encontraban impregnadas y pesadas (requisito del apartado 5.1.5.2.1), se procedió a tomar la tela numerada como dos, es decir, aquella que tomaba la segunda posición contando desde la zona en la que se deposita el extracto, en el extractor. De dicha tela se cortaron tres triangulitos pequeños, de aproximadamente 2-5 mg (se pesaban), al azar y de distintas zonas de la tela (para aumentar la representatividad), y se introdujeron en tarros marcados para identificarlas. A dichos tarros se les añadió 4 mL (0,004L) de la disolución de $6 \cdot 10^{-5}$ M de DPPH en etanol. Al igual que con el extracto, el

ensayo se mantuvo durante 3 horas en ausencia de la luz, pero en esta ocasión, tan sólo se midieron las absorbancias iniciales y finales, a 515 nm.

La actividad antioxidante se calculó y se expresó como la concentración (C) de compuestos con capacidad antioxidante impregnados en las telas, que son activos y capaces de reaccionar con el DPPH.

Para poder pasar de los valores de absorbancia medidos del reactivo DPPH a concentración, fue necesario usar la recta de calibrado de la figura 5.7 del apartado 5.1.4.2.2. (Recta de calibrado de DPPH en etanol), pero pasando los valores de concentración molar a concentración (g/l) por la fórmula molecular del DPPH (394,32 g/mol). Con dicha recta, se podía saber en lugar de la absorbancia inicial y final del reactivo DPPH tras reaccionar con la tela, la concentración inicial (C_i) de DPPH y la final (C_f). La diferencia de concentraciones inicial y final se relaciona directamente con la concentración de compuestos antioxidantes en la tela, por lo que con ello y, teniendo en cuenta que el volumen de DPPH usado fue de 0.004L, se puede calcular mediante la ecuación 5.5, la concentración de antioxidantes por trozo de tela analizado y comparar las impregnaciones entre sí.

$$C_{\text{antioxidantes activos impregnados en las telas}} = \frac{(C_i \text{ DPPH} - C_f \text{ DPPH}) \left(\frac{g}{L}\right) * \text{Volumen DPPH (L)}}{\text{Masa de tela impregnada usada en el ensayo (g)}} \quad [5.5]$$

5.1.5.2.3. Actividad antimicrobiana

En un primero momento se optó por continuar realizando los ensayos en medio sólido, al igual que para los extractos. Para ello, se prepararon placas Petri de 60 mm de diámetro y 15 mm de altura a las que se le añadió un volumen de 10 mL de medio LB agar Lennox a cada una. Las placas fueron sembradas en césped con un volumen de 50 μ L de inóculo de bacteria *S.aureus* $1.5 \cdot 10^6$ cel/mL.

Se cortó un trozo circular de tela impregnada de 13 mg de peso con una carga del 1,13 mg de extracto por 100 mg de tela y otro trozo, de 14 mg de tela sin impregnar. Se esterizaron, sobre una placa Petri estéril, por radiación UV durante 15 minutos por cada lado y seguidamente se colocaron, con ayuda de unas pinzas estériles, sobre las placas Petri sembradas con *S.aureus*. Las placas se incubaron a 37 °C durante unas 24 horas. Se usó como control negativo aquella placa que presentaba tela sin impregnar. El experimento se probó sólo con *S.aureus* debido a que es más susceptible que *E.coli*. Los resultados no fueron satisfactorios, por lo que se intentó realizar el experimento en medio líquido, midiendo la turbidez de las bacterias a 625 nm, y añadiendo mayor cantidad de tela.

Para realizar el ensayo en medio LB líquido, el primer paso fue repartir 5 mL de medio en tubos de vidrio pirex® de 15 mm de diámetro y 100 mm de altura. Estos se esterizaron en el autoclave. A su vez, se tomaron de dos réplicas (una para cada bacteria) de la mejor condición de impregnación, tres

telas (todas menos la segunda tela más cercana al extracto, que había sido usada para el ensayo de capacidad antioxidante), se trocearon en tiras y se esterilizaron por UV, del mismo modo que se hizo en los ensayos en sólido. De igual modo, se tomó una masa de tela sin impregnar igual a la suma de las 3 telas impregnadas que se iban a usar para cada bacteria (unos 0,2 g) y se usaron como control. Estas últimas también se cortaron y esterilizaron.

Las telas estériles se introdujeron dentro de los tubos con 5 mL de medio, de modo que las que estaban sin impregnar se echaron en uno y las impregnadas en otro (por duplicado, uno para cada bacteria).

Dado que la impregnación no era completamente homogénea y el propio extracto podía tener coloración, no podía realizarse un “blanco” en el espectrofotómetro con otra tela impregnada (implicaría un error), por lo que se optó por dejar las telas en el medio de cultivo por unas 24 horas para que liberasen el extracto impregnado. Pasadas estas 24 horas se tomó, en esterilidad, 1 mL del medio de cada tubo y se midieron en el espectrofotómetro a 625 nm, siendo estos el “blanco” de cada tubo.

A partir de este momento, los tubos, los que contenían tela sin impregnar, tela impregnada y uno más (como control del crecimiento bacteriano), se inocularon con 40 μL de un inóculo ajustado a McFarland 0,5 de modo que la concentración celular en los tubos fuese de $1,5 \cdot 10^6$ cel/mL (con *E.coli* y con *S.Aureus*, según correspondiese). Los tubos se incubaron a 37 °C, 24 horas y con agitación. Una vez transcurrido dicho tiempo, que se correspondería con las 48 horas para los tubos con las telas y a 24 horas para los tubos con los cultivos de bacterias, se midió la absorbancia a 625 nm. Las absorbancias de los tubos se mantuvieron por debajo de 1, por lo que los resultados experimentales fueron aceptables. La diferencia de turbidez entre los tubos a las 24 y las 48 horas equivale a la turbidez de las bacterias. En la figura 5.11 se muestra un esquema explicativo del proceso.

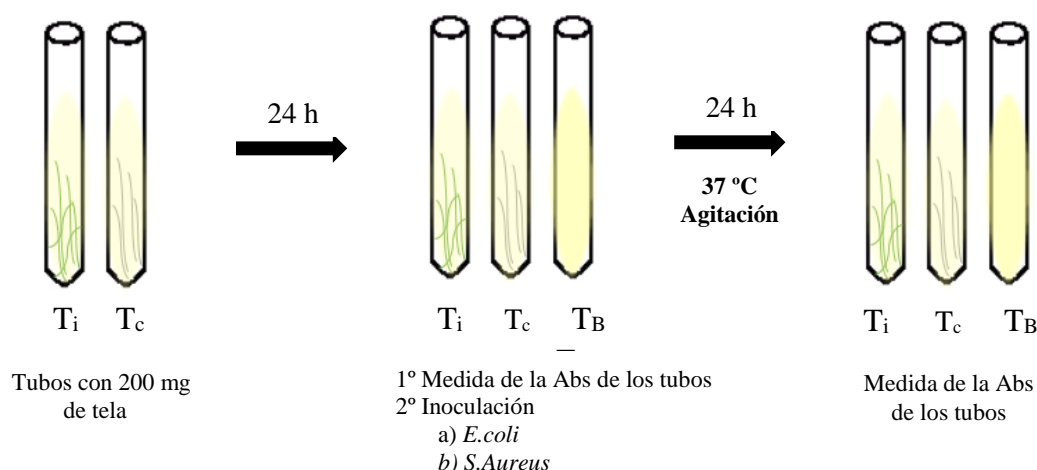


Figura 5. 11. Esquema general del proceso seguido para determinar la capacidad bacteriostática de las telas impregnadas frente a *S.aureus* y *E.coli*; Donde Tc es el tubo control (tiene tela sin impregnar), Ti es el tubo con tela impregnada y TB es el tubo de control de crecimiento bacteriano, y únicamente tiene el inóculo de bacterias a una concentración de $1,5 \cdot 10^6$ cel/mL.

Como las telas empleadas para el experimento habían sido previamente caracterizadas, se podía conocer la carga de las telas en cada tubo y, con ello, la concentración de antioxidantes en el medio de cultivo.

Las absorbancias tomadas a las 24 horas y a las 48 horas para los tubos con las telas se pasaron a concentración celular mediante la elaboración de una curva con los patrones McFarland. Cada patrón se elaboró mediante la mezcla de diferentes volúmenes de una disolución de cloruro de bario al 1% (m/v) con otra de ácido sulfúrico al 1 % (v/v) en agua destilada [35]. Cada patrón se corresponde con una turbidez, medida a 625 nm y ésta con una concentración celular concreta. Los estándares McFarland se representan en la tabla 5.4, y la relación entre absorbancia medida por espectrofotometría y concentración celular (para elaborar la curva) se representan en la figura 5.12.

Tabla 5. 4. Patrones Mc Farland empleados para la realización de la gráfica de Absorbancia vs concentración celular

Estándar de Mc Farland	BaCl ₂ 1% (m/v) mL	H ₂ SO ₄ 1% (v/v) mL	Concentración celular (Cel/mL)
0,5	0,05	9,95	1,5 · 10 ⁸
1	0,1	9,9	3 · 10 ⁸
2	0,2	9,8	6 · 10 ⁸
3	0,3	9,7	9 · 10 ⁸
4	0,4	9,6	12 · 10 ⁸

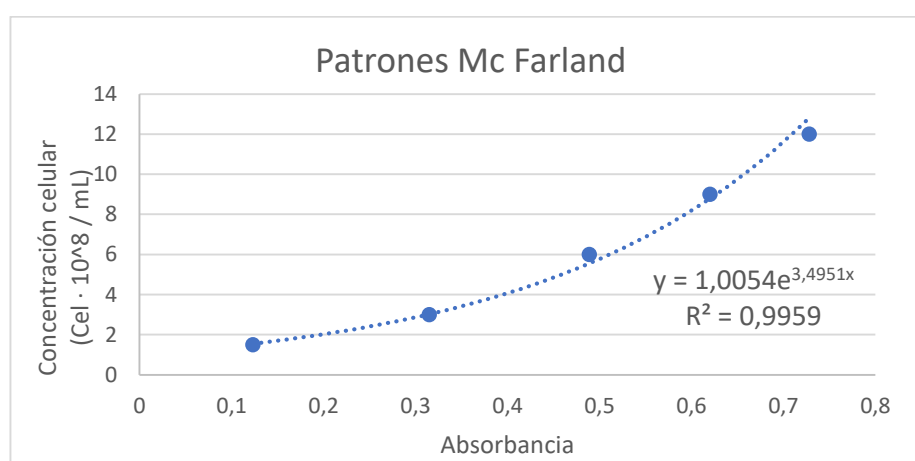


Figura 5. 12. Gráfica absorbancia vs concentración celular.

A partir de la gráfica anterior (figura 5.12) se puede obtener la ecuación 5.6.

$$C_{celular} \left(\frac{cel}{mL} \cdot 10^8 \right) = 1,0054 e^{3,4951 \cdot Abs} \quad [5.6]$$

Esta ecuación se usa para llevar los valores de absorbancia a las 24 y a las 48 horas de los tubos, a valores de concentración. La diferencia de concentración celular entre ambos tiempos permite realizar el cálculo del porcentaje de inhibición celular de las telas. En este caso no se habla de concentración de mínima inhibición (MIC) de las telas debido a que la concentración conseguida en el medio de cultivo, en este ensayo, no consigue llegar a la obtenida en la de los extractos. Por este motivo, lo que cabía esperar, es que se diese una inhibición inferior al 100% y, que mediante el uso de la ecuación 5.7, se determinase el % de inhibición de cada bacteria. Donde C_i es la concentración celular en el medio de cultivo que tiene las telas impregnadas y C_c es la concentración celular en el medio que contiene las telas control sin impregnar.

$$\% \text{ Inhibición}_i = \left(1 - \frac{C_i}{C_c}\right) * 100 \quad [5.7]$$

5.1.5.2.4. Microscopio electrónico de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido o SEM (Scanning Electron Microscopy) usa un haz de luz para formar una imagen ampliada de la superficie del objeto. Esta es una técnica, que gracias a sus características presenta muchas ventajas, tales como, una alta resolución (de 1 nm), gran profundidad de campo, capacidad para desarrollar imágenes tridimensionales y sencillez de uso.

Para evaluar si se produce daño estructural sobre la tela de poliéster durante el proceso de impregnación, por las elevadas presiones, así como observar si el proceso de impregnación ha ocurrido, se hace uso de esta técnica de microscopía. El microscopio empleado en este caso ha sido el microscopio electrónico de barrido (NOVA NANOSEM 450). Para poder usarlo, el primer paso es adherir la matriz a un soporte metálico y, tras ello, someterla a un proceso de metalización en el que la tela queda cubierta por una fina capa de oro mejorando su conductividad. Esto queda reflejado en la figura 5.13.



Figura 5. 13. Fragmento de telas de poliéster (impregnada y sin impregnar) cubiertas por una fina capa de oro como paso previo a su visualización al microscopio SEM.

5.2. Discusión de los resultados experimentales

Este apartado tiene como finalidad mostrar todos los resultados obtenidos tras la ejecución de las técnicas explicadas en el apartado 5.1. La evaluación y discusión de los resultados, permite la comprensión del comportamiento de los fluidos supercríticos y sus variables, tanto en la extracción, como en la impregnación, además de su efecto sobre la capacidad antioxidante y antimicrobiana.

5.2.1. Caracterización de los extractos obtenidos

Los extractos, tal y como se ha explicado en el apartado de material y métodos, fueron caracterizados en función de su rendimiento de extracción, capacidad antioxidante y antimicrobiana.

5.2.1.1. Rendimientos de extracción

El rendimiento de extracción es un parámetro interesante de medir, pues aporta información importante. Da idea acerca de qué tan buena ha sido la extracción, es decir, si los disolventes usados han sido los adecuados, o si es preciso variar la polaridad de los mismos para poder extraer compuestos de interés.

En esta ocasión, se puede analizar la influencia del co-disolvente en la extracción, además de realizar un estudio entre especies, y entre variedades de una misma especie. En todos los experimentos se ha mantenido constante la temperatura, 80 °C y la presión de extracción, 100 bar. Sin embargo, al cambiar el tipo de co-disolvente se ha modificado la polaridad de la mezcla utilizada en el proceso de extracción.

Se ha trabajado con dos tipos de co-disolventes, acetona y etanol (de carácter más polar que el primero), y ambos han sido impulsados a 5 g/min (misma proporción de co-disolvente). De esta forma, se puede tratar de ver si los compuestos presentes en las hojas, de las diferentes materias primas, se aproximan más a una polaridad o la otra. Los rendimientos de extracción de cada materia prima con su respectivo disolvente de extracción se representan en la figura 5.14.

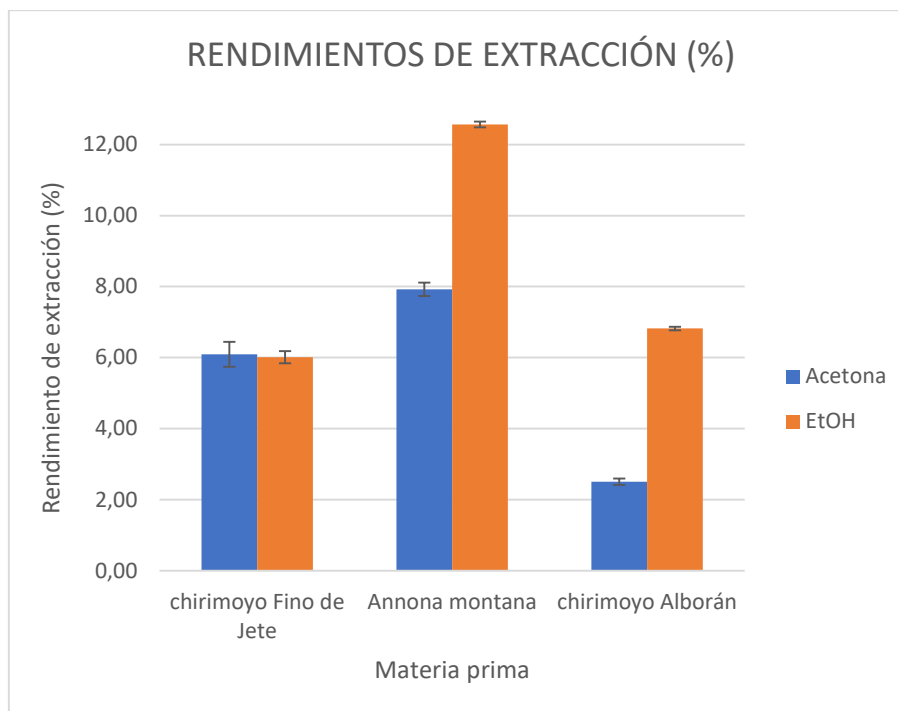


Figura 5. 14. Gráfico de los rendimientos de extracción.

Teniendo en cuenta la figura 5.14, puede decirse que, a excepción del chirimoyo Fino de Jete, donde los rendimientos de extracción son semejantes con ambos sistemas de extracción (6,09 % p/p con CO₂-etanol y 6,01 % p/p CO₂-acetona), la mezcla CO₂-etanol proporciona mayores valores del parámetro estudiado. En el caso de *Annona montana* el incremento en el rendimiento de extracción es desde 7,92 % p/p hasta 12,57 % p/p al cambiar de la mezcla CO₂-acetona a CO₂-etanol. De igual modo, el incremento en el rendimiento de extracción al utilizar chirimoyo Alborán es desde 2,50 % p/p hasta 6,82 % p/p. Estos resultados permiten inferir que los metabolitos presentes en las hojas son mayoritariamente de carácter polar.

Salvo los extractos de *Annona montana* en etanol y chirimoyo Alborán en acetona, los rendimientos de extracción de hojas de árboles de la familia *Annonaceae* se encuentran como promedio, en torno al 7% p/p.

Según bibliografía, el rendimiento de extracción por maceración a temperatura ambiente de hojas de *Annona squamosa* en agua, cloroformo y metanol, han sido del 8,7% p/p, 10,1% p/p, y 12,6% p/p, respectivamente [36]. Es importante destacar que dichos resultados se han obtenido tras ocho días de maceración, y no en tan sólo 2h de extracción como los resultados obtenidos en este trabajo.

También se ha usado acetona como solvente en extracción asistida por ultrasonidos para la extracción de compuestos de hojas de *Annona glabra L.* por Sadao y col [16]. Sin embargo, los

resultados de extracción, en este caso, se centran en la determinación de la actividad alelopática de los extractos, sin quedar reportados los datos de rendimiento de extracción.

Extractos obtenidos de *Annona muricata* en etanol han mostrado una concentración de compuestos fenólicos totales de 372,92 µg/mL, aunque, al igual que en el caso anterior, no aparecen referenciados los rendimientos totales del proceso [37]. Sin embargo, se puede ver que el contenido de esta familia de compuestos es alto, lo que corrobora que la mezcla CO₂-etanol es adecuada para realizar los estudios propuestos.

Los mejores resultados de extracción se corresponden con los extractos de *Annona montana*. Al realizar los ensayos, en el proceso de secado, el extracto quedaba con carácter aceitoso, lo que evidencia que se extraen otro tipo de compuestos que, a simple vista, no se observaban en el resto de muestras.

5.2.1.2. Actividad antioxidante

No basta con conocer el rendimiento de extracción, es muy importante evaluar la actividad de dichos extractos para poder decidir con cuál de ellos seguir trabajando. Es necesario por tanto comprobar si los compuestos extraídos presentan o no actividad antioxidante. Puede suceder que, a pesar de que el rendimiento de extracción sea más bajo debido a una menor cantidad global de compuestos, la actividad antioxidante sea mayor gracias al tipo de compuestos presentes y su actuación sinérgica.

En el caso de que los valores de capacidad antioxidante se expresen respecto al AAI, un mayor valor de éste indica que la actividad antioxidante del extracto es mayor. Existe una clasificación de la capacidad antioxidante de un extracto en función del AAI, siendo: pobre actividad antioxidante si $AAI < 0.5$, moderada actividad si $0.5 < AAI < 1$, fuerte si $1 < AAI < 2$ y muy fuerte si $AAI > 2$ [32]. Si, por el contrario, los valores se expresan en función del EC₅₀, un mayor valor de este dato se corresponde con una actividad antioxidante peor. Gracias a que la primera forma de expresar los datos permite clasificar qué tan buena es la actividad antioxidante del extracto, es más interesante usar el AAI.

Para determinar la actividad antioxidante de los extractos se realizó el procedimiento descrito en el apartado 5.1.4.2.2, de manera que se expresaron los resultados respecto al AAI (figura 5.15).

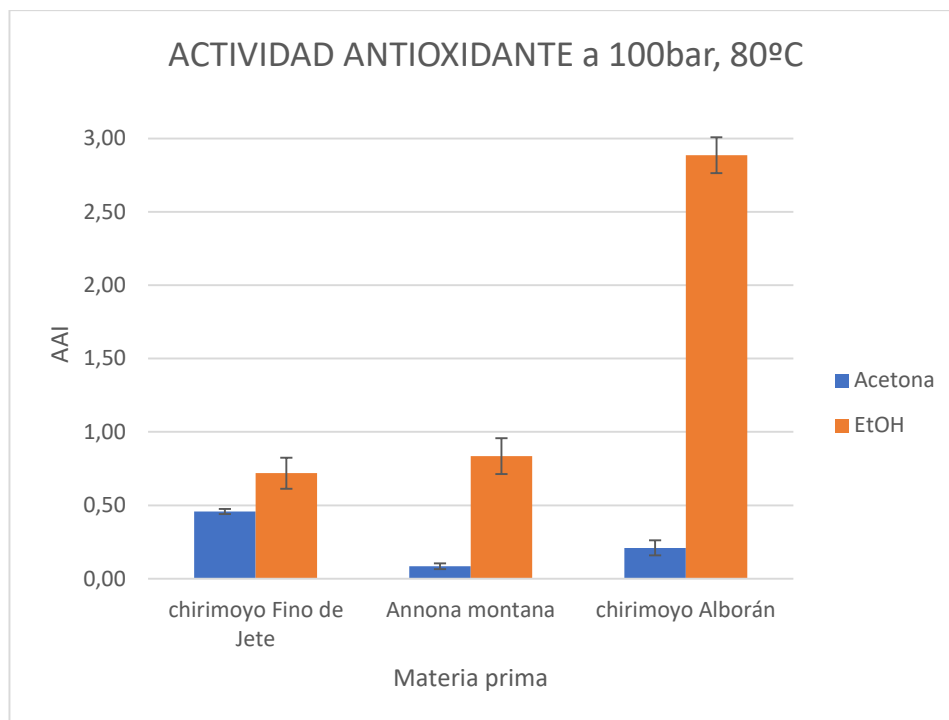


Figura 5. 15. Gráfico de índices de actividad antioxidante (AAI) de los extractos obtenidos empleando CO₂ y etanol o acetona como co-disolvente.

Teniendo en cuenta la clasificación anterior para el AAI, se puede decir que, aunque los rendimientos de extracción de chirimoyo Alborán son menores que los obtenidos para los extractos de *Annona montana* (figura 5.14), el AAI aumenta significativamente, tal y como se muestra en la figura 5.15. La actividad antioxidante de chirimoyo Alborán en etanol está muy por encima del resto de los extractos, siendo el único cuyo AAI es superior a 2, es decir, de capacidad antioxidante muy fuerte.

En la figura 5.15 también queda reflejado cómo todos aquellos extractos disueltos en etanol, tienen una capacidad antioxidante muy superior a sus equivalentes extracciones en acetona, algo que muestra que la mayor polaridad del etanol permite extraer compuestos mucho más antioxidantes como polifenoles.

Los datos de capacidad antioxidante de los extractos, tal y como se ha indicado anteriormente, también se pueden expresar en función de su EC₅₀ (Tabla 5.5), lo que permite su comparación con datos bibliográficos (Tabla 5.5).

Tabla 5. 5. Concentración eficiente (EC₅₀) de los extractos obtenidos empleando CO₂ y etanol o acetona como co-disolvente junto a otros obtenidos en bibliografía.

Variedad de materia prima	Disolvente	EC ₅₀ (µg/mL)
<i>Annona montana</i>	Etanol	28,99 ± 4,23
	Acetona	293,92 ± 31,91
<i>Annona cherimola</i> variedad Fino de Jete	Etanol	32,06 ± 4,52
	Acetona	51,86 ± 1,96
<i>Annona cherimola</i> variedad Alborán	Etanol	8,23 ± 0,35
	Acetona	119,91 ± 11,95
<i>Annona muricata</i> [35] (Extracción por maceración)	Etanol	470,51
	Agua	216,41
<i>Annona squamosa</i> [33] (Extracción por maceración)	Agua	439,6
	Cloroformo	308,3
	Metanol	342,5

En la tabla anterior puede verse cómo los extractos obtenidos en este proyecto poseen mejor capacidad antioxidante (valores de EC₅₀ más bajos) que los obtenidos por otros autores para extractos de árboles de la familia *Annonaceae*. Por esta razón, puede afirmarse que esta técnica de extracción de compuestos naturales muestra grandes ventajas, ya que además de permitir obtener rendimientos totales similares a los de técnicas tradicionales, pero en mucho menor tiempo, es capaz de conseguir extractos mucho más activos.

Debido a que el extracto de chirimoyo Alborán en etanol fue el único que mostró una capacidad antioxidante muy fuerte, propiedad que se buscaba, y a que su rendimiento de extracción era adecuado (6,82 % p/p), se optó por usar dicho extracto para llevar a cabo los ensayos de actividad antimicrobiana y de impregnación.

5.2.1.3. Actividad frente a microorganismos

Con el extracto de chirimoyo Alborán en etanol se realizó el método de cultivo en pocillo para determinar la MIC. Los resultados obtenidos para las dos bacterias se muestran en la tabla 5.6.

Tabla 5. 6. Resultados del MIC para las dos bacterias ensayadas.

Condiciones de operación del extracto usado	Microorganismos usados en el ensayo	MIC (µg/mL)
Presión: 100 bar Temperatura: 80 °C	<i>Escherichia coli</i>	2000
Mezcla CO ₂ :Etanol (1:1 v/v) (5g/min) Tiempo de extracción: 2h	<i>Staphylococcus aureus</i>	800

Los resultados obtenidos presentan coherencia, ya que el valor de MIC de *S.Aureus* es inferior al de *E.coli*. Esto se debe a que, por lo general, las bacterias Gram-, como es el caso de *E.coli*, son más resistentes a sustancias antimicrobianas como serían por ejemplo los antibióticos. La causa de este hecho es que las bacterias Gram- poseen una doble membrana lipídica que dificulta la actividad de los agentes antimicrobianos.

Pinto y col., en extractos metanólicos de *Annona muricata L.*, obtenidos por maceración estática, han obtenido valores de MIC de 156 µg/mL para *S.aureus* y 625 µg/mL para *E.coli*, además de concluir con que se trata de un extracto de amplio espectro de actividad [38]. Es importante destacar que estos son los únicos datos de capacidad antimicrobiana encontrados para extractos de *Annonas*, sin embargo, no pueden ser comparados con los del presente trabajo, ya que el ensayo antimicrobiano no ha sido realizado en el mismo medio de cultivo.

5.2.2. Caracterización de las telas impregnadas

Los estudios de impregnación supercrítica sobre telas de poliéster se realizaron con el extracto de chirimoyo Alborán y se evaluó la influencia de la masa inicial de extracto a impregnar y el volumen de etanol en el que se disuelve dicha masa inicial de extracto sobre la actividad antioxidante, la carga impregnada y la homogeneidad entre telas. Al mismo tiempo, se determinó la actividad antimicrobiana de las telas y, además, se observó el efecto de la impregnación sobre la tela mediante el SEM.

5.2.2.1. Estudio del proceso de impregnación

El proceso de impregnación se llevó a cabo a 400 bar, 60 °C y durante un tiempo de 1 hora. Se probaron dos cantidades iniciales de extracto, 8000 µg y 16000 µg, además de dos volúmenes de etanol (5 y 10 mL). Los resultados de la carga impregnada en las telas se muestran en la figura 5.16.

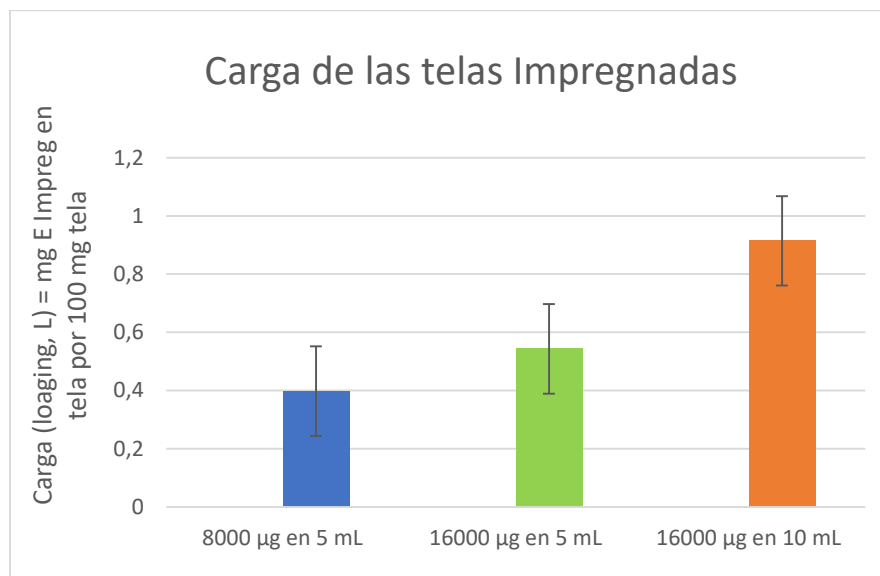


Figura 5.16. Influencia de la masa de extracto y el volumen de etanol en la carga impregnada de telas de poliéster. Impregnación a 400 bar, 60 °C durante 1h.

En la gráfica 5.16 queda reflejado cómo un aumento de masa inicial de extracto en el reactor desde 8000 a 16000 µg de extracto (disuelto en 5 mL de etanol) proporciona mayores valores de carga impregnada.

Para estudiar el efecto del etanol sobre el proceso de impregnación se decidió partir de 16000 µg de extracto y se disolvió esta masa en el doble de etanol, es decir 10 mL. La mezcla CO₂-etanol puede favorecer el equilibrio de solubilidad de los compuestos presentes en el extracto en la fase supercrítica, pero es necesario comprobar si en estas condiciones también se favorece el proceso de impregnación. Nuevamente, se analizó la carga impregnada de las telas resultantes y se observó que la carga de las telas aumentaba hasta 0,91 mg de extracto por cada 100 mg de tela, siendo dicha condición de impregnación la que mostraba mejores resultados.

Con los valores obtenidos se realizó un análisis de varianza para evaluar si existen diferencias significativas entre las medias de las tres condiciones estudiadas. La tabla 5.7, muestra un P-valor inferior al 0,05, por lo que hay diferencias estadísticamente significativas entre las 3 medias a un nivel de confianza del 95 %. El análisis de los grupos homogéneos permite establecer que hay diferencias significativas entre las medias de los experimentos A-C y B-C. Por tanto, se obtienen dos grupos homogéneos, como se confirma en el diagrama de cajas y bigotes de la figura 5.17, uno formado por los experimentos llevados a cabo a 8000 y 16000 µg de extracto disueltos en 5 mL de etanol y el otro, formado por aquella condición en la que se duplica la cantidad inicial de etanol.

Tabla 5.7. Tabla con las medias para cada columna de datos.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,47855	2	0,739274	7,40	0,0025
Intra grupos	2,89782	29	0,099925		

	Frec.	Media	Contraste	Diferencias
5mL_8000 µg (A)	8	0,398	A - B	-0,145
5mL_16000 µg (B)	12	0,543	A - C	*-0,515583
10mL_16000 µg (C)	12	0,9143	B - C	*-0,370583

El símbolo “ * ” indica diferencias significativas a un nivel de confianza del 95%.

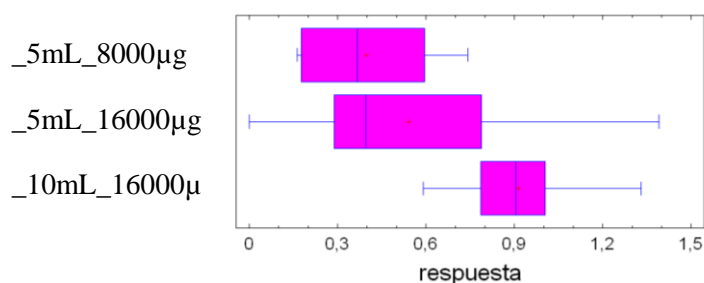


Figura 5.17. Diagrama de cajas y bigotes de la respuesta de la carga impregnada.

Gracias a los datos obtenidos en el estudio de la influencia del etanol en el proceso de impregnación, se puede decir que, es evidente que, el disolvente favorece el proceso de impregnación y que, un mayor volumen del mismo, en el rango de valores estudiados, permite una mayor carga en las telas de poliéster. Este hecho podría explicarse debido a que el etanol favorece la solubilidad de los compuestos polares en el CO₂, aumentando la polaridad global de la fase fluida y, con ello, la interacción de esta fase con el polímero.

Además de llevarse a cabo un estudio exhaustivo de la influencia de ciertas variables sobre la carga de las telas impregnadas, se midió la capacidad antioxidante de las mismas. Pues, era necesario comprobar si los compuestos se habían degradado o perdido su actividad al someterse a las condiciones de impregnación. La metodología utilizada para determinar la capacidad antioxidante de las telas está descrita en el apartado 5.1.5.2.2.

Tras representar la relación de masas entre los compuestos antioxidantes impregnados, capaces de reaccionar con el DPPH, con la masa de tela presente en el ensayo, se obtiene la figura 5.18.

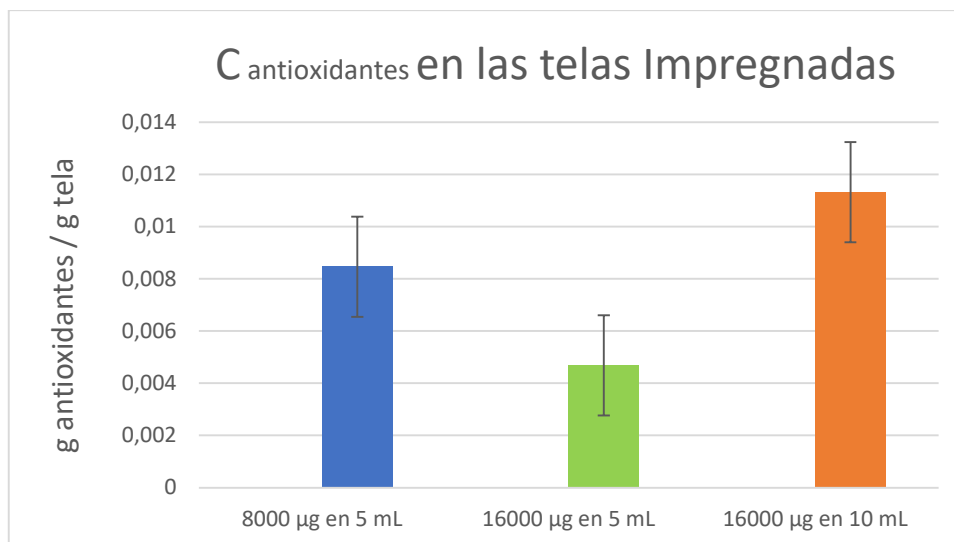


Figura 5. 18. Actividad antioxidante de las telas a las diferentes condiciones de impregnación, manteniéndose constante la temperatura (60 °C), la presión (400 bar) y el tiempo de impregnación (1h).

Tal y como se aprecia en la gráfica anterior (figura 5.18), todas las telas mostraron actividad antioxidante, por lo que se confirmó que los compuestos que se habían impregnado continuaban siendo activos. En esta ocasión, nuevamente sigue siendo la condición de 10 mL de extracto con una masa de 16000 µg, la que presenta mayor actividad y por ello, la considerada mejor opción. Reúne de este modo, ser aquella que posee mayor carga impregnada en las telas y mayor porcentaje de actividad de los compuestos impregnados.

En las otras dos condiciones de impregnación, se da el caso de que, aunque en la de 8000 µg de masa, la carga de las telas es ligeramente menor que en la concentrada al doble (16000 µg en 5mL), la actividad de los compuestos que se han impregnado en ellas es mayor.

5.2.2.2. Estudio de homogeneidad en las telas impregnadas

Una vez finalizadas las impregnaciones se observó, por el color de las telas, que el proceso de impregnación podía no ser homogéneo. Esto se debía a que no todas las telas conseguían tener un color verdoso uniforme. Por este motivo, se decidió realizar un estudio sobre la homogeneidad de impregnación, respecto a la carga de las telas, en el reactor (figura 5.19). Para ello, se analizó la carga de cada tela introducida en el reactor de forma independiente, es decir, ahora las telas se estudiaban en función de la posición o altura que ocupaban en el reactor.

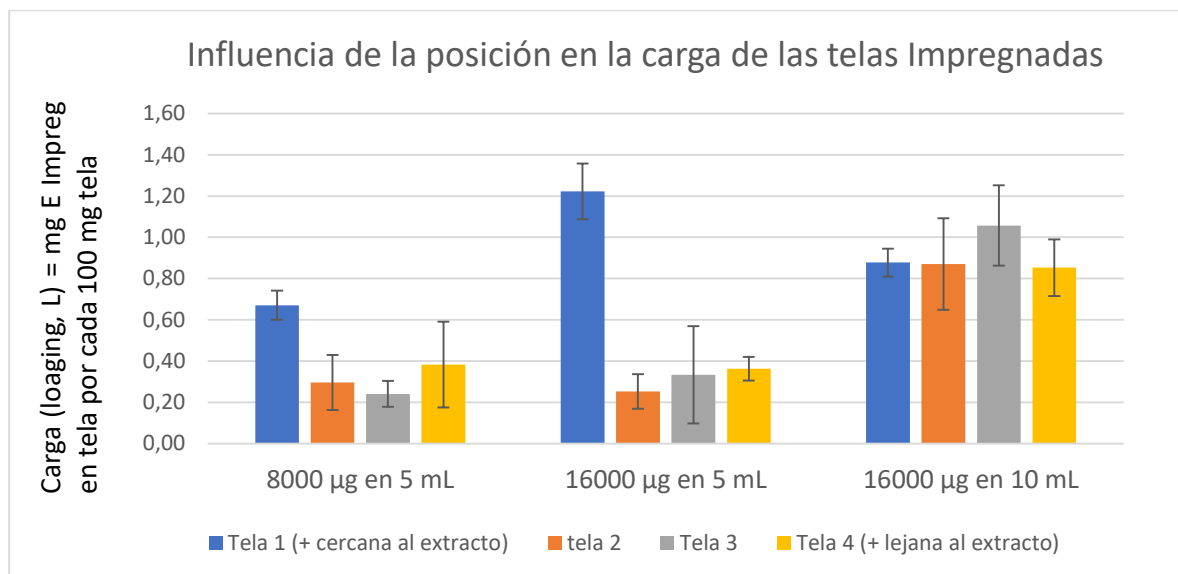


Figura 5.19. Influencia de la posición de las telas en el reactor con la carga impregnada. Impregnación a 400 bar, 60 °C durante 1h.

Al analizar la figura 5.19, se puede ver, claramente, que la mayor homogeneidad de impregnación, respecto a la carga de las telas colocadas en el reactor, se corresponde con la condición de 10 mL de extracto con una masa de 16000 µg de compuestos. En ella, las cuatro telas, independientemente de su altura (cercanía al extracto), presentan una carga similar en torno a 0,91 mg de extracto por cada 100 mg de tela.

Respecto a las otras dos condiciones de impregnación, las de 5mL de etanol a 8000 y 16000 µg, de la figura 5.19 se puede decir que la impregnación no es homogénea. Sin embargo, en ambas se observa el mismo efecto, es decir, que la primera tela, aquella que se colocó más cerca del extracto en el proceso de impregnación, es la que consigue una mayor carga impregnada de las 4 introducidas en el reactor, y en especial, en la condición de 5 mL de extracto al doble de concentración. Por el contrario, las siguientes telas más alejadas del extracto poseen menos carga, aunque no se observa en ellas un patrón impregnación, es decir, no es siempre, por ejemplo, la segunda tela la siguiente más impregnada.

Los resultados indican que la impregnación llevada a cabo a partir de de 5 mL de etanol con 16000 µg de extracto es la que proporciona mayor diferencia de carga entre la primera tela y el resto de ellas, o lo que es lo mismo, la homogeneidad de impregnación mínima. Este hecho podría deberse a que, al duplicar la masa de extracto, hay más compuestos para impregnar, pero, al haber menor proporción de etanol, se dificulta la solubilización o se reduce la permeabilidad de las telas y con ello, el poder de los compuestos para penetrar las telas e impregnarse en una que está colocada a una o varias telas por encima.

Finalmente, gracias a los datos obtenidos, se puede decir, de forma evidente, que el disolvente, etanol en este caso, favorece el proceso de impregnación, y que, un mayor volumen del mismo, en el rango de valores estudiados, permite una mayor homogeneidad y carga en las telas de poliéster.

Los resultados obtenidos también fueron evaluados estadísticamente mediante un análisis de la varianza (ANOVA). Los datos se muestran en la tabla 5.8.

Tabla 5. 8. Tabla ANOVA para el análisis de la homogeneidad de carga en las telas de la impregnación 10mL_16000 µg

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,086225	3	0,0287417	0.70	0,5802
Intra grupos	0,330467	8	0,0413083		

En esta tabla, el P-valor es superior al 0,05. Por este motivo, puede afirmarse estadísticamente que la diferencia entre los valores de carga de las distintas telas (4) no es significativa, verificándose que, a esta condición de impregnación, el proceso en el reactor es homogéneo, tal y como se observaba en la figura 5.19.

5.2.2.3. Actividad frente a microorganismos

Una vez caracterizadas las telas conforme a su carga y actividad antioxidante, se eligió usar aquellas cuya condición de impregnación fue la de 10 mL a 16000 µg, ya que como se ha explicado en el apartado 5.2.2.1, eran las que mostraban mejores características. A estas, se les analizó la capacidad antimicrobiana (% de inhibición) siguiendo dos metodologías, una en cultivo sólido, que resultó no funcionar, y otra, en medio líquido.

El ensayo en medio sólido resultó fallido debido a que se presenciaba crecimiento microbiano por toda la placa, incluso bajo la tela. Este hecho pudo deberse a que las telas no se unieran al medio con completa homogeneidad, o bien a que no hubiese una adecuada difusión de los compuestos al medio, causando que estos no pudiesen ejercer bien su función. Otro factor que también pudo influir en los resultados negativos de este ensayo puede estar relacionado con que la cantidad de tela usada para el ensayo fuese muy poca (baja concentración de compuestos) como para poder conseguir superar la MIC determinada para el extracto. Los resultados de esta metodología frente a *S.aureus* se muestran en la figura 5.20.



Figura 5.20. Actividad antimicrobiana, frente a *S.aureus*, de las telas impregnadas en medio sólido.

Para solucionar los posibles problemas planteados, se decidió realizar el ensayo en medio líquido y así poder aumentar la concentración de compuestos impregnados en el medio de cultivo, además de favorecer el proceso de difusión de los mismos.

A partir de los mg de tela introducidos en el medio de cultivo, 0,19 mg en el ensayo de *S.aureus* y 0,23 mg en el de *E.coli*, y conociendo la carga de las telas fue posible determinar la concentración de extracto en el medio. Dicha concentración alcanzada no fue exactamente la misma para las dos bacterias. Esto fue debido a que, para tener cantidad de tela suficiente, se tuvieron que usar dos réplicas distintas de la condición de 10 mL a 16000 µg (una para cada bacteria).

La tabla 5.9 muestra los microorganismos empleados para el ensayo, la concentración (C.) de extracto conseguida en el medio, y su correspondiente % de inhibición (calculado según el procedimiento descrito en el apartado 5.1.5.2.1).

Tabla 5. 9. Actividad antimicrobiana de las telas impregnadas en la condición de 10 mL_3200 µg

Microorganismos empleados en el ensayo	C. de compuestos impregnados en el medio de cultivo (µg/mL)	% Inhibición
<i>S.aureus</i>	340	38,70
<i>E.coli</i>	500	24,10

Como se conocía de antemano la MIC de las diferentes bacterias para el extracto empleado en la impregnación, se sabía que la inhibición del crecimiento no iba a ser del 100%, sino inferior, pues las concentraciones de extracto impregnadas se encontraban muy por debajo.

Los porcentajes de inhibición obtenidos, 38,70 para *S.aureus* y 24,10 para *E.coli*, son acordes a los resultados obtenidos para el extracto, es decir, el %I de *S.aureus* (Gram+) es mayor (bacteria menos resistente) que el de *E.coli*. Estos resultados se han obtenido aun teniendo una menor concentración de compuestos en el medio de cultivo.

5.2.2.4. Estudio de la matriz por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Tras la impregnación se podía apreciar, a simple vista, que las telas cambiaban ligeramente de color, pasando de blanco a un tono verdoso (figura 5.21). Sin embargo, la intensidad de color que se obtenía en ellas no variaba en gran medida ni entre las condiciones de impregnación estudiadas ni con la tela antes de impregnar. Frente a estos resultados puede decirse que, la cantidad de clorofila que se impregna, manteniendo constantes las variables de presión, temperatura y tiempo de impregnación, es prácticamente la misma, al igual que, es posible que las telas no se vean dañadas a nivel estructural.

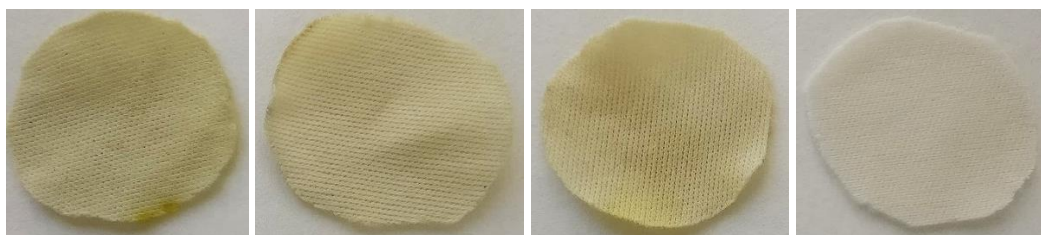


Figura 5. 21. Las tres primeras imágenes se corresponden con telas impregnadas en las condiciones de: (A) 5mL_8000 μg , (B) 5mL_16000 μg y (C) 10mL_16000 μg ; mientras que, la cuarta imagen, se corresponde con una tela antes de impregnar.

Para poder estudiar, de manera más rigurosa, la existencia o no de variaciones en las telas impregnadas, es necesario comparar las imágenes obtenidas al microscopio (SEM) de las telas de poliéster antes y después de la impregnación (figura 5.22).

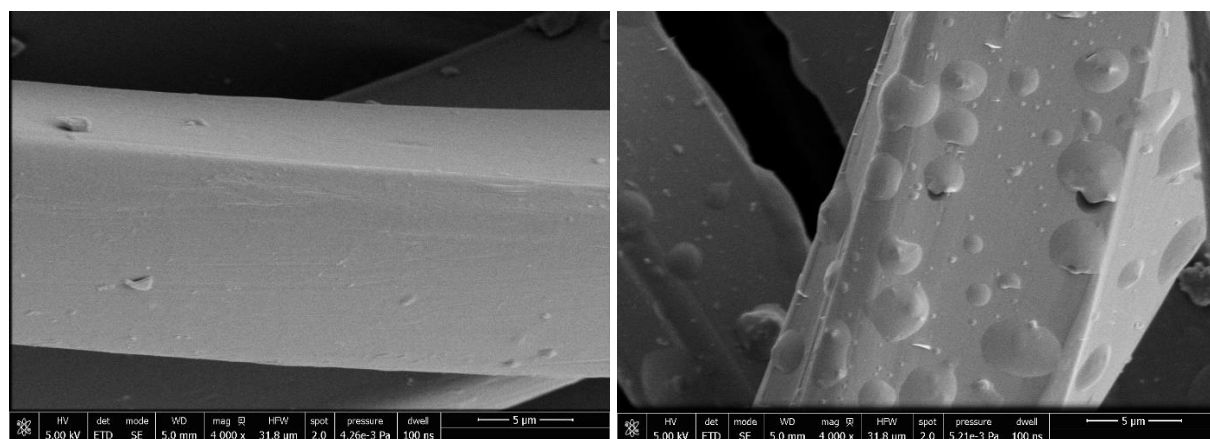


Figura 5. 22. Imagen al microscopio (SEM) de las telas (A) antes de impregnar y (B) tras la impregnación.

Al analizar ambas imágenes, el primer aspecto que llama la atención es que la tela sin impregnar presenta imperfecciones en su fibra y suciedad depositada sobre ella. Sin embargo, esas mismas imperfecciones de la matriz también pueden verse en la tela impregnada y, además, sin estar aumentadas o extendidas, por lo que se confirma que dichas telas, en el proceso de impregnación, no han sufrido

daño estructural. Por otra parte, la imagen correspondiente a la tela impregnada, posee una nueva peculiaridad. Sobre la superficie o depositadas en ella, se aprecian vesículas del producto impregnado.

Las vesículas que se observan en la tela impregnada son diferentes entre sí, en cuanto a tamaño y esfericidad, por lo que es posible que haya diferentes tipos de unión entre la tela y los distintos compuestos presentes en ella.

Las vesículas que aparecen en las telas de poliéster tienen todas forma de media esfera. Esto es una diferencia hallada tras comparar las imágenes obtenidas de la impregnación de extracto de chirimoyo con las obtenidas tras la impregnación de extracto de mango [30].

Respecto al proceso de impregnación, podría decirse que, tal y como han mostrado los resultados de caracterización de las telas, ha sido bueno, ya que el número de vesículas presentes en una pequeña región de tela, vista a 4000X y 50 μm , es muy elevado, además de superior al obtenido usando extracto de mango [30].

A pesar de toda la información comentada, sería preciso recurrir a un estudio más exhaustivo, dado que el resultado obtenido es meramente descriptivo.

6. Conclusiones

Un estudio detallado de los procesos de extracción mejorada con fluidos supercríticos de hojas de árboles de la familia *Annonaceae*, caracterización de los mismos e impregnación, aporta las siguientes conclusiones.

El mayor rendimiento de extracción se obtuvo al trabajar con hojas de *Annona montana* a 80 °C y 100 bar, usando como disolvente etanol (12,57 % p/p). Pese a ello, éste extracto mostró menor capacidad antioxidante que el obtenido al trabajar con hojas de *Annona cherimola* variedad Alborán (a 80°C y 100 bar) usando como disolvente etanol. Siendo el AAI de este último de 2,89, es decir, muy fuerte.

Se obtuvieron buenos resultados de actividad antimicrobiana para el extracto de chirimoyo Alborán frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* (Gram +) y *Escherichia coli* (Gram -). La mínima concentración de inhibición (MIC) fue de 800 µg/mL y 2000 µg/mL, respectivamente.

Tras el estudio, en el proceso de impregnación a 60 °C y 400 bar, de la influencia del etanol y la masa inicial de extracto sobre la carga y la capacidad antioxidante de las telas, se obtuvo que la mejor condición para trabajar con *Annona cherimola* variedad Alborán era la de 10 mL de extracto con una masa de 16000 µg, con la que se obtuvo una carga impregnada de 0,91 mg por cada 100 mg de tela y una relación masa/masa entre compuestos antioxidantes impregnados y masa de tela usada en el ensayo, de 0,011.

El uso de un mayor volumen de disolvente, etanol, tiene una influencia positiva en el proceso de impregnación a 60 °C y 400 bar, siendo el responsable de obtener una mayor carga impregnada y actividad de las telas, además de una mayor homogeneidad de impregnación en el reactor.

En los ensayos antimicrobianos en medio líquido frente a *E.coli* y *S.aureus* de las telas impregnadas con 10 mL de extracto de chirimoyo Alborán con una masa de 16000 µg se consiguió una concentración de compuestos en el medio líquido de 500 y 340 µg/mL, y como resultado los valores de 24,10 % y 38,70% de inhibición respectivamente.

El análisis de las imágenes obtenidas por SEM de las telas antes y después de impregnar confirmó que la impregnación había tenido lugar. Hecho que se confirma debido a la aparición de una gran cantidad de vesículas adheridas a la matriz.

7. Perspectivas futuras

Durante el desarrollo del proyecto se ha tratado de obtener la máxima información posible del estudio de la influencia de algunas variables en el proceso de caracterización de extractos e impregnación en telas de poliéster, pero esto no quiere decir que la experimentación esté concluida, sino que el tiempo necesario para que se lleve a cabo es mayor.

Sería interesante estudiar algunas de las variables que más que pueden influir en el proceso de impregnación y que en este trabajo se han mantenido constantes. Este es el caso de la cantidad de tela, disposición o tamaño de la misma introducida en el reactor. Además, se debería seguir probando la influencia del etanol junto a la modificación de las variables de presión y temperatura.

Con respecto a la metodología, se debería de plantear la posibilidad de incluir agitación en el reactor, ya que se piensa que podría afectar, de manera significativa, al rendimiento y homogeneidad.

En cuanto a los ensayos antimicrobianos, podría ampliarse el número de bacterias a ensayar e introducir microorganismos nuevos como los hongos.

Otro punto interesante a tratar es el tipo de ensayo al que se somete a los extractos y a las telas para evaluarlos y caracterizarlos, es decir, se debería de poder analizar, por ejemplo, la actividad citotóxica, antiinflamatoria o antitumoral de los mismos, ya que, se ha observado que los extractos de la familia Annonaceae presentan este tipo de propiedades por su contenido en acetogeninas.

A su vez, sería de gran ayuda analizar, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), los compuestos presentes en los distintos extractos obtenidos, la proporción de ellos y los que consiguen impregnarse a las diferentes condiciones de operación.

Otro aspecto que se podría evaluar es el tipo de matriz que se emplea para la impregnación, pudiéndose usar plásticos o cualquier otro que resulte de interés.

Por tanto, son muchos los elementos que se pueden continuar estudiando para avanzar en esta investigación y conseguir, finalmente, materiales inteligentes.

8. Bibliografía

- [1]. Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3), 311-335.
- [2]. Rates, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39(5), 603-613.
- [3]. Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1), 72-79.
- [4]. Preethi, R., Devanathan, V. V., & Loganathan, M. (2010). Antimicrobial and antioxidant efficacy of some medicinal plants against food borne pathogens. *Advances in Biological Research*, 4(2), 122-125.
- [5]. Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2006). Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food chemistry*, 98(1), 136-148.
- [6]. Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K., & Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15(8), 639-652.
- [7]. Tripathi, P., & Dubey, N. K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest biology and Technology*, 32(3), 235-245.
- [8]. Martínez-Monzó, J., Martínez-Navarrete, N., Chiralt, A., & Fito, P. (1998). Mechanical and structural changes in apple (var. Granny Smith) due to vacuum impregnation with cryoprotectants. *Journal of Food Science*, 63(3), 499-503.
- [9]. Bastante, C. C., Cardoso, L. C., Serrano, C. M., & de la Ossa, E. M. (2017). Supercritical Impregnation of food packaging films to provide antioxidant properties. *The Journal of Supercritical Fluids*.
- [10]. Bouledjoudja, A., Masmoudi, Y., Sergent, M., & Badens, E. (2017). Effect of operational conditions on the supercritical carbon dioxide impregnation of anti-inflammatory and antibiotic drugs in rigid commercial intraocular lenses. *The Journal of Supercritical Fluids*.
- [11]. González Vega, M. E. (2013). Chirimoya (*Annona cherimola* Miller), frutal tropical y subtropical de valores promisorios. *Cultivos Tropicales*, 34(3), 52-63.
- [12]. Yang, H., Li, X., Tang, Y., Zhang, N., Chen, J., & Cai, B. (2009). Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in *Annona* genus plant seeds by HPLC–DAD method. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 49(1), 140-144.

- [13]. Gupta-Elera, G., Garrett, A. R., Martinez, A., Robison, R. A., & O'Neill, K. L. (2011). The antioxidant properties of the cherimoya (*Annona cherimola*) fruit. *Food Research International*, 44(7), 2205-2209.
- [14]. Lima, L. A. S., Pimenta, L. P., & Boaventura, M. A. D. (2010). Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 122(4), 1129-1138.
- [15]. Roduan, M. R. M., Hamid, R. A., Sulaiman, H., & Mohtarrudin, N. (2017). *Annona muricata* leaves extracts prevent DMBA/TPA-induced skin tumorigenesis via modulating antioxidants enzymes system in ICR mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 481-488.
- [16]. Matsumoto, S., Varela, R. M., Palma, M., Molinillo, J. M., Lima, I. S., Barroso, C. G., & Macías, F. A. (2014). Bio-guided optimization of the ultrasound-assisted extraction of compounds from *Annona glabra* L. leaves using the etiolated wheat coleoptile bioassay. *Ultrasonics sonochemistry*, 21(4), 1578-1584.
- [17]. Lee, W.Z., Chan, S.K., Khoo, H. E., Sia, C. M., Yim, H. S. Influence of different extraction conditions on antioxidant properties of soursop peel. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 2016, 15 (4), 410-428.
- [18]. . Yang, H, Zhang, N., Zeng, Q., Yu, Q., Ke, S., Li, X. HPLC method for the simultaneous determination of ten annonaceous acetogenins after supercritical fluid CO₂ extraction. *International Journal of Biomedical Science*. 2010 6(3), 202-207.
- [19]. Rizvi, S. S., Benado, A. L., Zollweg, J. A., & Daniels, J. A. (1986). Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods. *Food technology*. 40 (6), 55.
- [20]. Smith, R., Inomata, H., & Peters, C. (2013). *Introduction to supercritical fluids: a spreadsheet-based approach* (Vol. 4). Newnes.
- [21]. De Fillipi, R. P. y MOSES, J.M. (1982). Extraction of Organics from Aqueous Solutions using Critical Fluid Carbon Dioxide. Proc. 4th Symp. Biotech. In Energy Production and Conservation, C.D. Scott, eds. John Wiley & Sons, New York, NY. 206.
- [22]. Wach, F. (1994). The Expanding Horizons of SFE and SFC. *Analytical Chemistry*, 66(6), 369.
- [23]. Fernández Álvarez, M. (2009). Estudio del comportamiento fotoquímico y determinación de compuestos fitosanitarios en matrices medioambientales y agroalimentarias mediante técnicas avanzadas de extracción y microextracción. Univ Santiago de Compostela. 85-87.
- [24]. Braga, M. E., Costa, V. P., Pereira, M. J., Fiadeiro, P. T., Gomes, A. P. A., Duarte, C. M., & de Sousa, H. C. (2011). Effects of operational conditions on the supercritical solvent impregnation of acetazolamide in Balafilcon A commercial contact lenses. *International journal of pharmaceutics*, 420(2), 231-243.
- [25]. Varona, S., Rodríguez-Rojo, S., Martín, Á., Cocero, M. J., & Duarte, C. M. (2011). Supercritical impregnation of lavandin (*Lavandula hybrida*) essential oil in modified starch. *The journal of supercritical fluids*, 58(2), 313-319.

- [26]. Braga, M. E., Pato, M. T. V., Silva, H. S. C., Ferreira, E. I., Gil, M. H., Duarte, C. M., & de Sousa, H. C. (2008). Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivatives. *The Journal of Supercritical Fluids*, 44(2), 245-257.
- [27]. Santacruz-Vázquez, C., & Santacruz-Vázquez, V. (2015). The spatial distribution of β -carotene impregnated in apple slices determined using image and fractal analysis. *Journal of food science and technology*, 52(2), 697-708.
- [28]. Radziejewska-Kubzdela, E., Biegańska-Marecik, R., & Kidoń, M. (2014). Applicability of vacuum impregnation to modify physico-chemical, sensory and nutritive characteristics of plant origin products—a review. *International journal of molecular sciences*, 15(9), 16577-16610.
- [29]. Champeau, M., Thomassin, J. M., Tassaing, T., & Jérôme, C. (2015). Drug loading of polymer implants by supercritical CO₂ assisted impregnation: a review. *Journal of controlled release*, 209, 248-259.
- [30]. Sanchez-Sanchez, J., Fernández-Ponce, M. T., Casas, L., Mantell, C., & de la Ossa, E. M. (2017). Impregnation of mango leaf extract into a polyester textile using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*.
- [31]. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- [32]. Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food chemistry*, 112(3), 654-658.
- [33]. Liang, N., & Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*, 19(11), 19180-19208.
- [34]. Mahon, C. R., Lehman, D. C., & Manuselis, G. (2014). *Textbook of Diagnostic Microbiology-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- [35]. McFarland, J. (1907). The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 49(14), 1176-1178.
- [36]. Kalidindi, N., Thimmaiah, N. V., Jagadeesh, N. V., Nandeep, R., Swetha, S., & Kalidindi, B. (2015). Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. Leaves. *journal of food and drug analysis*, 23(4), 795-802.
- [37]. Gavamukulya, Y., Abou-Elella, F., Wamunyokoli, F., & AEI-Shemy, H. (2014). Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7, S355-S363.
- [38]. de CC Pinto, N., Campos, L. M., Evangelista, A. C. S., Lemos, A. S., Silva, T. P., Melo, R. Ch., ... & Fabri, R. L. (2017). Antimicrobial *Annona muricata* L.(soursop) extract targets the cell membranes of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Industrial Crops and Products*, 107, 332-340.