



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Extracción por fluidos supercríticos de
Honokiol y Magnolol.**

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

I.B.Q. Guadalupe Rivera Ramírez

Asesores

Dr. José Alberto Monroy Rivera

Dr. Alejandro García Carrancá

Dra. Irma Fabiola Domínguez Avilés

Dr. Ascención Romero Martínez

H. Veracruz Ver.

Junio 2017

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios por darme la vida, estar en mi corazón y darme la fe necesaria para sobrellevar el día a día, por permitirme conocer personas que de alguna manera me dan lecciones y enseñanzas, aun sin ellos saberlo.

Al CONACYT por su apoyo económico que me brindó y que fue parte fundamental para mis estudios de maestría.

Quiero agradecer de manera muy especial a mis asesores y revisores de tesis, el Dr. José Alberto Monroy Rivera, la Dra. Fabiola Domínguez Avilés, el Dr. Alejandro García Carrancá, el Dr. Ascención Romero Martínez, el Dr. Andrés Antonio Acosta Osorio, el Dr. Gerardo Valerio Alfaro y el Dr. Marco Antonio Salgado Cervantes, por haberme concedido la oportunidad de comenzar este trabajo y por su confianza en mí para llevarlo a cabo, por transmitirme sus conocimientos, pues de ellos he aprendido todo durante este tiempo (y continúo aprendiendo), así como su apoyo incondicional en el ámbito personal.

Mi reconocimiento al Centro de Investigaciones Biomédicas de Oriente y al Instituto Nacional del Cáncer. A la M.C. Miriam Guido y a Carlos Cesar por su paciencia para la resolución de mis múltiples dudas, tanto técnicas como conceptuales y su disposición absoluta.

Gracias también al laboratorio de Ingeniería, al laboratorio de postcosecha y al laboratorio de café de UNIDA por los equipos prestados y las asesorías brindadas.

A mi esposo, a mi hijo y a mis padres por su amor, paciencia en todo momento y su apoyo incondicional, gracias Razi por darme fuerzas cuando flaqueo y a ti madre por esos abrazos que me devuelven el alma.

También al resto de personas con las que he compartido cada día como parte de mi familia, a Javier, Salma, Christopher, Dana, Jazmín y Chrystian, gracias por esos momentos tan alegres.

RESUMEN

Rivera Ramírez Guadalupe. M. en C. en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Junio de 2017. “ Extracción de Honokiol y Magnolol por fluidos supercríticos”. Asesores: Monroy Rivera, José Alberto, García Carrancá, Alejandro, Domínguez Avilés, Irma Fabiola, Romero Martínez, Ascensión.

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial. Debido a que los tratamientos actuales tienen efectos colaterales, se han desarrollado estudios con biomoléculas extraídas de plantas para determinar su actividad anticancerígena. Entre ellas, el género *Magnolia* originaria de climas cálidos, que contiene diversos compuestos con bioactividad por lo que su uso en medicina herbolaria tiene múltiples aplicaciones donde la principal es su actividad contra el Cáncer, siendo el Honokiol (HKL) y Magnolol (MGL) las moléculas que poseen esta propiedad. Las técnicas de extracción usadas para extraer estas dos moléculas ha sido por maceración, extracción Soxhlet y por fluidos supercríticos (FSC), teniendo este último mayor selectividad y menores tiempos de extracción. Es por ello que el objetivo de ésta investigación fue estudiar la extracción de HKL y MGL con fluidos supercríticos.

Inicialmente se llevó a cabo una extracción Soxhlet de hojas de *Magnolia grandiflora* seca y molida para determinar si contenía HKL y MGL. En el Centro de Investigaciones Biomédicas de Oriente (CIBIOR) se establecieron las condiciones de extracción, analizando los extractos obtenidos en Cromatografía Líquida de ultra alta resolución (UPLC), posteriormente se replicó la metodología en Unidad de Investigación en Alimentos (UNIDA) y se analizó el extracto en Cromatografía de alta resolución (HPLC), dando ambos resultados como presencia a nivel traza de HKL y MGL.

Se llevó a cabo una evaluación de la solubilidad de estas dos moléculas en CO₂ supercrítico utilizando un extracto comercial con concentraciones conocidas de HKL y MGL en una solución con etanol y con algodón como matriz de soporte. Se efectuó una cinética de extracción a las condiciones reportadas previamente (20 MPa y 45°C) estableciendo a 30 minutos como tiempo de extracción. Posteriormente se determinaron las condiciones óptimas de extracción con CO₂ supercrítico+etanol (5%) utilizando hoja de *Magnolia grandiflora* en polvo adicionada con una concentración conocida de HKL y MGL. Estas condiciones fueron puestas de acuerdo a un Diseño Experimental Central Compuesto 2². El punto central inicial fue el establecido con una primera superficie de respuesta cuyas condiciones son 20 MPa y 45°C. El análisis de superficie de respuesta determinó las condiciones óptimas (P=23.15 MPa y 33.8°C) en función de la eficiencia de extracción, obteniendo 96% para Magnolol y 80% para Honokiol. Además, se concluye que las hojas de *Magnolia grandiflora* evaluadas no poseen HKL y MGL en concentraciones cuantificables. Es necesario el uso de etanol (5%) como codisolvente en la extracción con FSC.

ABSTRAC

Rivera Ramírez Guadalupe. M. en C. en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Junio de 2017. "Extracción de Honokiol y Magnolol por fluidos supercríticos". Asesores: Monroy Rivera, José Alberto, García Carrancá, Alejandro, Domínguez Avilés, Irma Fabiola, Romero Martínez, Ascención.

Cancer is the leading cause of death worldwide. Because current treatments have side effects, studies on biomolecules extracted from plants have been developed to determine their anticancer activity. Among them, the genus *Magnolia* native from warm climates, which contains several compounds with bioactivity, so its use in herbal medicine has multiple applications where the main is its anti-cancer activity, being Honokiol (HKL) and Magnolol (MGL) the molecules that possess this property. The extraction techniques used to extract these two molecules have been by maceration, Soxhlet extraction and by supercritical fluids (FSC), the latter having greater selectivity and shorter extraction times. In view of the above the objective of this research was to study the extraction of HKL and MGL using supercritical fluids.

Initially, a Soxhlet extraction of dried and grinded *Magnolia grandiflora* leaves was carried out to determine if it contained HKL and MGL in the Centro de Investigaciones Biomédicas de Oriente (CIBIOR) the extraction conditions were established, analyzing the extracts obtained in Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC), later the methodology was replicated at Unidad de Investigación en Alimentos (UNIDA) and the extract was analyzed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), giving both results as a trace level the presence of HKL and MGL.

An evaluation of the solubility of these two molecules in supercritical CO₂ was carried out using a commercial extract with known concentrations of HKL and MGL in a solution with ethanol and with cotton as a support matrix. Extraction kinetics experiments were carried out at the previously reported conditions (20 MPa and 45 °C), set to 30 minutes as extraction time. The optimal extraction conditions were then determined with supercritical CO₂ + ethanol (5%) using magnolia leaf powder added with a known concentration of HKL and MGL. These conditions were set according to a Composite Central Experiment Design 2². The initial center point was that established with a first response surface whose conditions were 20 MPa and 45 °C. Response surface analysis determined optimal conditions (P =23.15 MPa and 33.8 °C) as a function of extraction efficiency, obtaining 96% for Magnolol and 80% for Honokiol. It is also concluded that *Magnolia grandiflora* leaves do not have HKL and MGL at quantifiable concentrations. The use of ethanol (5%) as cosolvent in the FSC extraction is necessary.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1. Cáncer.....	3
1.2. Género <i>Magnolia</i>	4
1.3. <i>Magnolia grandiflora</i>	6
1.4. Fluidos supercríticos	9
1.5. Solubilidad.....	11
1.6. Dióxido de carbono	13
1.7. Cosolventes	16
1.8. Extracción de compuestos bioactivos usando fluidos supercríticos.....	17
1.9. Citotoxicidad de <i>Magnolia</i>	19
1.10. Ensayos de proliferación celular.....	20
2. JUSTIFICACIÓN.....	21
3. HIPÓTESIS.....	22
4. OBJETIVOS.....	23
4.1. Objetivo general.....	23
4.2. Objetivos específicos	23
5. METODOLOGÍA.....	24
5.1. Validación del equipo de fluidos supercríticos.....	25
5.2. Obtención de extractos crudos de <i>Magnolia</i> por Soxhlet.....	26
5.3. Extracción con fluidos supercríticos	27
5.4. Extracciones con concentración conocida.....	28
5.5. Extracción con algodón.....	28
5.6. Extracción de Honokiol y Magnolol en hojas de <i>Magnolia grandiflora</i>	29
5.7. Cuantificación del extracto obtenido.....	29
5.8. Determinación de Honokiol y Magnolol	29

5.9.	Establecimiento de la curva estándar de Honokiol y Magnolol	30
5.10.	Ensayos de proliferación celular	30
6.	RESULTADOS	32
6.1.	Resultados de validación del equipo de Fluidos supercríticos	32
6.2.	Análisis preliminares en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Oriente.....	33
6.3.	Resultados de extracción convencional	34
6.4.	Curva de calibración Honokiol y Magnolol.....	35
6.5.	Cinética de extracción de Honokiol y Magnolol	36
6.6.	Resultados de extracción de Honokiol y Magnolol con muestra conocida	37
6.6.1.	Extracción con algodón.....	37
6.6.2.	Extracción de Honokiol y Magnolol en hoja de <i>Magnolia grandiflora</i>	38
6.7.	Ensayos de proliferación celular	43
7.	CONCLUSIONES.....	47
8.	RECOMENDACIONES	48
9.	BIBLIOGRAFÍA	49
	APENDICE A.....	54

LISTA DE TABLAS

TABLA 1.1 Densidad, viscosidad y Difusividad de los fluidos	9
TABLA 1.2. Condiciones de Presión y Temperatura Crítica de algunas sustancias	10
TABLA 5.1. Características de operación del equipo de Fluidos supercríticos	26
TABLA 5.2. Primer diseño experimental para optimizar el proceso de extracción supercrítica.	28
TABLA 5.4. Codificación con la dilución utilizando DMSO y DMEM	30
TABLA 5.5. Codificación en las charola inoculadas con las células MDA y los diferentes extractos. ..	31
TABLA 6.1. Miligramos de cafeína extraídos con CO ₂ supercrítico.	33
TABLA 6.2. Condiciones de operación del sistema Soxtherm para la extracción de Honokiol y Magnolol.	34
TABLA 6.3. Resultados de extracción supercrítica de Honokiol y Magnolol, utilizando algodón como matriz de extracción	37
TABLA 6.4. Segundo diseño experimental para optimizar el proceso de extracción supercrítica.	40
TABLA 6.5. Miligramos de Honokiol y Magnolol óptimos teóricos y experimentales de los dos diseños experimentales	42
TABLA. 6.6. Lectura a las 24 horas.	44
TABLA. 6.7. Lectura a las 48 horas.	44

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Estructuras químicas de Honokiol (a) y Magnolol (b)	5
FIGURA 1.2. Estructura química de magnocurarina. Fuente: Ogiu <i>et al.</i> , 1952.	6
FIGURA 1.3. Estructura química de Partenolido (a) y Costunolido (b).....	6
FIGURA 1.4. (a) Flores, (b) hojas y (c) fruto de <i>Magnolia grandiflora</i>	7
FIGURA 1.5. Compuestos de magnolia grandiflora. (a) Estructura de Sesquiterpenoides, (b) Estructura de Cumarinas. Fuente: Arango, 2010.	7
FIGURA 1.6. Estructura química de Vulgarenol. Fuente: Del Valle <i>et al.</i> , 2007.....	7
FIGURA 1.7. Diagrama de Fases	9
FIGURA 1.8. Comportamiento de la solubilidad de naftaleno en CO ₂ supercrítico a tres diferentes temperaturas en función de: (a) densidad y (b) presión.	12
FIGURA 1.9. (a) Solubilidad de cafeína en CO ₂ supercrítico a diferentes presiones y temperaturas. (b) Influencia de la temperatura sobre el rendimiento a 300 bar. (c) Influencia de la presión sobre el rendimiento a 373 K.	13
FIGURA 1.10. Flujo de extracción para sólidos en un extractor de fluidos supercríticos.....	16
FIGURA 1.11. Estructura química de Taxol.....	18
FIGURA 1.12. Estructura química de Oxindol.	18
FIGURA 1.13. Metabolización de MTT a Sales de formazán.	20
FIGURA 5.1. Procesamiento de la materia prima. a) Lavado de hojas de magnolia, b) secado a temperatura ambiente, c) hojas secas antes de ser trituradas y d) trituración de las hojas.	24
FIGURA 5.2. Diagrama general de extracción con fluidos supercríticos de Magnolol y Honokiol	25
FIGURA 5.3. Extractor de fluidos supercríticos.	26
FIGURA 5.4. Equipo de extracción Soxhlet.	27
FIGURA 5.5. Lectura de Charola de 96 pozos con MTT en espectrofotómetro Epoch.....	31
FIGURA 6.1. Curva de calibración de cafeína.	32
FIGURA 6.2. Cromatograma del extracto de <i>Magnolia grandiflora</i> . No se observan los picos de Honokiol y Magnolol en los tiempos de retención de 4.3 y 5.3 minutos respectivamente	34
FIGURA 6.3. Curva de calibración de Honokiol (a) y de Magnolol (b).	35
FIGURA 6.4. Cromatograma de mezcla de estándares de Honokiol y Magnolol.	36
FIGURA 6.5. Cinética de extracción de Honokiol y Magnolol con CO ₂ supercrítico	36
FIGURA 6.6. Valores óptimos dados por MINITAB 17 con puntos centrales de 20 MPa y 45°C.	38
FIGURA 6.7. Superficies de respuesta. a) Superficie de respuesta de Honokiol. b) Superficie de respuesta de Magnolol. Teniendo como punto central 20 MPa y 45°C.	39

FIGURA 6.8. Superficie de respuesta de Honokiol (a) y de Magnolol (b). Teniendo como punto central Presión de 24.3 MPa y 35°C	41
FIGURA 6.9. Valores óptimos dados por MINITAB 17 con puntos centrales de 24.3 MPa y 35°C.	42
FIGURA 6.10. Cromatogramas obtenidos del equipo HPLC de extracto Soxhlet y de extracto de fluidos supercríticos.	43
FIGURA 6.11. Fotografías en el microscopio óptico a 20X y a 100X de las células MDA con el extracto de fluidos supercríticos a 5, 25, 50, 100 y 200 µg/ml.	45
FIGURA 6.12. Densidades ópticas de los extractos. Concentración (5, 25, 50, 100 y 200 µg/ml) en el eje X y densidad óptica en el eje Y, a las 24 y 48 horas de incubación con el ensayo MTT.	46
FIGURA A1. Llenado de charola con 96 pozos.	55
FIGURA A2. Se aspira el medio DMEM antes de agregar MTT	56
FIGURA A3. Se agrega MTT en charolas de 96 pozos.	56
FIGURA A4. Lectura de Charola de 96 pozos con MTT en espectrofotómetro Epoch.	57

ABREVIATURAS

PBS: Buffer de Fosfato Salino

DMEM: Medio Dulbecco's modified Eagle's

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidad óptica

GLC: Ganglio linfático centinela

HCT: Células Hematopoyéticas

HKL: Honokiol

HPLC: Cromatografía Líquida de alta resolución

INECOL: Instituto Nacional de Ecología

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y geografía

IC₅₀: Concentración de inhibición del 50% de las células

ITV: Instituto Tecnológico de Veracruz

MDA: Células de cáncer de mama

MGL: Magnolol

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetilazol-2 il)-2,5-difenil tetrazolio NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido o Metil Tiazol tetrazolio.

OMS: Organización Mundial de la salud.

PC: Punto Critico

PT: Punto Triple

UNIDA: Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos

UPLC: Cromatografía Líquida de ultra alta resolución

INTRODUCCIÓN

El Cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial, se le atribuyen 8.2 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo en 2012 siendo los más importantes el pulmonar, el hepático, el gástrico, el colo-rectal, el mamario, el cáncer de esófago y el cervicouterino (OMS, 2015). En los últimos años, se ha optado por buscar compuestos de origen natural que reduzcan o en el mejor de los casos desaparezcan los efectos de esta enfermedad. Es por ello que se han realizado múltiples estudios sobre bioactividad de diversas plantas y se han encontrado moléculas que presentan actividad anticancerígena. (Cragg *et al.*, 2005; Villavicencio *et al.*, 2008); Uscanga, 2014; Cárdenas *et al.* 2012; Aravind, 2012; Kumarasamy *et al.*, 2014; Palos, 2007; Fei *et al.*, 2015; Khaizil *et al.*, 2013; Padilla *et al.*, 2008; Moo *et al.*, 2014; Domínguez *et al.*, 2009; Azab *et al.*, 2013; Manu *et al.*, 2014).

Debido al incremento en el interés de los compuestos bioactivos, se han desarrollado diferentes técnicas de extracción que mejoren el aislamiento y rendimiento de las moléculas activas, entre ellas la extracción por fluidos supercríticos (Esquivel *et al.*, 2007). Se ha planteado la extracción por CO₂ supercrítico como un método para extraer compuestos con actividad anticáncer, ya que permite reducir tiempos de extracción y purificación (Pereira *et al.*, 2010).

También se han realizado evaluaciones sobre los rendimientos en la extracción de fluidos supercríticos con extractos de plantas con probada actividad citotóxica sobre células cancerígenas. (Jennings *et al.*, 1992; López *et al.*, 1997; Leal *et al.*, 2003; Qiang Wu *et al.*, 2014).

Dentro de las plantas que tienen mayor importancia en los estudios sobre diferentes tipos de cáncer, se encuentra la *Magnolia grandiflora* que pertenece a la familia de las magnoliácea. Son árboles perennifolios de 3 a 15 m de altura con un diámetro de 10 a 40 cm, con hojas ovadas u oblanceoladas, de color verde claro brillante, de 7 a 21 cm de largo por 3 a 9 cm de ancho (Hernández, 1980). Los compuestos que se pueden encontrar en esta planta son sesquiterpenos, cumarinas, fenilpropanoides, glicosidos y alcaloides. Entre los que se puede mencionar cuatro compuestos importantes por su bioactividad: el Verlotorin, el peroxipartenolido, el Honokiol y Magnolol. Estos dos últimos compuestos, tienen una actividad importante y diversa; como la antioxidante, anti-inflamatoria, antitumoral, antidiabética, antineurodegenerativa, antidepresiva, control del dolor, control hormonal, gastrointestinal y modulador uterino, antimicrobiano, modulador cardiovascular y protector del hígado (Lim, *et al.*, 2014).

El Honokiol y Magnolol como compuestos bioactivos, se han extraído por fluidos supercríticos a partir de corteza de *Magnolia* y por medio de cromatografía acoplada a fluidos supercríticos se llevó a cabo la identificación de las moléculas (Suto, *et al.*, 1997).

Uno de los principales problemas que se presentan con el aislamiento de compuestos activos, en plantas, es la separación y purificación, ya que son tediosas; es por esto que en la búsqueda de alternativas para una extracción limpia y eficiente de compuestos bioactivos en plantas, este trabajo se propone mostrar que usando fluidos supercríticos se puede obtener una separación eficiente de Honokiol y Magnolol, con respecto a una extracción convencional.

1. ANTECEDENTES

1.1. Cáncer

El término Cáncer, se designa al crecimiento descontrolado de células anormales en el cuerpo, formando tumores. Algunas líneas celulares tienen la capacidad de invadir otros órganos del cuerpo, mediante el proceso de metástasis. El cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial, se le atribuyen 8.8 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo en 2015. Dentro de los principales tipos de cáncer se tienen al pulmonar, hepático, gástrico, colon-rectal, Mamario, cáncer de esófago y cervicouterino. (OMS, 2017).

En México de acuerdo a las estadísticas del INEGI hasta el año 2013, se tiene que el cáncer de órganos hematopoyéticos es la principal causa de morbilidad hospitalaria por tumores malignos en población de 0 a 19 años, de la cual el 62% son mujeres y el 58.7% son hombres. Con respecto a la tasa de letalidad hospitalaria por tumores malignos, aumenta conforme se incrementa la edad y llega a 20.99 de cada 100 personas. Siendo el cáncer de mama el más frecuente en caso de las mujeres y el de órganos digestivos en hombres.

El descubrimiento de nuevas sustancias a partir de plantas con actividad terapéutica constituye una meta de la humanidad. El reino vegetal contiene un enorme potencial de moléculas por descubrir, se estima que más del 90 % de las especies no han sido estudiadas. La naturaleza ha demostrado ser una fuente importante de compuestos anticancerígenos efectivos; por ejemplo drogas derivadas de microorganismos y de plantas. Los productos naturales representan el 50 % de las drogas de uso clínico en países desarrollados, el 25 % de los cuales derivan de plantas superiores (Téllez *et al.*, 2004). En los países en desarrollo el uso de plantas medicinales representa alrededor de 80 % del arsenal terapéutico (Sharapin, *et al.*, 2000).

Las plantas tienen una larga historia de uso en el tratamiento del cáncer, aunque muchas de las demandas para la eficiencia de tal tratamiento deben verse con algún escepticismo porque el cáncer es definido pobremente en la medicina tradicional.

En este sentido, se efectuó un estudio sobre bioactividad anticancerígena de plantas, reportando que *Catharanthus roseus* la cual es usada por varias culturas para el tratamiento de diabetes, presenta los alcaloides Vinblastina y Vincristina, que, son compuestos activos usados en el tratamiento de la leucemia, linfomas, cáncer testicular, mama y pulmón; Esta droga fue descubierta durante una investigación de la planta como un recurso potencial como agente hipoglicemiante; por consiguiente, su descubrimiento puede ser atribuido indirectamente a la observación de un uso medicinal de la planta. Así también reportan actividad en extractos de *Podophyllum peltatum* de donde se extrajo su principio activo, la Podofilotoxina. Usado para el tratamiento de linfomas, cáncer bronquial y testicular.

Además, uno de los compuestos más usados actualmente en la terapéutica de la quimioterapia, es el Taxol® (Paclitaxel), obtenido de *Taxus brevifolia* y del cual se tienen diversos estudios. Del extracto de *Campotheca acuminata* se obtuvo camptotecina y sus derivados que son usados para cáncer de vejiga, ovario y cáncer colon-rectal. Igualmente, se tiene que homoharrintonina aislada de *Cephalotaxus harringtonia* es usada contra leucemia y cáncer de mama (Cragg *et al.*, 2005). Estos autores concluyen que las plantas tienen alta efectividad en el tratamiento con distintas formas de cáncer mostrando especificidad tumoral y haciendo énfasis en más investigación sobre bioactividad de extractos. A este respecto, se han realizado varios estudios sobre compuestos bioactivos de extractos de plantas mexicanas que son fuente potencial de bioactivos, por mencionar algunas, entre estas se encuentra: Duraznillo o mala mujer (*Solanum rostratum*), la hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala*), Chaya (*Cnidioscolus chayamansa*), Rambutan (*Nephelium lappaceum*), Huaya (*Melicoccus bijugatus*), Tlanchichinole (*Moussonia deppeana*), Framboyan (*Delonix regia*), Tamarindo (*Tamarindus indica*). (Villavicencio *et al.*, 2008; Uscanga, *et al.*, 2014; Cárdenas *et al.*, 2012; Aravind *et al.*, 2012; Kumarasamy *et al.*, 2014; Palos, *et al.*, 2007; Fei *et al.*, 2015; Khaizil *et al.*, 2013; Padilla *et al.*, 2008; Moo *et al.*, 2014; Domínguez *et al.*, 2009; Azab *et al.*, 2013; Manu *et al.*, 2014).

1.2. Género *Magnolia*

Los árboles y arbustos de la familia Magnoliaceae son de gran interés para la humanidad, puesto que, al parecer, las primeras angiospermas (plantas con flor) presentaron una flor tipo *Magnolia*, y por consiguiente se consideran como las plantas con flor más primitivas. Además, la cautivante belleza de sus flores, el uso de sus maderas y la presencia de compuestos potencialmente medicinales hacen de estas especies un material muy apreciado en sus países de origen (Serna *et al.*, 2010).

En el mundo existen cerca de 240 especies de magnolia y aproximadamente la mitad se encuentran amenazadas. El país con mayor número de especies es China (Serna *et al.*, 2010).

En la medicina tradicional China se reportan las flores de la especie *Magnolia officinalis* como tratamiento de la congestión nasal y los dolores causados por sinusitis. La corteza de esta planta se describe como una droga amarga, caliente y no tóxica. Ha sido empleada para tratar jaquecas, resfriados y constipaciones respiratorias. En México, la especie *Magnolia mexicana* se considera con alto valor medicinal por las comunidades de Puebla, Veracruz, Guerrero y Chiapas; y se le conoce con el nombre de “yolloxochitl” que significa “flor del corazón”, aludiendo a sus aplicaciones en medicina tradicional. Se administra con cacao para el fortalecimiento del corazón y estómago (Serna *et al.*, 2010).

Hay diversos estudios sobre *magnolias*, de las cuales se han obtenido extractos con diversos compuestos de interés. Los compuestos que se han reportado en esta planta son sesquiterpenoides, cumarinas, fenilpropanoides, glicosidos y alcaloides. Contiene dos compuestos aislados con actividad citotóxica como el Verlotrin y el peroxipartenolide, así como el Honokiol (3´5-di-2-propenil-(1,1´-

bifenil)-2,4'-diol) y Magnolol (5'-di-2-propenil-(1,1'-bifenil)-2,2'-diol) (Figura 1.1). Estos dos compuestos son isómeros estructurales derivados del ácido shikímico, con un peso molecular de 266.334 g/mol, para los cuales se han determinado diversas actividades farmacológicas como antioxidante, anti-inflamatoria, antitumoral, antidiabética, antineurodegenerativa, antidepresiva, control del dolor, control hormonal, modulador gastrointestinal, modulador uterino, antimicrobiano, modulador cardiovascular y hepatoprotector (Cragg *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2014; Chiang *et al.*, 1994; Hoi *et al.*, 2010).

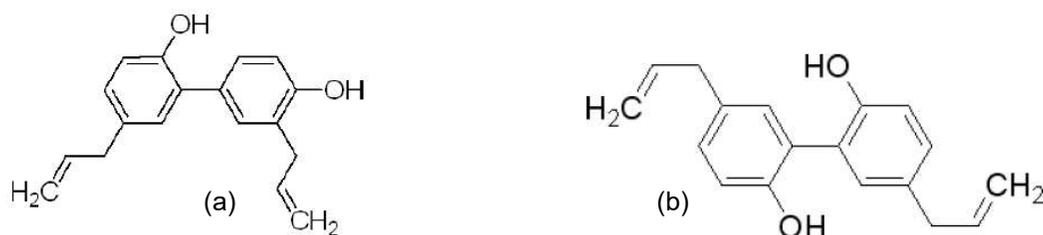


FIGURA 1.1. Estructuras químicas de Honokiol (a) y Magnolol (b)

El género *Magnolia* registra rendimientos de magnolol y honokiol de hasta 10.85 mg/g y 4.51 mg/g respectivamente, en extractos obtenidos por extracción mediante vía tradicional con disolventes (Xie *et al.*, 2011).

Magnolol y Honokiol muestran actividad contra cáncer de hígado, ovario, mama, leucemia, cervicouterino, cáncer de piel, además de tener actividad antiviral (probado en virus de hepatitis C, virus de Epstein Barr y poliovirus), también poseen actividad antimicrobiana, principalmente contra bacterias Gram positivas y hongos (Lim *et al.*, 2014; Jacyno *et al.*, 1991).

La magnocurarina (Figura 1.2), un alcaloide cuaternario obtenido de *M. obovata* posee actividad paralizante en los músculos de ratón con una potencia similar al curare. Algunos terpenoides obtenidos de *M. salicifolia* han demostrado actividad insecticida, en particular contra el mosquito *Aedes aegypti*, vector del dengue. El partenolido (figura 1.3a) es una especie sesquiterpenlactona, al igual que el costunolido (figura 1.3b) obtenida en especies nativas y fóreanas de magnoliáceas y posee una gran actividad contra el parásito *Leishmania amazonensis*, causante de la leishmaniosis. También ha demostrado poseer actividad inhibitoria frente al bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Serna *et al.*, 2010).

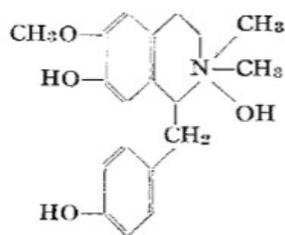


FIGURA 1.2. Estructura química de magnocurarina. Fuente: Ogiu *et al.*, 1952.

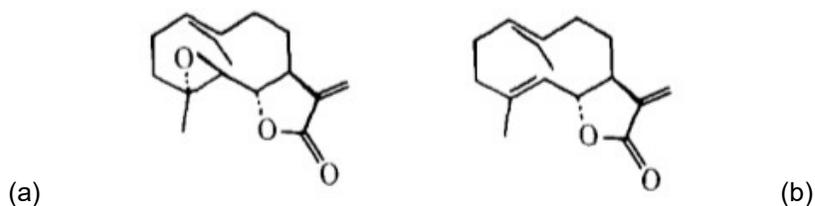


FIGURA 1.3. Estructura química de Partenolido (a) y Costunolido (b).
Fuente: Feraly *et al.*, 1977.

1.3. *Magnolia grandiflora*

Magnolia grandiflora es una planta que pertenece a la familia de las magnoliaceae, se distribuye principalmente en el centro y sureste de la República Mexicana, son árboles perennifolios de 3 a 15 m de altura; diámetro de 10 a 40 cm; corona irregular; corteza externa, pardo-verdusca, ligeramente fisurada; ramas negro-tomentosas en los ápices, lenticelas de 0.5 a 1.5 mm de longitud en la superficie restante, cicatrices circundantes en cada nudo. Hojas ovadas u oblanceoladas, de color verde claro brillante, de 7 a 21 cm de largo por 3 a 9 cm de ancho, coriáceas, glabras en el haz, densamente tomentosas en el envés, el margen entero, el ápice agudo, la base aguda o acuminada, con olor fragante cuando son estrujadas; pecíolo de 1 a 3 cm de largo, tomentoso (pelos cortos) sólo en el ápice, el resto del indumento de color negro; estipulas libres, de 1.5 a 3 cm de longitud, lanceoladas, flores fragantes; 3.6 a 4.3 cm de longitud y tomentosas (Hernández, *et al.*, 1980).

El fruto es ovoide-cilíndrico de 7-10 por 4-5 cm, con un tono café pálido, conteniendo semillas rojas brillantes y ovoides de 1.4 por 0.6 cm (Lim *et al.*, 2014). En la figura 1.4 se puede observar las flores, hojas y frutos de *Magnolia grandiflora*.

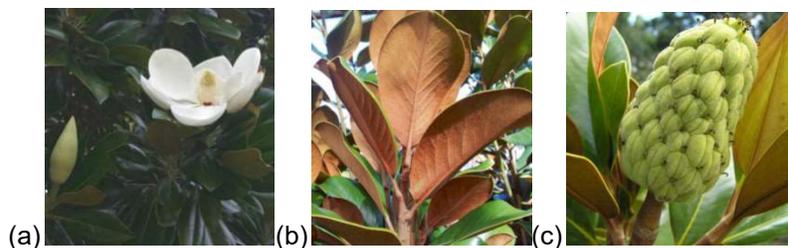


FIGURA 1.4. (a) Flores, (b) hojas y (c) fruto de *Magnolia grandiflora*.

Magnolia grandiflora contiene varias clases de compuestos como sesquiterpenoides (figura 1.5a), cumarinas (Figura 1.5), fenilpropanoides, lignanos, glicosidos, alcaloides y dos germacranolidos citotóxicos como el peroxicostunolido y peroxipartenolido (Lim *et al.*, 2014)).

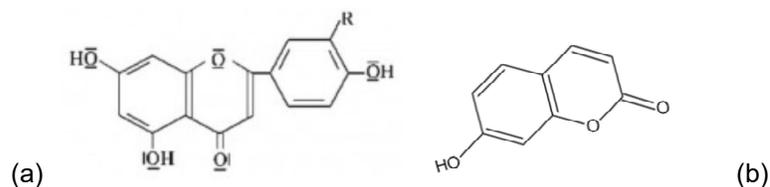


FIGURA 1.5. Compuestos de magnolia grandiflora. (a) Estructura de Sesquiterpenoides, (b) Estructura de Cumarinas. Fuente: Arango, 2010.

Las sustancias volátiles de las flores de *M. grandiflora* son principalmente monoterpenoides y sesquiterpenoides producidos a partir de la ruta del mevalonato; acetogeninas de la ruta del acetato-mevalonato y fenilpropanoides de la ruta del shikimato. Así como vulgarenol (figura 1.6) (Lim *et al.*, 2014).

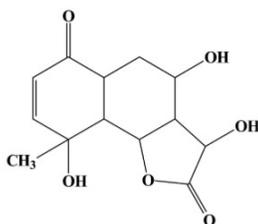


FIGURA 1.6. Estructura química de Vulgarenol [3,4,9- trihidroxi-9-metil-3a,5,5a,9,9a,9b,- hexahidronafto[1,2-b]furan-2,6(3H,4H)-diona]. Fuente: Del Valle *et al.*, 2007.

En las semillas se ha encontrado 5 neolignanos, los cuales son Honokiol, Magnolol, 4-O-metilhonokiol, 5,5'- di- 2- propenil-3-metoxi-[1,1'-bifenil]-2,2'-diol (4) y lignano de grandiflora (4 α , 9 β - dihidro-9,9 β -di-2-propenil (4H)-dibenzofuran-3-ona) (Lim *et al.*, 2014).

En las hojas se han encontrado los alcaloides anonaina, liriodenina, magnoflorina y lanuginosina. Así como sesquiterpenos de lactona los cuales son costunolido, partenolido y dieposido de costunolido. Tres sesquiterpenoides son aislados y determinados de las hojas como 6 α , 11-dihidroxi-12, 13-diacetoxielem-1,3, dieno; 4 α , 6 α , 10 α -trihidroxi, 13-diacetoxiguaia-11-ene; y 12,13-diacetoxi-guiaia-4 α , 6 α ,10 α , 11-tetraol, conocidos como sesquiterpenoides magnograndiolidos (Lim *et al.*, 2014).

Los compuestos volátiles dominantes en las hojas de magnolia grandiflora son β -elemina, α -bisaboleno, bicogermacrona, cariofilona, γ -cadinona y 4-8-dimetil 1-1, 3, 7- nonatrieno. Otros compuestos menores son β - mirceno, limoneno, geraniol, verbenona, furfural, β pinona y α - pinona. (Lim *et al.*, 2014).

Estudios celulares *in vitro* de semillas de *M. grandiflora*, incrementa la proliferación celular por mas 26% en ensayos con MTT. Demostrando su amplia actividad antioxidativa con diferentes rangos de concentraciones. Además se encontró que el Magnolol es 470 veces más potente que el α -tocoferol inhibiendo el consumo de oxígeno y 340 veces más potente inhibiendo la formación de malondialdehído, a su vez junto con Honokiol tienen 1000 veces más efecto antioxidante. Estudios sobre la actividad anti alérgica de *M. grandiflora* han mostrado que inhibe la producción de leucotrienos en ratas basofílicas, debido a la acción del Magnolol, así como su actividad antiséptica; con respecto a la actividad antitumoral se obtuvo un extracto de de hojas de *M. grandiflora* utilizando éter de petróleo, aislando partenolido principalmente teniendo actividad sobre líneas celulares de carcinoma, induciendo a apoptosis; un extracto etanólico de corteza inhibe el crecimiento de fibrosarcoma humano debido a la presencia de Honokol y Magnolol, siendo Honokiol el de mayor actividad contra células malignas, induciéndolas a apoptosis y el Magnolol inhibe la actividad de la caspasa y una baja toxicidad en células normales (Lim *et al.* 2014).

Magnolia grandiflora muestra actividad acticonvulsiva, antimicrobiana, actividad vasodilatador, relajante muscular, actividad cardioprotectora, actividad en la homeostasis del colesterol, actividad hepatoprotectora, neuroprotectora, protectora pulmonar, actividad antiplaquetaria, acntihipertensiva, antipirética, actividad ansiolítica, actividad fotoprotectora, actividad neurotrófica, antiosteoporótica, antiosteoclastogénica, actividad antitirosinasa o blanqueamiento de la piel, actividad larvícida, actividad contra riptosis, actividad antialérgica, mejora el sueño; y como medicina tradicional se usa como antidiarreico, dolor abdominal, artritis reumática, trastornos del corazón, hipertensión, epilepsia, infertilidad, inflamación y fiebre (Bastidas *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 2014; Clark *et al.*, 1980)

1.4. Fluidos supercríticos

Desde los años 70's y 80's, del siglo pasado, la extracción por fluidos supercríticos ha llamado considerablemente la atención para la obtención de compuestos de forma selectiva. Sus primeras aplicaciones fueron en el descafeinado del café de donde se ha obtenido gran información sobre la aplicación de esta técnica (Hendrick *et al.*, 1992).

Los estados de agregación de la materia que se conocen actualmente son cinco: sólido, líquido, gas, plasma y condensado de Bose-Einstein. Un fluido supercrítico es un cuasi-estado con propiedades intermedias entre líquidos y gases, como se aprecia en la tabla 1.1 (Vázquez, *et al.*, 2009).

TABLA 1.1 Densidad, viscosidad y Difusividad de los fluidos

Fluido	Densidad (g/ml)	Viscosidad (g/cm s)	Difusividad (cm ² /s)
Gas	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻¹
Líquido	1	10 ⁻²	10 ⁻⁶
Fluido supercrítico	0.2-0.9	10 ⁻⁴	10 ⁻³

En la Figura 1.7, se muestran las curvas de Fusión, sublimación y vaporización que indican las zonas de coexistencia en tres estados, el llamado punto triple (PT). El cambio de estado se asocia a un cambio brusco de densidad y para que se produzca, es necesario un aporte extra de energía denominado entalpía de cambio de estado. Pero por encima del punto crítico (PC) este cambio de densidad no se produce, por lo tanto, se podría definir este punto como aquel por encima del cual no se produce licuefacción al presurizar, ni gasificación al calentar, y por ende un fluido supercrítico es aquel que se encuentra por encima de dicho punto. (Vázquez, *et al.*, 2009)

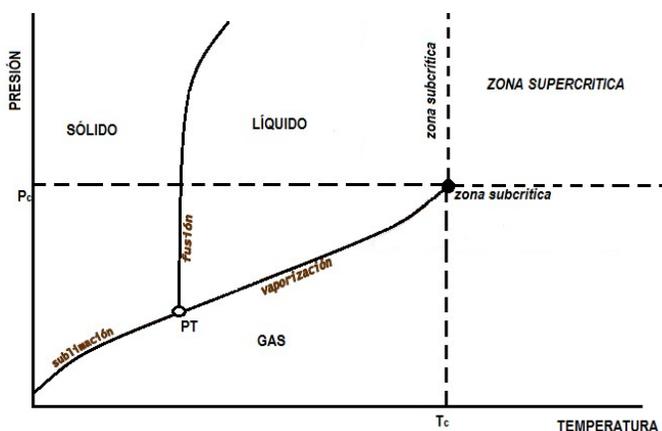


FIGURA 1.7. Diagrama de Fases

El punto crítico fue definido por primera vez en 1822 por el Barón Charles Cagniard de la Tour al observar que si un gas se calienta por encima de cierta temperatura (T_c), por más que se comprima este no alcanza el estado líquido. (Vázquez, *et al.*, 2009). Tanto el punto triple como el punto crítico son característicos de cada sustancia pura. En la tabla 1.2 se pueden ver las condiciones de presión y temperatura que definen el punto crítico de algunas sustancias (Montañés, 2009).

TABLA 1.2. Condiciones de Presión y Temperatura Crítica de algunas sustancias

Compuesto	Peso molecular (g/mol)	Presión crítica (bar)	Temperatura crítica (°C)	Densidad crítica (g/ml)
Dióxido de carbono	44.01	72	31.1	0.47
Agua	18.02	214.8	374.2	0.35
Amoniaco	17.03	109.8	132.5	0.23
Argón	39.95	48.6	-122.4	0.73
Acetona	58.08	47.0	235.0	0.28
Etanol	46.07	72.0	243.4	0.28
Metanol	32.04	78.9	239.0	0.27
Metano	16.04	46.0	-82.6	0.16
Etano	30.07	47.6	32.3	0.20
n-Propano	44.1	42.4	96.7	0.22
n-Butano	58.12	70.6	152.0	0.23
n-pentano	72.15	32.9	196.0	0.23
n-Hexano	86.16	30.1	234.2	0.23
Dimetiléter	46.07	52.6	126.2	0.26
Dietiléter	74.12	63.8	193.6	0.27
Piridina	79.10	56.3	347.0	0.31
Trifluoruro de metano	70.00	47.5	26.0	0.52
Clorotrifloruro de metano	104.00	39.5	28.9	0.58
Dioxido de nitrógeno	46.10	72.7	36.6	0.46
Hexafluoruro de azufre	146.00	38.2	45.7	0.73
Etileno	28.05	50.04	9.2	0.21
Propileno	42.08	46.0	91.7	0.23

De acuerdo con Vázquez (2009) las propiedades físicas de los fluidos como la viscosidad, la difusividad y la densidad, mostradas en la tabla 1.2 son las que más interesan cuando se llevan a cabo algunas de sus aplicaciones y estas propiedades se pueden controlar modificando las condiciones de presión y temperatura. Esto hace que los fluidos supercríticos tengan características muy atractivas como disolventes, especialmente por su poder de solvatación de moléculas no polares y poco polares, la posibilidad de modular este poder de solvatación y sus buenas propiedades de transferencia de masa como son:

-La densidad por encima del punto crítico depende básicamente de la presión y la temperatura, pero en cualquier caso está más cercana a la de los líquidos que a las de los gases. La densidad aumenta

si lo hace la presión a temperatura constante y si disminuye la temperatura a presión constante. Esta es la causa de sus buenas propiedades disolventes, ya que las interacciones entre las moléculas del fluido y las del soluto son fuertes. En las proximidades de la temperatura crítica de un fluido y las del soluto son fuertes. En las proximidades de la temperatura crítica de un fluido, el cambio en la densidad ocurre de forma rápida en un intervalo de presión pequeño, que hace difícil su control.

- La viscosidad es mucho más baja que la de los líquidos, lo que le confiere propiedades hidrodinámicas más favorables. Aunque la viscosidad aumenta rápidamente en la región crítica, su valor es un orden de magnitud inferior que el de los disolventes líquidos orgánicos, incluso a altas presiones (300-400 bar).

-La tensión superficial bajísima permite una alta penetrabilidad a través de sólidos porosos y lechos empacados. Estas características son importantes para otra de las aplicaciones de estos fluidos: su uso cromatográfico.

-Tienen valores de coeficientes de difusión intermedios entre los líquidos y los gases. Debido a estos mayores coeficientes de difusión junto a un menor valor de la viscosidad, los fluidos supercríticos son capaces de penetrar y difundir a través de matrices de muy diverso tipo, lo que les permite tener unas características de transferencia de materia mejores que las de los líquidos. Por esta razón, los procesos de extracción con este tipo de fluidos son más rápidos. En general, la difusividad en un fluido supercrítico (CO₂) aumenta con la temperatura y disminuye con la presión, y el coeficiente de difusión de un compuesto en un fluido supercrítico se reduce cuando se emplean modificadores debido a las interacciones entre el compuesto y el modificador, y entre el compuesto y el disolvente.

1.5. Solubilidad

El proceso por el cual un sólido se convierte en parte de una fase supercrítica puede ser descrita como vaporización en la medida en que las moléculas cambian de una fase condensada a una fase expandida, o bien como disolución dado que involucra interacciones soluto-solvente. Esta vaporización-disolución refleja la naturaleza intermedia entre líquido y gas del estado supercrítico (Zúñiga, 2006).

El comportamiento de la solubilidad en fluidos supercríticos se resume de la siguiente manera:

a) En general la solubilidad aumenta con el incremento de la densidad del solvente como se ilustra en la figura 1.8(a).

b) La solubilidad aumenta con el incremento de la presión. El incremento es muy marcado cerca del punto crítico del fluido supercrítico como resultado del cambio en la densidad del solvente. Este efecto se esquematiza en la figura 1.8 (b) para el caso del sistema CO₂+ naftaleno.

c) La solubilidad aumenta, permanece constante o bien disminuye con el incremento de la temperatura manteniendo la presión constante, dependiendo de que el factor predominante sea la presión de vapor del soluto o la densidad del solvente. A presiones bajas, la solubilidad disminuye ligeramente con la temperatura; por el contrario a altas presiones, se incrementa marcadamente con la temperatura. El primer efecto surge de la disminución en la densidad con la temperatura, mientras que el último efecto, que involucra la región densa, menos compresible, es el resultado de la presión de vapor del sólido. A cierta densidad del solvente, su solubilidad del sólido se incrementa con el aumento de temperatura.

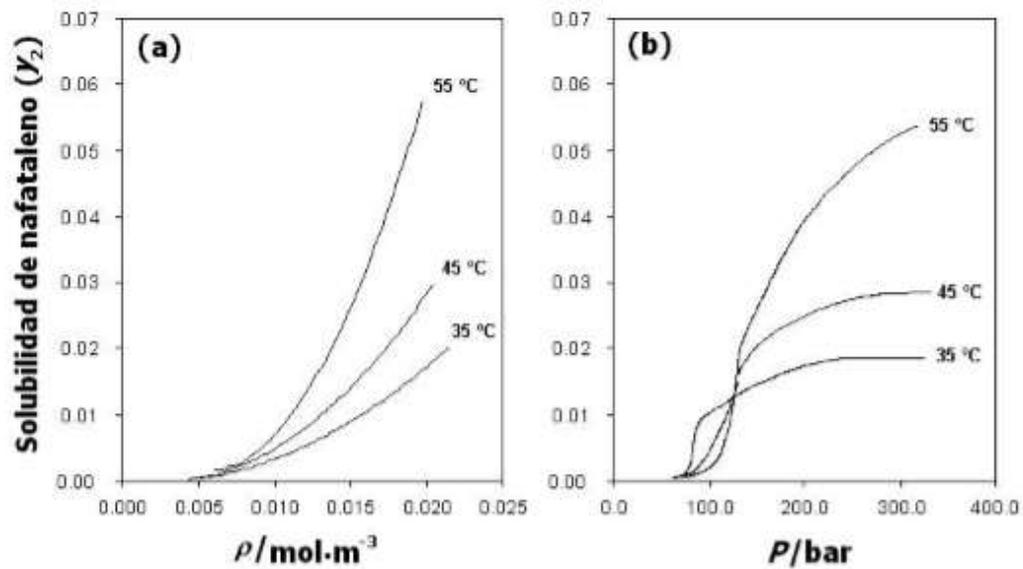


FIGURA 1.8. Comportamiento de la solubilidad de naftaleno en CO₂ supercrítico a tres diferentes temperaturas en función de: (a) densidad y (b) presión.

Estudios sobre la solubilidad de cafeína en CO₂ supercrítico indican que durante la extracción de cafeína de cáscara de café cereza hay una variabilidad en los rendimientos de extracción dependiente de las condiciones supercríticas de temperatura y presión, lo cual puede observarse en la figura 1.9 (Tello *et al.*, 2011).

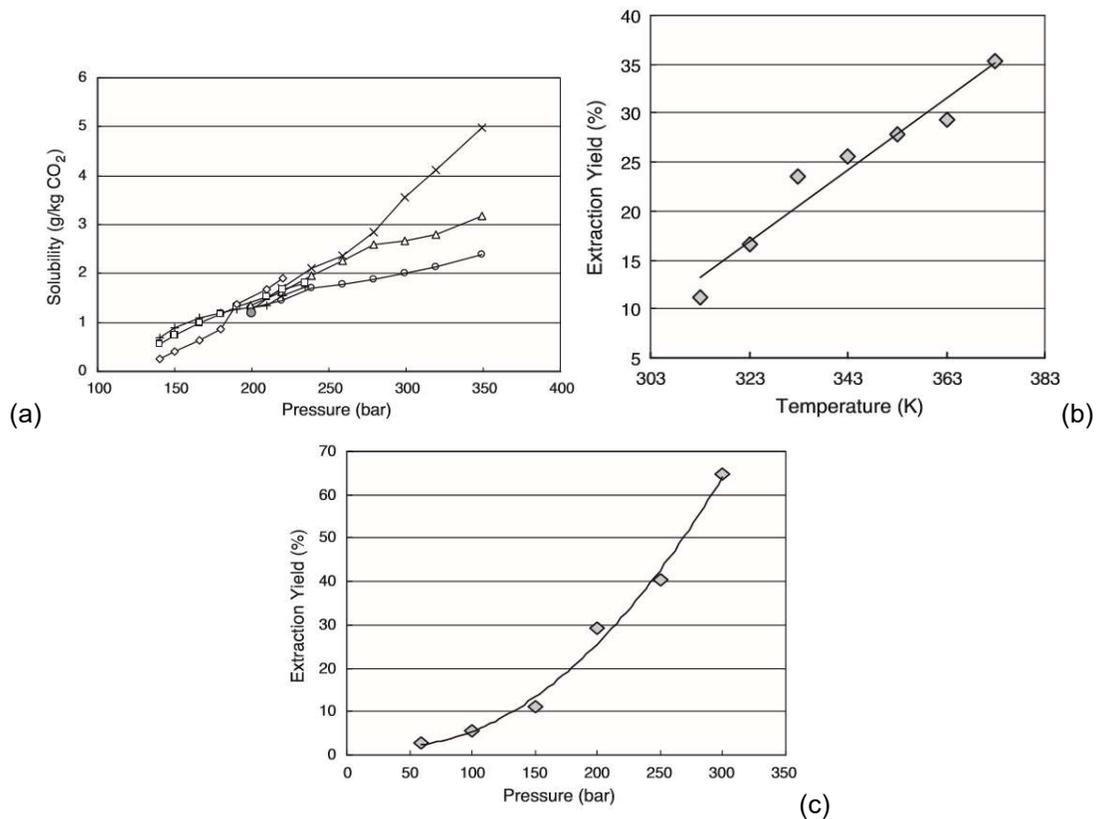


FIGURA 1.9. (a) Solubilidad de cafeína en CO₂ supercrítico a diferentes presiones y temperaturas. (b) Influencia de la temperatura sobre el rendimiento a 300 bar. (c) Influencia de la presión sobre el rendimiento a 373 K.

1.6. Dióxido de carbono

El dióxido de carbono presenta una serie de características que hacen que su uso sea ventajoso frente a otras sustancias ya que: No es tóxico, es inodoro, no es inflamable, no es corrosivo, no es oxidante, su costo es relativamente bajo, es fácilmente eliminable, prácticamente no deja residuo, baja tensión superficial, sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar, posee una densidad relativamente alta en un punto crítico y por ello, un poder de solvatación también alto (7.5 mol/kg en escala del parámetro de solubilidad), es comercial y se consigue con diferentes grados de pureza y esta admitido como un disolvente seguro (dentro de las buenas prácticas de manufactura) Vázquez (2009).

Por otra parte, Montañés (2009), remarcó que una limitación que presenta el CO₂ como fluido supercrítico es su carácter apolar, que le hace un disolvente poco adecuado para compuestos polares. Y que, además, la solubilidad en CO₂ también va siendo menor a medida que aumenta el peso molecular de los compuestos a disolver. Pero esta característica puede no ser una desventaja, ya que

confiere una mayor selectividad en la extracción de compuestos y más posibilidades en el fraccionamiento de los mismos.

El método experimental más utilizado es el dinámico de semiflujo empleando técnicas de análisis de muestras diversas, como son gravimetría, cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y espectrometría de ultravioleta (Zúñiga *et al.*, 2006).

Esquivel *et al.*, 2007, realizaron una recopilación de información donde se evaluó la variación de las propiedades funcionales de un compuesto después de ser extraído por fluidos supercríticos y compararon las ventajas y limitaciones de diferentes extracciones (tabla 1.3), reportan que los compuestos mantienen sus propiedades funcionales y obtienen mejores resultados con cromatografía líquida de alta resolución.

En la figura 1.10, se muestra un proceso de extracción de sólidos con fluidos supercríticos, donde se observa la dirección del flujo para la extracción con el gas, es decir el disolvente fluye a través de un lecho fijo de partículas sólidas y disuelve el componente sólido extraíble, después el disolvente se alimenta al extractor seguido del precipitador (la dirección puede ser hacia arriba o hacia abajo del lecho fijo); la curva de concentración que se obtenga dependerá de las condiciones de operación, de las propiedades cinéticas de extracción del material sólido y del poder disolvente del fluido supercrítico, así también de la forma del lecho fijo, las capas de material sólido y variaciones en el extractor y precipitador (Brunner *et al.* 1994)

El desarrollo de procesos con fluidos supercríticos abarca un amplio campo de aplicaciones en diferentes sectores industriales, como la industria farmacéutica, química, electrónica, petroquímica, medio ambiente, de tratamiento de agua, de polímeros, y también se aplica a diversos procesos alimentarios (Montañés, 2009).

Algunas reglas empíricas generales del poder solvente del CO₂ de acuerdo con Zúñiga *et al.*, 2006 se describen a continuación.

1. El CO₂ en condiciones supercríticas es un buen solvente para compuestos no polares o ligeramente polares.
2. La presencia de grupos funcionales fuertemente polares (hidróxido o carboxilo) hace la extracción más difícil.
3. Sustancias de alto peso molecular (aminoácidos) son altamente insolubles para ser extraídos con CO₂ puro.

TABLA 1.3. Ventajas y limitaciones de métodos de extracción

Método de extracción	Ventajas	Limitaciones
Destilación con vapor	<ul style="list-style-type: none"> • Método industrial y de laboratorio. • Buenos rendimientos en los aceites extraídos. • Obtención de aceite puro y libre de disolvente. • Bajo costo. • Tecnología no sofisticada 	<ul style="list-style-type: none"> • Procesos colaterales, como la polimerización y resinificación de terpenos. • Hidrólisis de ésteres. • Destrucción térmica de algunos componentes de aroma.
Extracción con disolventes volátiles (éter de petróleo, pentano, hexano, etc.)	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de temperaturas bajas. • No hay termodestrucción ni alteración química de los componentes del extracto. • Posibilidad de separación de componentes individuales. 	<ul style="list-style-type: none"> • Costoso, contaminante con el ambiente, con riesgo de incendio y explosión. • Difícil de separar completamente el solvente sin alterar la composición del extracto. • Coextracción de ácidos grasos, ceras y pigmentos.
Maceración con disolventes no volátiles	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de bajas temperaturas. • Ausencia de destrucción térmica y deterioro químico de los componentes del extracto. • Usado para la extracción de esencias de productos termolábiles 	<ul style="list-style-type: none"> • Operación costosa por los largos tiempos de extracción. • Difícil separación del disolvente (en su mayoría aceites vegetales)
Extracción con CO₂ supercrítico.	<ul style="list-style-type: none"> • Proceso ecológicamente limpio. • Fácil retiro y reciclaje del solvente. • Bajas temperaturas de extracción. • No existe alteración química en el extracto. • Cambiando parámetros operacionales se puede variar la composición del extracto. 	<ul style="list-style-type: none"> • Coextracción de ácidos grasos, pigmentos y ceras. • Alta inversión inicial. • Proceso de extracción sofisticado.

Pereira *et al.*, 2010 mencionan que debido al incremento en el interés de los compuestos bioactivos se han desarrollado diferentes técnicas de extracción, entre ellas la extracción por fluidos supercríticos, y como estos compuestos pertenecen a clases químicas diferentes se deben considerar los siguientes aspectos:

1. La fuente del compuesto bioactivo
2. El rendimiento global y total obtenido en el proceso de extracción
3. La productividad
4. La selectividad

Los puntos 1, 2 y 3 están directamente ligados a la economía del proceso, y el punto 4 está relacionado a la calidad y pureza del producto final.

Por esta razón ha sido la extracción por CO₂ supercrítico un método para extraer compuestos con actividad anticáncer, ya que permite reducir tiempos de extracción y purificación (Pereira *et al.*, 2010).

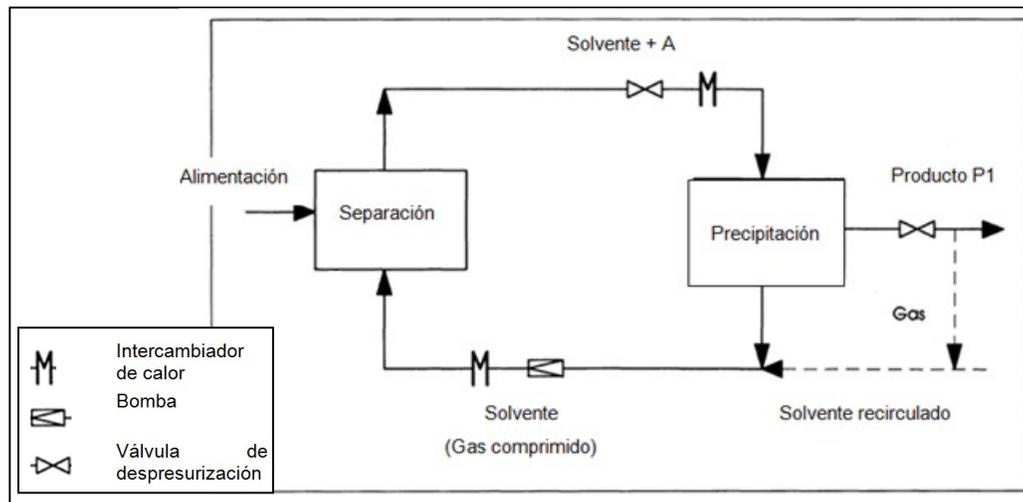


FIGURA 1.10. Flujo de extracción para sólidos en un extractor de fluidos supercríticos.

1.7. Cosolventes

Zúñiga (2006) describe al cosolvente como la adición de pequeñas cantidades de un solvente volátil a un fluido supercrítico para producir un incremento en la solubilidad de un soluto. Similarmente, el uso de múltiples solutos puede mejorar sus solubilidades en un fluido supercrítico, esto debido a que uno de los solutos actúa como cosolvente y disuelve al otro. Para aplicaciones industriales son de interés dos tipos de mezclas supercríticas ternarias:

1. Mezclas que contienen un cosolvente: Fluido supercrítico+ soluto+ cosolvente.
2. Mezclas que contienen dos solutos: Fluido supercrítico+ soluto+ cosoluto.

La importancia de estudiar el uso de mezclas multicomponentes es debido a que muchas aplicaciones potenciales de extracción involucran una matriz de diferentes compuestos. Por ejemplo en la extracción de productos químicos a partir de productos naturales donde se involucra una matriz como frutas, hojas, semillas, flores, que contienen cientos de compuestos, es por esto que es ideal conocer la selectividad del solvente supercrítico para este tipo de extracciones.

Debido a que el CO₂ pierde efectividad extrayendo fluidos polares, se han usado cosolventes en bajas concentraciones, generalmente menor del 5 %, para mejorar el poder solvente y selectividad del fluido supercrítico. La selectividad de un cosolvente puede afectar grandemente los costos de un proceso de extracción por fluidos supercríticos debido a factores como reciclamiento y precio del cosolvente. Algunos aspectos a tomar en cuenta para considerar el uso de un cosolvente se muestran a continuación.

a) La solubilidad generalmente se mejora con el uso de un cosolvente. En algunos casos el mejoramiento es significativo y por consecuencia las extracciones pueden ser llevadas a presiones menores comparadas con aquellas utilizadas cuando solo se usa CO₂ supercrítico.

b) El uso de un cosolvente incrementa la dependencia en temperatura de la solubilidad. Debido a esto, la regeneración del solvente supercrítico puede ser posible cambiando solo la temperatura. Este proceso de regeneración ofrece una reducción de costos significativo comparado con el reciclamiento usando presión.

c) La selectividad por un sólido puede ser manipulada usando cierto cosolvente.

d) El efecto del cosolvente es influenciado por asociaciones químicas. La presencia de ácido de Lewis/ base de Lewis, enlace de puente de hidrógeno u otro tipo de fuerzas intermoleculares afecta grandemente el éxito de un cosolvente.

e) En general, un cosolvente polar puede mejorar marcadamente la solubilidad de un soluto polar, pero afecta menos a un soluto no polar. En contraste, un cosolvente no polar tiene aproximadamente el mismo efecto en solutos polares y no polares si los pesos moleculares o polarizaciones son similares.

f) Las temperaturas críticas de las mezclas compuestas de CO₂ + cosolvente en bajas concentraciones son cercanas a la Temperatura crítica del CO₂ (30.9 °C), estas bajas temperaturas cumplen las restricciones en temperatura en procesos que involucran organismos, enzimas o compuestos sensibles a la temperatura, por lo que se pueden aplicar en la industria bioquímica.

1.8. Extracción de compuestos bioactivos usando fluidos supercríticos

Se han realizado evaluaciones de rendimientos sobre la extracción de fluidos supercríticos como por ejemplo Jennings *et al.*, 1992, quienes publicaron un estudio sobre la extracción de Taxol® (Figura 1.11) a partir de *Taxus Brevifolia* (árbol del Tejo) por CO₂ supercrítico (T = 44.9°C, P de 18.07 a 25.79 MPa, t= 6 h) y encontraron que la mezcla de CO₂ + etanol es más selectiva debido a los componentes del extracto a un flujo de 200 ml/min y 15 ml/min respectivamente, así inclusive que es más fácil de

separar de los componentes polares presentes en la muestra que una extracción líquida convencional con etanol; aumentando la selectividad de taxol recuperado hasta 100 veces más.

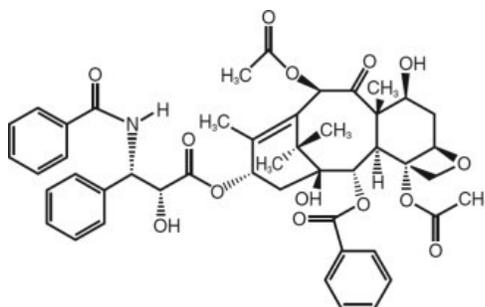


FIGURA 1.11. Estructura química de Taxol.

Por otro lado, López *et al.*, (1997), efectuaron un estudio donde extrajeron Oxindol (figura 1.12) de *Uncaria tormentosa* (uña de gato) usando CO₂ supercrítico, estos alcaloides incluyen isopteropodina, pteropodina, isomitrafalina, uncarina F, mitrafalina, especiofilina, rincofilina y isorincofilina. Realizaron una extracción (T = 60°C, P= 25.33 MPa, t= 30-60 min) con 1.2 ml/min de CO₂ mas un flujo de 10% de metanol. De las extracciones no obtuvieron la concentración exacta de los alcaloides obtenidos, sin embargo, muestran un rendimiento de 82.6%. Concluyen que es necesario encontrar las condiciones óptimas de temperatura y presión.

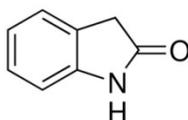


FIGURA 1.12. Estructura química de Oxindol.

En un estudio reportado por Leal *et al.*, (2003), efectuaron una evaluación de diversos extractos obtenidos por CO₂ supercrítico (P= 20-30 MPa, T= 30, 40, 50°C, t= 60 min) a un flujo de 8.9 ml/ min en una mezcla con 13.8% de etanol y/o alcohol isopropílico como cosolventes, y encontraron que *Zingiber officinale* Roscoe y *Curcuma longa* L. presentaron actividad selectiva anticancerígena.

Mientras que Qiang Wu *et al.*, 2014, realizaron una extracción con 3 L/min de CO₂ supercrítico (P= 62 MPa, T= 50°C, t= 1-2 h) de *Azadirachta indica* mejor conocida como neem, y evaluaron *in vivo* e *in vitro* el efecto inhibitor del extracto sobre el crecimiento de tumores en el cáncer de próstata, obteniendo 16 picos con HPLC con actividad citotóxica entre los que se encontró nimbandiol, nimbolida, 2'3'-dihidronimbolida y 28-deoxonimbolida, concluyeron en su estudio que estos productos

naturales son una fuente potencial de agentes quimioterapéuticos y antimetastásicos y que son los principales inhibidores del crecimiento tumoral en cáncer de próstata.

En cuanto al Honokiol y Magnolol como compuestos bioactivos, han sido extraídos por fluidos supercríticos (20 MPa y 45°C con dióxido de carbono y 5% de metanol a un flujo de 4 ml/min durante 1, 3 y 6 minutos) de corteza de *Magnolia* usando además cromatografía acoplada a fluidos supercríticos y haciendo una comparación del máximo extraíble de ambas moléculas utilizando diferentes columnas cromatográficas, obteniendo rendimientos de 2.4% de Magnolol y 0.6% de Honokiol, demostrando que estas moléculas son extraíbles en tiempos cortos utilizando un cosolvente (Suto *et al.*, 1997).

1.9. Citotoxicidad de *Magnolia*.

La citotoxicidad varía dependiendo de la naturaleza del estudio, por ejemplo demostrar que no son tóxicos o que son agentes anticáncer. Se pueden clasificar en ensayos de viabilidad y ensayos de supervivencia, los primeros se emplean para determinar la proporción de células que inmediatamente después de un tratamiento potencialmente traumático, se mantienen intactas. Mediante estos ensayos se puede evaluar la citotoxicidad de un tratamiento en términos de concentraciones letales. La concentración letal 50 o IC₅₀ es la concentración de la sustancia de tratamiento que causa la muerte al 50 % de las células presentes, evaluadas inmediatamente después del tratamiento (García, 2003).

Estudios químicos en *M. grandiflora* han reportado la presencia de Honokiol y Magnolol, que tienen muchas funciones medicinales como la inhibición de los efectos de tumores en la piel. Esta planta es una fuente potencial para la inhibición viral, además de haber sido catalogada como no tóxica para el consumo humano. Muchos estudios indican que tiene una alta actividad inhibitoria frente al crecimiento de líneas celulares cancerígenas (GLC-82 y HCT); Acerca de las aporfinas encontradas (magnoflorina y hernovina) tienen citotoxicidad en las líneas celulares KB, A-549, HTC-8, P-388 y L-1210, con un IC₅₀ de 0.7µM en la línea celular P388 (Mohamed *et al.*, 2010).

En cuanto a *Magnolia dealbata*, se tienen estudios citotóxicos en líneas celulares de cáncer de mama, células HaCat, HeLa, HEPG2, utilizando la técnica de MTT y obteniendo alta actividad citotóxica en células de cáncer de mama (MDA-MB231) con un IC₅₀ de 25 µg/ml similar al encontrado en extractos de otras especies de *Magnolia*. Donde se concluye que *M. dealbata* tiene efecto citotóxico y apoptótico, dependiente de la caspasa, además posee efectos quimiopreventivos sobre el crecimiento de células de cáncer de mama en ratones (Alonso *et al.*, 2014).

1.10. Ensayos de proliferación celular.

El cultivo de células tiene su origen en el siglo XIX, cuando se comenzaron a estudiar con cierto detalle los tejidos y órganos en vasos de vidrio. Tiene el objetivo de mantener vivas a las células fuera de su organismo de origen, para poder estudiar la morfología celular y para comparar el efecto de diferentes agentes o diferentes concentraciones de un agente sobre el crecimiento y metabolismo. (Stockert *et al.*, 2012).

Las células que crecen en cultivo, ya sea adherentes o en suspensión, suelen clasificarse en primarias, inmortales o transformadas. El medio de cultivo básicamente debe ser líquido, que contenga una fuente de carbono, aminoácidos esenciales, oligoelementos, un sistema regulador de pH, iones, rojo de fenol como indicador de pH, factores de crecimiento aportados por suero bovino, antibiótico para evitar la contaminación por microorganismos (Freshney, 2000).

Los ensayos biológicos requieren medir la supervivencia y/o proliferación de las células de mamífero, esto puede lograrse por varios métodos, para esto se desarrolló un ensayo colorimétrico rápido, versátil, cualitativo y cuantitativo, basado en una sal de tetrazolio MTT que mide solo células vivas y puede medirse espectrofotométricamente leyendo la absorbancia entre 540 a 570 nm (Mosmann, 1983).

El MTT es una sal que se utiliza para medir la actividad y viabilidad celular por el rompimiento causado por la reducción (aceptación de un H⁺) del anillo de la sal MTT por acción de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales: succinato-deshidrogenasas, para formar unos cristales azules de formazán insolubles en agua, pero solubles en dimetil sulfóxido (DMSO). La viabilidad celular es proporcional a la absorbancia, que presentan los cristales de formazán en solución. La forma en cómo se metaboliza el MTT a sales de formazán por células viables se pueden observar en la figura 1.6 (Stockert *et al.*, 2012)

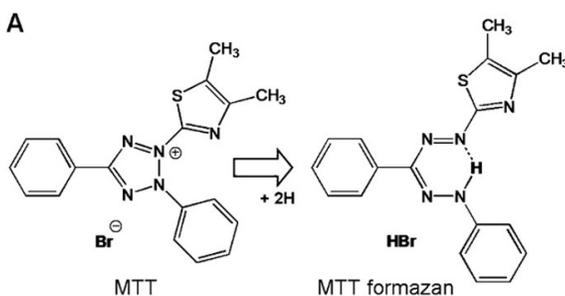


FIGURA 1.13. Metabolización de MTT a Sales de formazán.

2. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de alternativas para la extracción limpia y eficiente de compuestos bioactivos en plantas, ha llevado al uso de fluidos supercríticos que han demostrado ser una buena elección para la separación de componentes de uso quimioterapéutico en el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

Es por ello que este trabajo se enfocará en demostrar la eficiencia de la extracción supercrítica de Honokiol y Magnolol, estableciendo las condiciones de extracción y comparar los rendimientos con la extracción Soxhlet.

3. HIPÓTESIS

La extracción por CO₂ supercrítico de Honokiol y Magnolol adicionada a hoja de *Magnolia grandiflora* en concentraciones conocidas, puede ser optimizada y además evaluada cualitativamente la citotoxicidad.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de la presión y de la temperatura sobre el rendimiento de Honokiol y Magnolol utilizando CO₂ supercrítico y cosolvente.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar la solubilidad de Honokiol y Magnolol en CO₂ supercrítico y en CO₂ supercrítico + etanol, estudiando la influencia de dos diferentes matrices en la obtención del extracto supercrítico.
- Determinar las condiciones óptimas de presión, temperatura y tiempo en función de los rendimientos de extracción de Honokiol y Magnolol.
- Evaluar cualitativamente el comportamiento citotóxico del extracto obtenido por fluidos supercríticos, y comparar con otros extractos de *Magnolia*.

5. METODOLOGÍA

La planta seleccionada para este estudio fue proporcionada en noviembre de 2015 por el Jardín Botánico “Francisco Javier Clavijero” perteneciente al Instituto de Ecología A.C. (INECOL) de Xalapa, Veracruz.

Las hojas seleccionadas, fueron lavadas con agua destilada y secadas a temperatura ambiente en ausencia de luz solar y posteriormente fueron trituradas con molino pulvex modelo mini 100 (ver figura 5.1), midiendo el tamaño de partícula con un tamiz de malla de 0.59 mm. La muestra se almacenó a 0°C para su uso posterior de acuerdo con Rodríguez *et al.* (2002).



FIGURA 5.1. Procesamiento de la materia prima. a) Lavado de hojas de magnolia, b) secado a temperatura ambiente, c) hojas secas antes de ser trituradas y d) trituración de las hojas.

Se utilizó un extracto de corteza de *Magnolia officinalis* de uso comercial de la marca Liftmode con una concentración de Honokiol y Magnolol de 96.6%. De la cual se preparó una solución con concentración conocida que fue utilizada para ensayos de extracción por fluidos supercríticos.

En la figura 5.2. Se muestra el esquema general desde la obtención de la materia prima, el acondicionamiento y la extracción con CO₂ supercrítico y con solventes, la cuantificación y el ensayo en células cancerígenas.

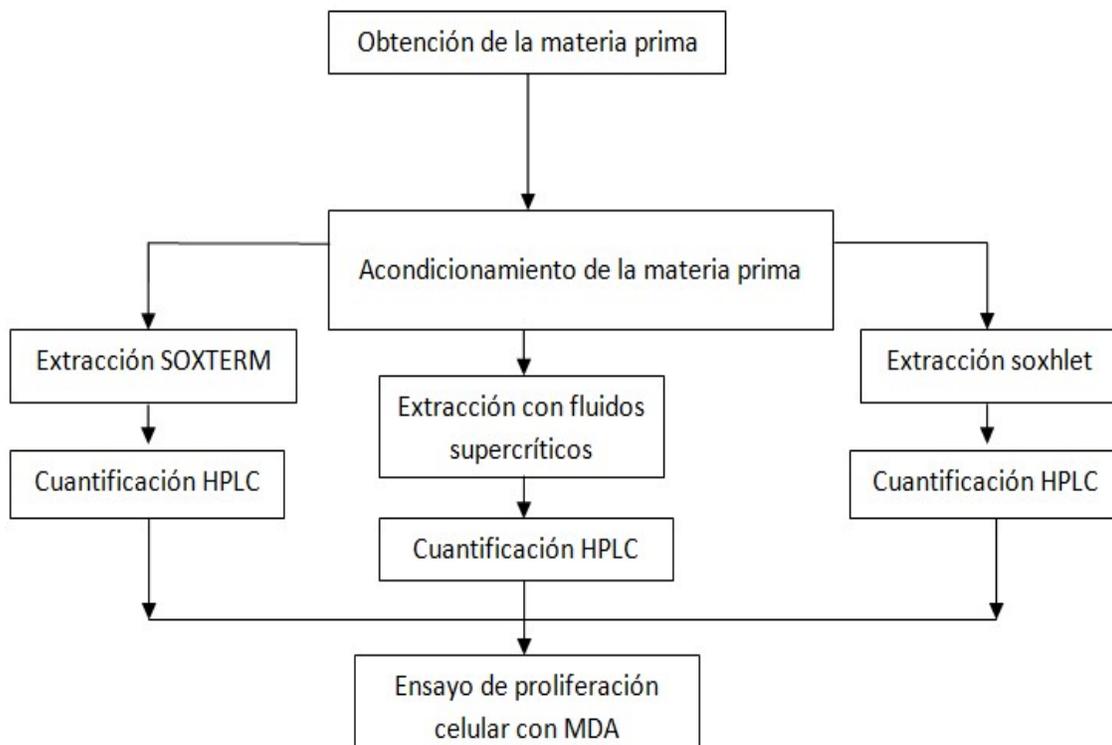


FIGURA 5.2. Diagrama general de extracción con fluidos supercríticos de Magnolol y Honokiol

5.1. Validación del equipo de fluidos supercríticos

Para efecto de comparación, se efectuó la extracción con metanol en un equipo Soxhlet convencional del Laboratorio de Físicoquímica de UNIDA a reflujo constante por 6 horas, utilizando 15 g de granos de café triturado y posteriormente llevado a sequedad en un rotovapor marca Buchi. Se realizaron extracciones de cafeína de granos de café verde con CO₂ supercrítico, utilizando un equipo de extracción a escala laboratorio diseñado y construido en el laboratorio de Físicoquímica de la UNIDA del ITV (figura 5.3.) cuyas características generales se reportan en la tabla 5.1.



FIGURA 5.3. Extractor de fluidos supercríticos.

TABLA 5.1. Características de operación del equipo de Fluidos supercríticos

Características del equipo	
Presión máxima	69 MPa
Temperatura máxima	120 °C
Flujo máximo de disolvente	24 ml / min
Volumen de la celda de extracción	39.127 cm ³
Material en contacto con la muestra	Acero inoxidable

Se tomó un punto de análisis y parte de la metodología de Tello *et al.*, 2011, donde se pesó en cada corrida de extracción 15 g de muestra de grano de café verde variedad híbrido molido a un tamaño de partícula promedio de 1.2 mm, se colocó en la celda de extracción y se extrajo cafeína a una temperatura de 60°C, a una presión de 20 MPa, a un flujo de 4.5 ml/min de CO₂, por 120 minutos (datos utilizados para el cálculo de la cafeína soluble en CO₂).

5.2. Obtención de extractos crudos de *Magnolia* por Soxhlet

Se usaron 15 g de muestra que se colocaron por separado en cartuchos de filtro Whatman No. 1, en un aparato Soxhlet (figura 5.4) de 500 ml para su extracción exhaustiva por reflujo con etanol durante 2 h. Los extractos se concentraron en un rotovapor a 60°C. Se reconstituyeron con 10 ml de etanol grado HPLC y se filtraron a través de acrodiscos de membrana 0.45 µm (milipore) para eliminar

pequeñas partículas. Se inyectó una alícuota de 0.1 μ l en el UPLC marca Acquity Waters, ubicado en el centro de investigaciones biomédicas de oriente en el estado de Puebla para el análisis de la presencia y posterior cuantificación de Honokiol y Magnolol por cada extracto.



FIGURA 5.4. Equipo de extracción Soxhlet

5.3. Extracción con fluidos supercríticos

Para obtener los extractos con CO₂ supercrítico se empleó un equipo de extracción a escala laboratorio diseñado y construido en el laboratorio de Físicoquímica de la UNIDA del ITV.

Se cargó 15 g de muestra en el recipiente extractor, y se saturó con CO₂ líquido (en algunos ensayos se utilizó etanol al 96% como cosolvente), luego de alcanzar la presión y la temperatura de extracción establecidas se mantuvieron al tiempo establecido; posteriormente se procedió a despresurizar el recipiente extractor, permitiendo el flujo de extracto hacia el recipiente de separación de manera continua. Por último este extracto se cuantificó de acuerdo con Ordoñez *et al.*, 2006 en un equipo HPLC Waters 717 plus con automuestreador, bomba waters 1525, Degasificador Degassit 6324 Metachem Technologies Inc., Detector waters 2487, Columna Waters 3.9 X 150 mm Nova park C-18.

Para fijar el tiempo de extracción, se realizaron extracciones a diferentes tiempos (1, 3, 6, 10, 15,30, 45, 60, 75, 90 y 120 min) para obtener una gráfica más completa, se usaron las condiciones establecidos por Suto *et al.*, (1997), 20 MPa, 45°C y un flujo de 4 ml /min, se utilizó hoja de *Magnolia*

molida adicionada con 4 ml de solución de extracto comercial con concentración de 0.16 mg/ml.

Después de obtener el tiempo donde se generó la asíntota en el sistema, se realizó un diseño experimental para la optimización de este proceso de extracción. Se utilizó un diseño experimental central compuesto y rotatable 2², cuyos niveles de las variables, así como sus valores correspondientes se muestran en la tabla 5.2, donde se puede observar que los experimentos del 1 al 5 son los puntos centrales del diseño.

TABLA 5.2. Primer diseño experimental para optimizar el proceso de extracción supercrítica.

Experimento	Nivel de presión	Nivel de temperatura	Presión (MPa)	Temperatura (°C)
1	0	0	20	45
2	0	0	20	45
3	0	0	20	45
4	0	0	20	45
5	0	0	20	45
6	1	1	26.2	52
7	-1	1	26.2	38
8	1.414	0	28.77	45
9	0	-1.414	20	35
10	-1.414	0	11.24	45
11	0	1.414	20	55
12	-1	-1	13.79	38
13	1	-1	13.79	52

5.4. Extracciones con concentración conocida

Se utilizó un extracto comercial de magnolia (*Magnolia officinalis*) con 46.4% de Honokiol y 50.2% de Magnolol, de la cual se preparó una solución etanólica con una concentración de 0.16 mg/ ml.

5.5. Extracción con algodón

Se usaron bolitas de algodón marca dalux de un peso promedio de 0.6 g, las cuales fueron impregnadas con 4 ml de la solución del extracto comercial, se secaron a temperatura ambiente dentro de un desecador al vacío y finalmente fueron utilizados como materia prima para la extracción por fluidos supercríticos a las condiciones de presión y temperatura de la tabla 5.3. Las extracciones se realizaron con solo CO₂ supercrítico. Los extractos fueron reconstituidos con 2 ml de etanol grado

TABLA 5.3. Condiciones de Presión y Temperatura para la extracción supercrítica con algodón

Presión	Temperatura
11.23	45
20	55
20	41
20	45
28.73	45

HPLC, puestos en viales y cuantificados en el HPLC. Posteriormente se calculó la solubilidad de Honokiol (HKL) y Magnolol (MGL) en CO₂, utilizando el flujo de CO₂ (4.5 ml / min), el tiempo de extracción (30 min) y los miligramos utilizados de cada molécula.

Solubilidad (mg HKL o MGL / ml de CO₂) = mg HKL (o MGL) extraído * mg de extracto comercial

Flujo de CO₂ (ml / min) * tiempo (min)

5.6. Extracción de Honokiol y Magnolol en hojas de *Magnolia grandiflora*

Se colocó 3 g de hoja de *Magnolia grandiflora* molida en crisoles, a la cual se le agregó 4 ml de la solución del extracto comercial, se secaron las muestras a temperatura ambiente dentro de un desecador al vacío y finalmente se extrajo con CO₂ supercrítico a las condiciones de presión y temperatura de la tabla 5.2, utilizando un flujo de 5% de etanol. Los extractos fueron reconstituidos con 5ml de etanol grado HPLC, puestos en viales y cuantificados en el HPLC.

5.7. Cuantificación del extracto obtenido

Se calculó el rendimiento a partir de la siguiente ecuación:

$$Y_e = \frac{m_e}{m_{m0}}$$

Dónde:

Y_e : Rendimiento del extracto (mg de extracto/ mg de extracto comercial)

m_e : Masa del extracto obtenido (mg del extracto)

m_{m0} : masa de extracto comercial (mg de extracto comercial)

5.8. Determinación de Honokiol y Magnolol

La determinación de Honokiol y de Magnolol se realizó por HPLC con estándares comerciales. Se preparó una concentración de 1 mg / ml de estándar y se realizó un barrido de longitudes de onda en un espectrofotómetro marca Agilent 8453 donde se obtuvieron las mejores longitudes de onda usadas en este proyecto. Se utilizó una columna C18 fase reversa, como fase móvil, Acetonitrilo:H₂O:H₃PO₄

65:35:0.1 v/v/v (Tsai *et al.*, 1991), a un flujo de 0.5 ml/min, a 254 nm para Honokiol y a 290 nm para Magnolol.

Una vez estandarizada la técnica, se procedió a realizar una curva de calibración (apartado 5.9). Los extractos obtenidos por extracción supercrítica, fueron disueltos en 5 ml de etanol, posteriormente pasaron por un agitador y para asegurar su dilución por un sonicador durante 10 minutos. Después de la dilución fueron filtrados con acrodiscos de membrana de 0.22 µm y posteriormente inyectados al equipo HPLC.

5.9. Establecimiento de la curva estándar de Honokiol y Magnolol.

Se usaron estándares de Honokiol y Magnolol con una pureza del 95 y 98% con las condiciones de elusión antes mencionadas se partió de una solución stock que fue preparada a una concentración de 2 mg de estándar/ml de etanol, a partir de ahí se prepararon 8 concentraciones diferentes (1.538, 1, 0.5, 0.125, 0.062, 0.031, 0.016, 0.008 mg/ml).

Al obtener las áreas de los picos, estos se graficaron contra la concentración y se obtuvo la ecuación de la recta, con la cual se puede obtener la concentración real de las muestras desconocidas.

5.10. Ensayos de proliferación celular

En el Instituto Nacional de Cancerología se llevaron a cabo pruebas con MTT en células contenidas en charolas de 96 pozos, tratadas con los diferentes extractos de magnolia.

Se preparó un stock con cada extracto pesando 100 mg y fue disuelto en 1 ml de DMSO, de aquí se preparó una dilución 1:100, tomando 10 µl de la solución Stock y adicionándole 990 µl de DMEM; posteriormente se obtuvieron las concentraciones descritas en la tabla 5.3.

TABLA.5.4. Codificación con la dilución utilizando DMSO y DMEM

Cantidad de DMSO	Dilución con medio DMEM	Código
0.005% de DMSO	5 µl + 995 µl de DMEM	X.5
0.025% de DMSO	25 µl + 975 µl de DMEM	X.25
0.05% de DMSO	50 µl + 950 µl de DMEM	X.50
0.1% de DMSO	100 µl + 900 µl de DMEM	X.100
0.2% de DMSO	200 µl + 800 µl de DMEM	X.200

Se siembran 5000 células de MDA (cáncer de mama) en medio DMEM en charolas de 96 pozos por triplicado (Ver metodología en apéndice A), se agregan diluciones con DMSO de los extractos de magnolia para obtener concentraciones de 5, 25, 50, 100 y 200 µg/ml (Ver codificación de los pozos en tabla 5.5), utilizando al mismo tiempo Cisplatino como testigo positivo y se incuban dos charolas a 37°C, de las cuales una se analizó a las 24 horas y otra a las 48 horas con MTT a 590 nm en un espectrofotómetro marca Epoch (Figura 5.5).



FIGURA 5.5. Lectura de Charola de 96 pozos con MTT en espectrofotómetro Epoch.

TABLA. 5.5. Codificación en las charola inoculadas con las células MDA y los diferentes extractos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.5	1.5	1.5	2.5	2.5	2.5	3.5	3.5	3.5	4.5	4.5	4.5
B	1.25	1.25	1.25	2.25	2.25	2.25	3.25	3.25	3.25	4.25	4.25	4.25
C	1.50	1.50	1.50	2.50	2.50	2.50	3.50	3.50	3.50	4.50	4.50	4.50
D	1.100	1.100	1.100	2.100	2.100	2.100	3.100	3.100	3.100	4.100	4.100	4.100
E	1.200	1.200	1.200	2.200	2.200	2.200	3.200	3.200	3.200	4.200	4.200	4.200
F	5.5	5.5	5.5	5.100	5.100	5.100	D5	D5	D100	D100	C2.5	C65
G	5.25	5.25	5.25	5.200	5.200	5.200	D25	D25	D200	D200	C20	C80
H	5.50	5.50	5.50	MST	MST	MST	D50	D50	MST	MST	C45	C100

*La codificación inicia con el extracto (X de la tabla 6.7) separado con punto seguido de la concentración.

**1: Extracto de Fluidos supercríticos (color azul); 2: Extracto Soxhlet (color verde), 3: Extracto Soxterm (color morado), 4: Extracto de magnolia comercial (color naranja), 5: Mezcla de estándares de Honokiol y Magnolol (color rosa), MST: muestra sin tratar (sin color), D: DMSO (color gris), C: Cisplatino (color amarillo).

6. RESULTADOS

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en el desarrollo de este trabajo así como el análisis de los mismos.

6.1. Resultados de validación del equipo de Fluidos supercríticos.

Se efectuó la curva de calibración (figura 6.1), con siete puntos obteniendo una R de 0.998 utilizando estándar de cafeína al 98%.

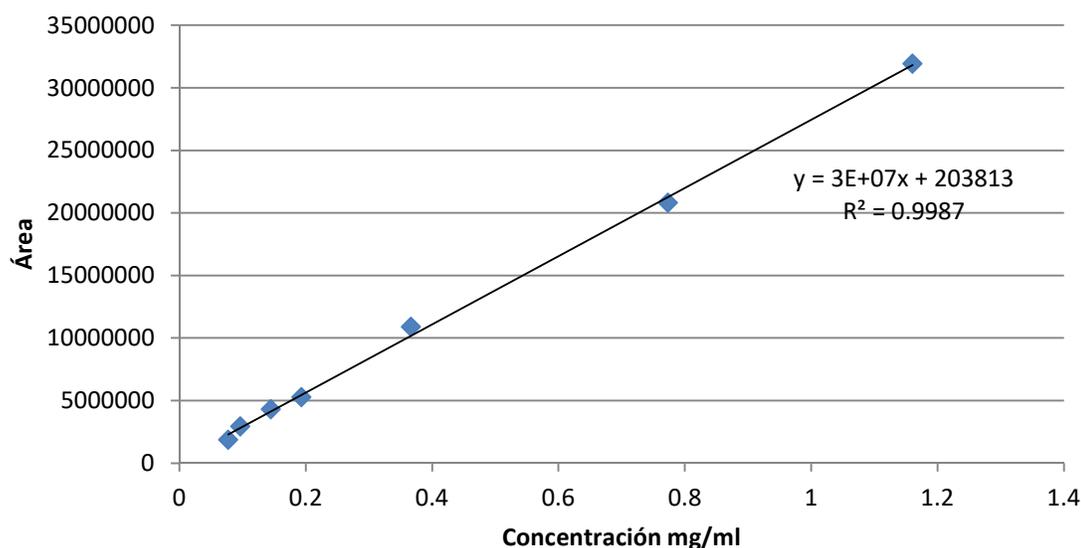


FIGURA 6.1. Curva de calibración de cafeína.

Para la validación del equipo de fluidos supercríticos se utilizó café verde triturado, variedad híbrido. La muestra de café fue pesada a 15 g y colocada en el extractor de fluidos supercríticos a una presión de 20 MPa, una temperatura de 60°C a un flujo de 4 ml/min de acuerdo con las condiciones de trabajo de Tello *et al*, 2011, cuyos resultados se pueden observar en la tabla 6.1.

Se calculó la solubilidad de la cafeína en 4.5 ml/min de CO₂ por 120 min, a 20 MPa y 60°C por cada g de café utilizado, teniendo una solubilidad de 0.014 mg de cafeína /ml de CO₂

TABLA 6.1. Miligramos de cafeína extraídos con CO₂ supercrítico.

Presión (MPa)	Temperatura (°C)	Muestra	Variedad	mg de cafeína / g de café
20	60	1	Híbrido	0.26
		2		0.96
		3		0.31
		4		0.27
		5		0.74
			Media	0.51

De acuerdo a los resultados mostrados anteriormente se efectuó un análisis estadístico con el resultado de Tello *et al.*, 2011 mediante una comparación de medias con un intervalo de confianza de 95%, donde se obtuvo que ambos resultados son iguales, con lo que se demuestra repetitividad en el proceso.

6.2. Análisis preliminares en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Oriente

Se efectuó una corrida de extracción con el equipo de extracción de fluidos supercríticos, donde la muestra se cargó en el recipiente extractor, y se saturó con CO₂ líquido hasta alcanzar 20 MPa de presión y 45° C de temperatura, con un flujo de 4 ml/min y por un total de 30 min de extracción basado en los antecedentes de Suto *et al.*, 1997 (con la variación de usar solo CO₂); posteriormente se procedió a despresurizar el recipiente extractor, permitiendo el flujo de extracto hacia el recipiente de separación, obteniendo 1g de polvo húmedo de color amarillo claro, el cual fue re-suspendido en etanol grado HPLC en concentración 1:10. Por último este extracto se analizó en UPLC con acetonitrilo ácido fosfórico como sistema de elución, en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biomédicas en el estado de Puebla.

Se efectuó una corrida de extracción con Soxhlet por duplicado usando las mismas condiciones. Por cada corrida de extracción se usaron 10 g de hoja pulverizada divididas equitativamente y colocadas por separado en cartuchos de filtro Whatman No. 1, puestos en los vasos del aparato Soxhlet agregando 150 ml de etanol 96° para su extracción exhaustiva por reflujo continuo durante 2 h bajo los parámetros establecidos en el sistema Soxtherm (ver tabla 6.2). Los extractos se concentraron en un rotovapor a 60°C, por 20 min a 60 rpm, de lo cual se obtuvo 2.20 g de extracto crudo. Posteriormente se reconstituyeron con 10 ml de etanol grado HPLC, se centrifugaron a 1000 rpm por 10 min y se filtraron a través de acrodiscos de membrana 0.45 µm y 0.2 µm de la marca Millipore para eliminar pequeñas partículas. Se inyectó una alícuota de 0.5 µl en el UPLC para el análisis de la presencia de Honokiol y Magnolol por cada extracto.

TABLA 6.2. Condiciones de operación del sistema Soxtherm para la extracción de Honokiol y Magnolol.

Parámetro:	Condición
Temperatura de Extracción	120°C
Intervalo de de reducción	2 min 0 s
Tiempo de calentamiento	0h 20 min
Tiempo de extracción	2 h 0 min

Los extractos fueron analizados en UPLC del CIBIOR, posteriormente, se obtuvieron extractos en un equipo Soxhlet convencional donde los análisis fueron llevados a cabo en HPLC en UNIDA, bajo la misma metodología que Tsai *et al.*, 1992 y Castro *et al.*, 2014; obteniendo inicialmente la curva de calibración a ocho puntos.

6.3. Resultados de extracción convencional

De acuerdo con la metodología llevada a cabo en el CIBIOR se repitió el mismo procedimiento de extracción Soxhlet por duplicado en UNIDA, donde después de cuantificar en el equipo de HPLC, se obtuvo como resultado que las muestras de hojas de *Magnolia grandiflora* utilizadas no contienen Honokiol y Magnolol. En la figura 6.2. no se observan los picos de Honokiol y Magnolol en los tiempos de retención de 4.3 y 5.3 minutos respectivamente.

De aquí que se decidió trabajar con un extracto positivo de estas moléculas, utilizando extracto comercial de corteza de *Magnolia officinalis* con 46.4% de Honokiol y 50.2% de Magnolol, de la cual se preparó una solución etanólica con una concentración de 0.16 mg/ ml.

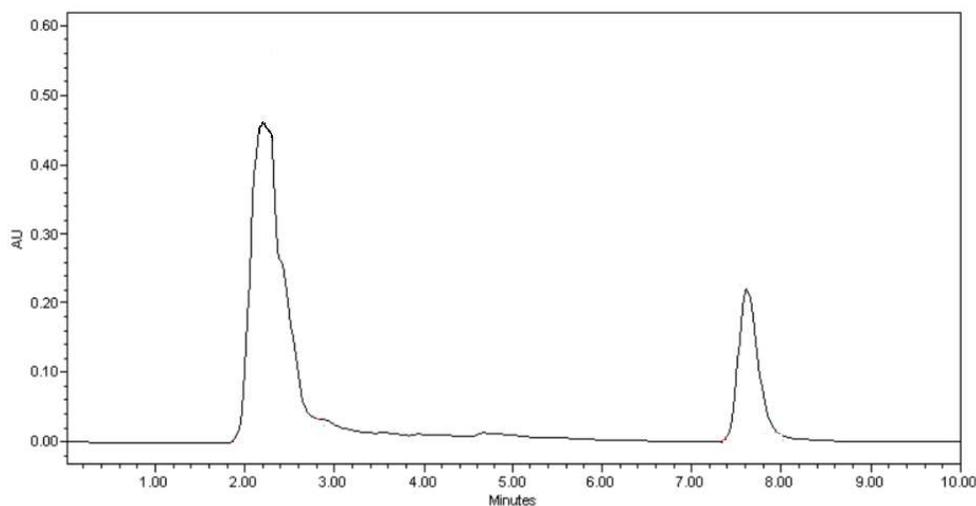


FIGURA 6.2. Cromatograma del extracto de *Magnolia grandiflora*. No se observan los picos de Honokiol y Magnolol en los tiempos de retención de 4.3 y 5.3 minutos respectivamente

6.4. Curva de calibración Honokiol y Magnolol

Se efectuó la curva de calibración utilizando estándares marca SIGMA de Honokiol y Magnolol al 95% y 98% respectivamente, con ocho concentraciones obtenidas mediante regresión lineal; para lo cual, inicialmente se llevó a cabo un barrido de longitudes de onda para corroborar las estipuladas por Tsai *et al.*, 1992 y Castro *et al.*, 2014. Observado que el Magnolol absorbió a 290 nm, 248 nm y 213 nm, teniendo como absorbencia máxima a 290 nm. Por otro lado Honokiol absorbió a 294 nm, 254 nm y 210 nm, donde la mejor absorbencia se obtuvo en 254 nm. Con esto se tiene que coinciden las longitudes de onda con Castro, 2014.

En el inciso (a) de la figura 6.3 se muestra la curva de calibración para Honokiol con una R de 0.996 y en el inciso (b) de la figura 6.3 se observa la curva de calibración de Magnolol con una R de 0.998. En la figura 6.4 se puede observar un cromatograma de la mezcla de estándares, teniendo como tiempos de retención 4.4 minutos para Honokiol y 5.7 minutos para Magnolol.

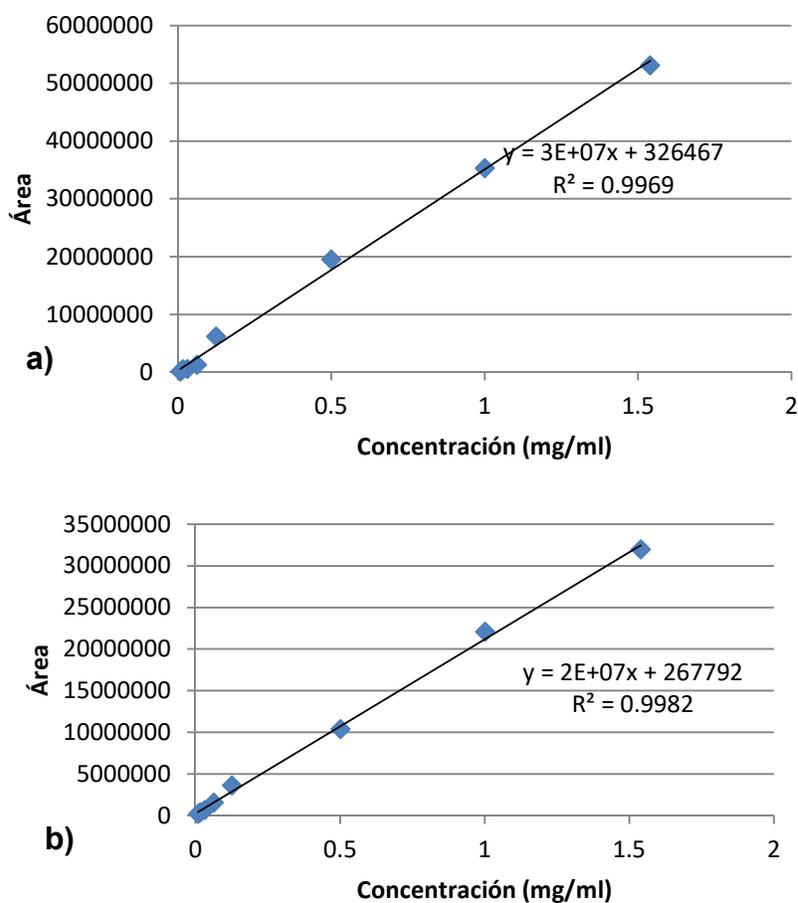


FIGURA 6.3. Curva de calibración de Honokiol (a) y de Magnolol (b).

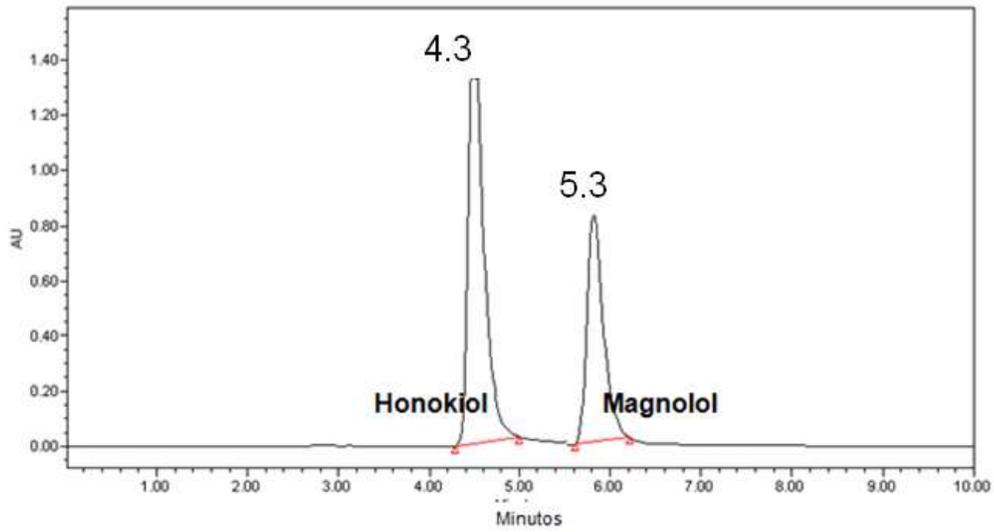


FIGURA 6.4. Cromatograma de mezcla de estándares de Honokiol y Magnolol.

6.5. Cinética de extracción de Honokiol y Magnolol

En la figura 6.5 se muestra el comportamiento de la cinética de extracción de Honokiol y Magnolol a 20 MPa y a 45°C con un flujo constante de 4 ml/min, como se observa a partir del minuto 30, la gráfica es prácticamente lineal y constante ya que no hay diferencia significativa del minuto 30 al minuto 120, por lo tanto se toman 30 minutos como el tiempo óptimo de extracción.

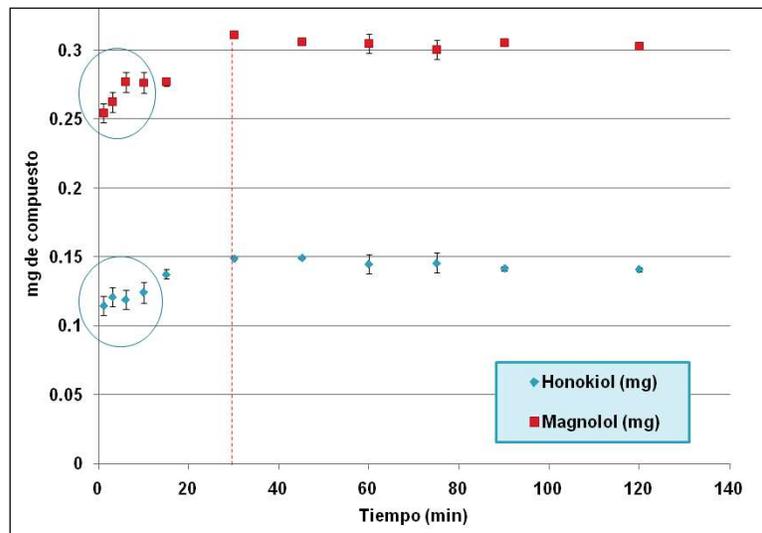


FIGURA 6.5. Cinética de extracción de Honokiol y Magnolol con CO₂ supercrítico

6.6. Resultados de extracción de Honokiol y Magnolol con muestra conocida

6.6.1. Extracción con algodón

Se preparó una solución etanólica de corteza de *Magnolia officinalis* comercial con una concentración de 0.16 mg de mezcla de Honokiol y Magnolol correspondiente a 0.297 mg y 0.321 mg respectivamente.

Se realizaron pruebas de extracción con CO₂ supercrítico, agregando 4 ml de la solución etanólica del extracto de *Magnolia officinalis* a una bola de algodón que fue colocada dentro de la celda de extracción donde los resultados se pueden ver en la tabla 6.3.

Posteriormente se llevó a cabo pruebas de extracción con CO₂ supercrítico bajo las mismas condiciones, dejando evaporar el etanol del algodón en un desecador al vacío por 48 horas, después de éste tiempo se colocó dentro de la celda de extracción (los resultados de esta prueba se pueden observar en la tabla 6.4).

Para ambas pruebas se calculó la solubilidad de Honokiol y Magnolol utilizando el flujo de CO₂ (4.5 ml/min), el tiempo de extracción (30 min) y los miligramos (0.64 mg), mostrado en la última columna del lado derecho de la tabla 6.3.

TABLA 6.3. Resultados de extracción supercrítica de Honokiol y Magnolol, utilizando algodón como matriz de extracción

Método	Presión (MPa)	Temperatura (°C)	Rendimiento de Honokiol mg/mg	Rendimiento de Magnolol mg/mg	Solubilidad	
					mg de Honokiol/ml de CO ₂	mg de Magnolol/ml de CO ₂
CO ₂ supercrítico más etanol	11.23	45	0.13	0.39	2.41E-04	5.93E-04
	20	55	0.04	0.05	7.41E-05	9.26E-05
	20	41	0.05	0.08	9.26E-05	1.48E-04
	20	45	0.12	0.25	2.22E-04	4.63E-04
	28.73	45	0.11	0.22	2.04E-04	4.07E-04
CO ₂ supercrítico	11.23	45	0.0001	0.0060	1.85E-07	1.11E-05
	20	55	0.0054	0.0191	1.00E-05	3.54E-05
	20	41	0.0063	0.0227	1.17E-05	4.20E-05
	20	45	0.0129	0.0361	2.39E-05	6.69E-05
	28.73	45	0.0003	0.0053	5.56E-07	9.81E-06

Al comparar los resultados mostrados en las tablas 6.3 y 6.4 se observa que las moléculas de Honokiol y Magnolol son solubles en CO₂ supercrítico, además de que el etanol mejora la polaridad del disolvente, mejorando con ello los rendimientos de extracción.

6.6.2. Extracción de Honokiol y Magnolol en hoja de *Magnolia grandiflora*

Para optimizar la extracción de Honokiol y Magnolol se utilizó un diseño experimental compuesto y rotatable 2² con puntos axiales y con 6 repeticiones en el centro. Los resultados fueron analizados utilizando metodología de superficie de respuesta. Los parámetros utilizados en este diseño se muestran en la tabla 5.2, se tomó como punto central una presión de 20 MPa y una temperatura de 45°C, que son las condiciones utilizadas por Suto *et al.*, 1997.

Al sustituir la presión (24.3 MPa) y temperatura (35°C) óptimas en las ecuaciones cuadráticas se obtiene la mayor concentración de Honokiol y de Magnolol (figura 6.6).

La superficie de respuesta se presenta en la figura 6.7 y las ecuaciones cuadráticas que modelan el comportamiento para cada molécula se presentan a continuación:

$$\text{mg Honokiol} = 0.258 + 0.0096 P - 0.0102 T - 0.000174 P^2 + 0.000104 T^2 - 0.000006 P (T)$$

$$\text{mg Magnolol} = 0.402 - 0.00744 P - 0.00205 T - 0.000077 P^2 - 0.000054 T^2 + 0.000296 P (T)$$

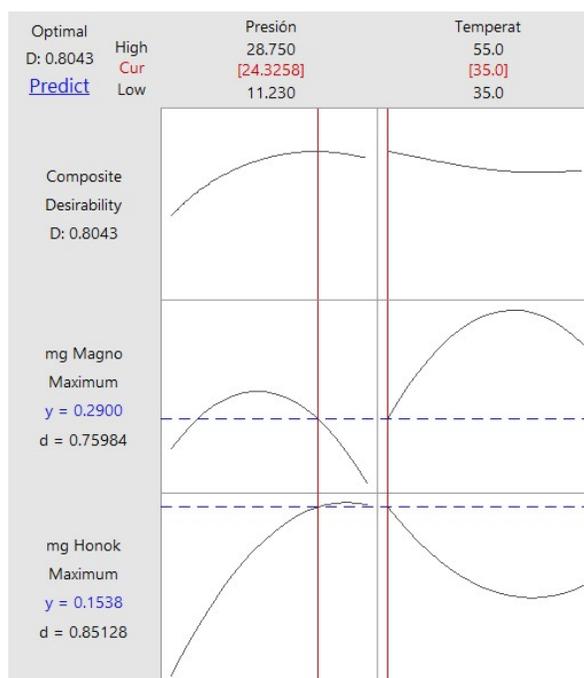


FIGURA 6.6. Valores óptimos dados por MINITAB 17 con puntos centrales de 20 MPa y 45°C.

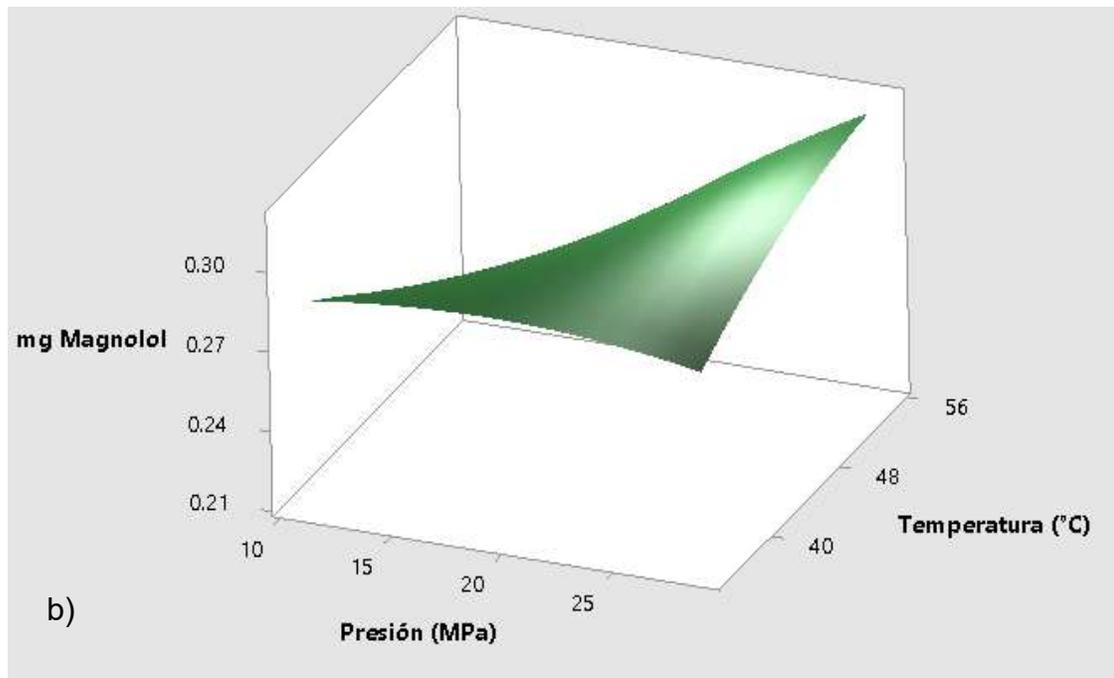
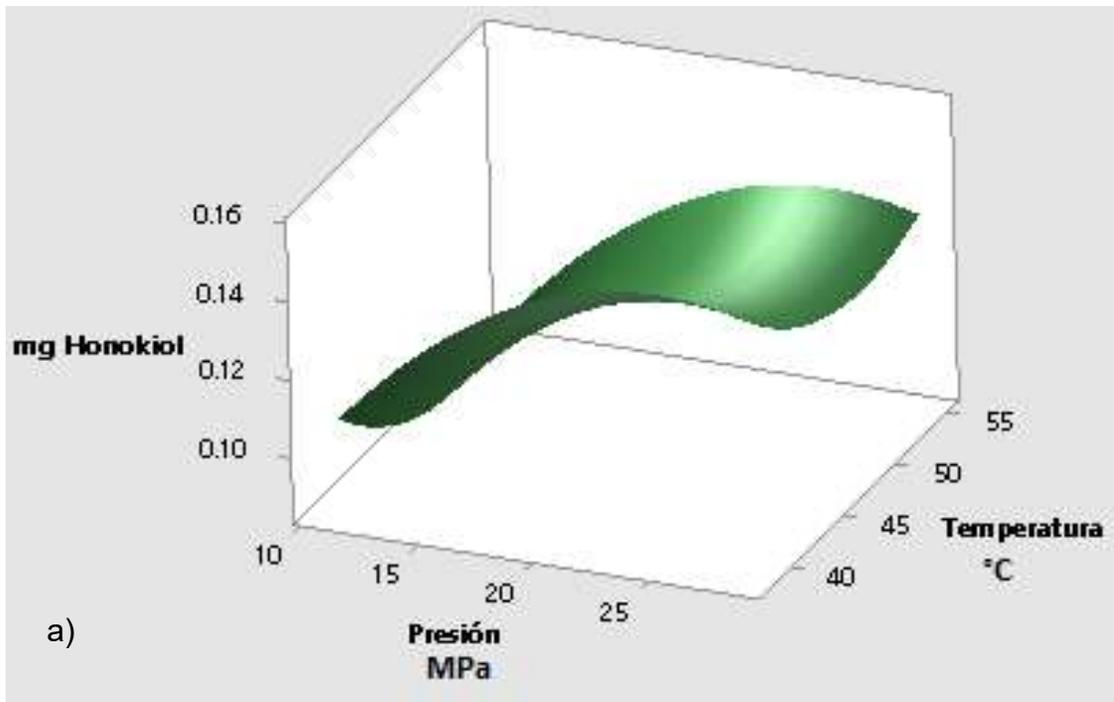


FIGURA 6.7. Superficies de respuesta. a) Superficie de respuesta de Honokiol. b) Superficie de respuesta de Magnolol. Teniendo como punto central 20 MPa y 45°C.

Debido a que los puntos óptimos están en un extremo, se llevó a cabo una segunda serie de experimentos usando el mismo diseño experimental, utilizando las condiciones presentadas en la

tabla 6.4, tomando como puntos centrales los resultados obtenidos en la primera optimización, cuyas condiciones fueron 24.32 MPa y 35°C.

TABLA 6.4. Segundo diseño experimental para optimizar el proceso de extracción supercrítica.

Experimento	Nivel de presión	Nivel de temperatura	Presión (MPa)	Temperatura (°C)
1	0	0	24.32	35
2	0	0	24.32	35
3	0	0	24.32	35
4	0	0	24.32	35
5	0	0	24.32	35
6	0	-1.414	24.32	31
7	1	-1	31.85	32
8	1	1	31.85	38
9	-1	1	16.82	38
10	1.414	0	34.95	35
11	-1	-1	16.82	32
12	0	1.414	24.32	39
13	-1.414	0	13.72	35

Las ecuaciones cuadráticas que modelan el comportamiento para cada molécula a estas condiciones se presentan a continuación:

$$\text{mg Honokiol} = -1.49 - 0.0213 P + 0.121 T - 0.000429 P^2 - 0.00220 T^2 + 0.001117 P (T)$$

$$\text{mg Magnolol} = -3.24 + 0.0093 P + 0.1998 T - 0.000630 P^2 - 0.003155 T^2 + 0.000673 P (T)$$

Las Superficie de respuesta para Honokiol y Magnolol se observan en la figura 6.8.

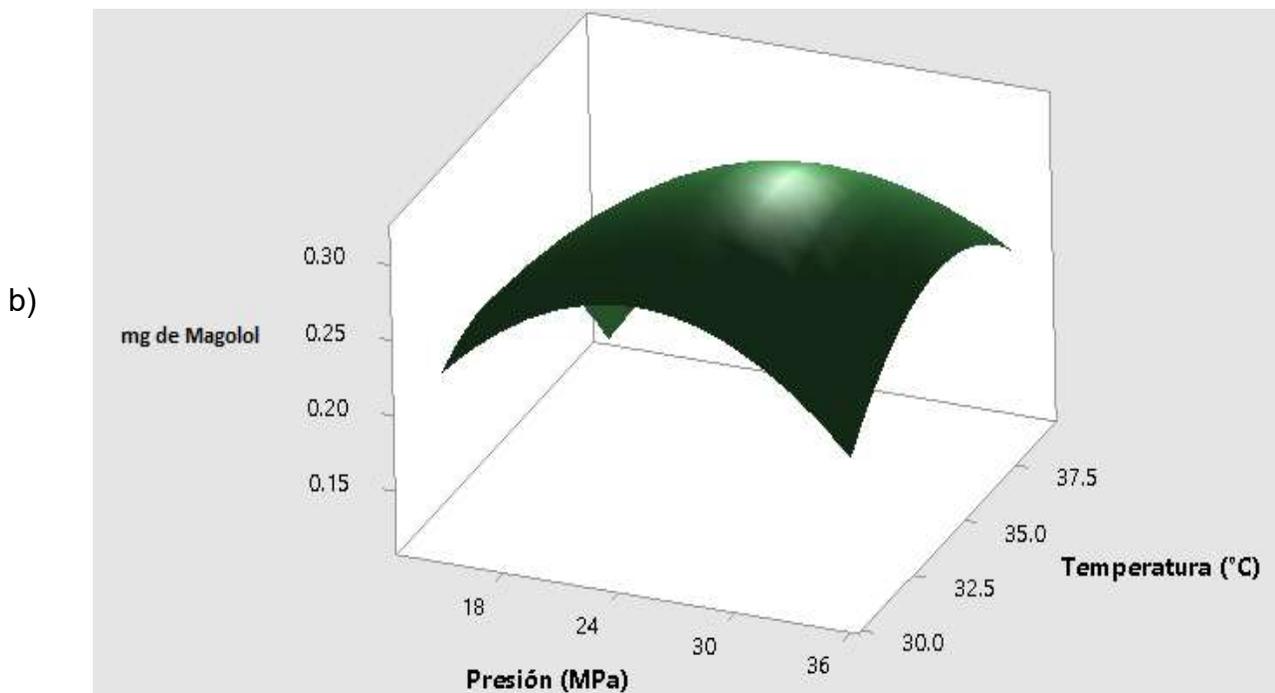
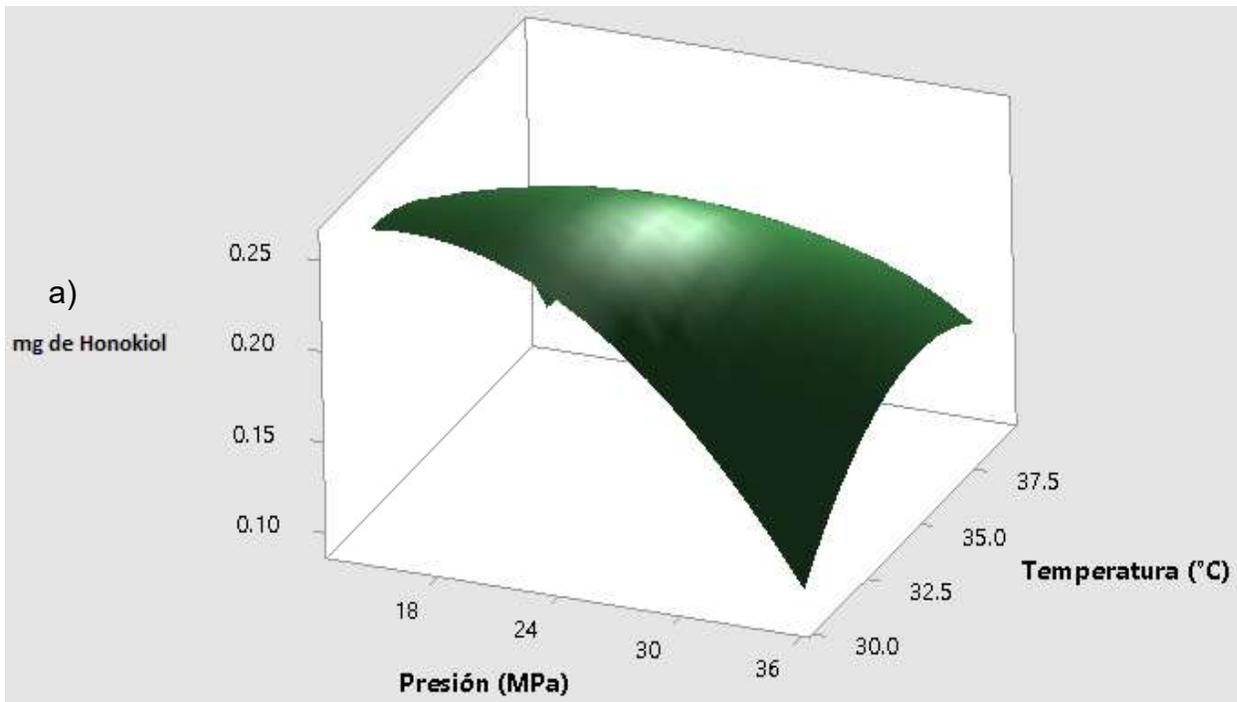


FIGURA 6.8. Superficie de respuesta de Honokiol (a) y de Magnolol (b). Teniendo como punto central Presión de 24.3 MPa y 35°C

Al sustituir la presión (23.15 MPa) y temperatura (33.82°C) óptimas en las ecuaciones cuadráticas se obtiene la concentración de Honokiol y de Magnolol óptimas (figura 6.9).

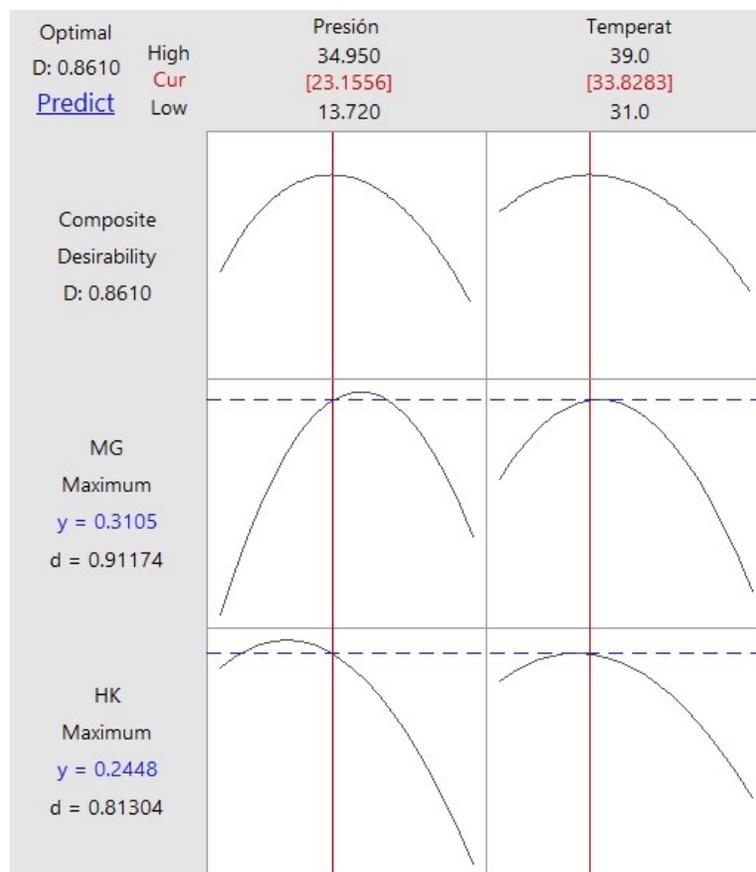


FIGURA 6.9. Valores óptimos dados por MINITAB 17 con puntos centrales de 24.3 MPa y 35°C.

Las condiciones óptimas dadas por ambas superficies de diseño se llevaron a cabo experimentalmente y mediante una comparación de medias se tiene que no hay diferencia significativa entre los resultados teóricos y experimentales ver tabla 6.5.

TABLA 6.5. Miligramos de Honokiol y Magnolol óptimos teóricos y experimentales de los dos diseños experimentales

Diseño experimental	Compuesto	Puntos óptimos teóricos	Puntos óptimos experimentales	% de extracción
		mg de compuesto		
1	Magnolol	0.290	0.285	88.8
	Honokiol	0.154	0.161	54.2
2	Magnolol	0.3105	0.3090	96.26
	Honokiol	0.2448	0.2381	80.17

En la figura 6.9. Se muestran dos cromatogramas HPLC, el del extracto soxhlet, que se trata del extracto de una muestra de 3 g de hoja molida con 4 ml de solución de *Magnolia*, y el del extracto obtenido por CO₂ supercrítico más etanol como cosolvente a 23.15 MPa 33.82°C, y se puede observar que la figura de la extracción por CO₂ supercrítico más etanol contiene menos impurezas que la extracción Soxhlet, por lo que demuestra ser más selectivo en el proceso de extracción.

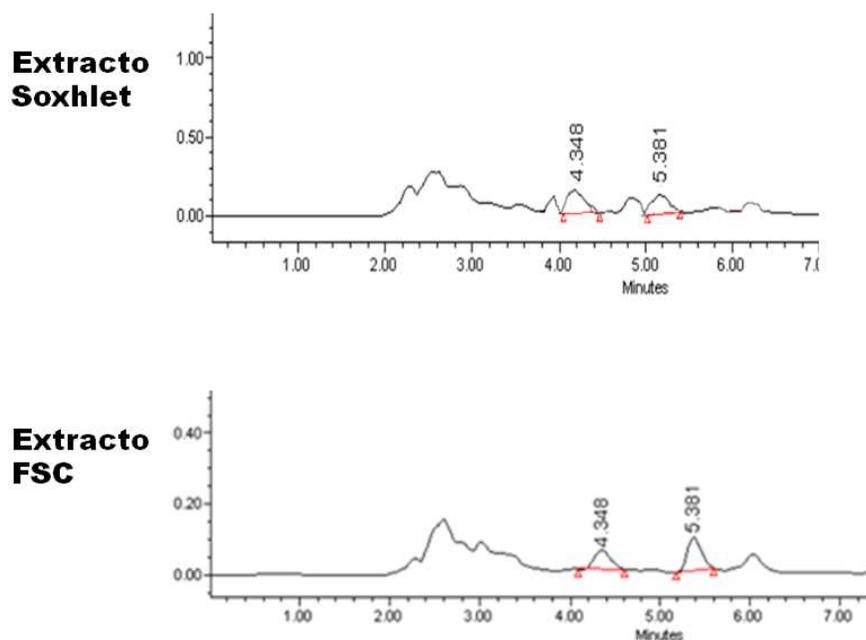


Figura 6.10. Cromatogramas obtenidos del equipo HPLC de extracto Soxhlet y de extracto de fluidos supercríticos.

6.7. Ensayos de proliferación celular

Las charolas con 96 pozos que fueron inoculadas con células MDA y posteriormente tratadas con los extractos de magnolia dieron las lecturas de absorbancia de la tabla 6.6 lectura a las 24 horas después de la inoculación, y en la Tabla 6.7 se muestra la lectura a las 48 horas. Donde el color azul indica los pozos que contienen células viables y las celdas blancas contienen células no viables.

En la figura 6.11 se muestran fotografías del microscopio óptico de las celdas que contienen el extracto de fluidos supercríticos a las 24 horas de incubación, donde se observa que las células dejan de ser viables conforme se aumenta la concentración.

Los datos de absorbancia son mostrados gráficamente en la figura 6.12, donde se observa que conforme se aumenta la concentración del extracto (5, 25, 50, 100, 200 µg/ml) aumenta también el efecto citotóxico en las células MDA, así como también aumenta a las 48 horas.

TABLA. 6.6. Lectura a las 24 horas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.904	0.887	0.858	0.821	0.875	0.884	0.796	0.558	0.764	0.709	0.727	0.807
B	0.77	0.637	0.564	0.845	0.772	0.868	0.88	0.901	0.885	0.755	0.799	0.741
C	0.671	0.662	0.7	0.803	0.779	0.856	0.099	0.102	0.102	0.107	0.198	0.165
D	0.292	0.296	0.304	0.756	0.808	0.749	0.069	0.087	0.104	0.092	0.095	0.088
E	0.074	0.085	0.074	0.578	0.599	0.639	0.07	0.088	0.088	0.098	0.103	0.121
F	0.763	0.752	0.753	0.097	0.089	0.079	0.855	0.814	0.847	0.772	0.401	0.404
G	0.072	0.09	0.095	0.086	0.091	0.09	0.806	0.827	0.812	0.843	0.557	0.306
H	0.091	0.094	0.105	0.837	0.796	0.82	0.797	0.755	0.814	0.399	0.429	0.275

TABLA. 6.7. Lectura a las 48 horas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.384	0.452	0.463	0.616	0.694	0.981	0.848	1.063	1.044	1.132	0.961	1.081
B	0.257	0.332	0.452	0.615	0.816	0.652	0.977	1.01	1.244	1.049	0.84	0.897
C	0.195	0.228	0.263	0.561	0.817	1.051	0.065	0.092	0.08	0.082	0.098	0.089
D	0.079	0.079	0.145	0.609	0.731	0.764	0.073	0.097	0.078	0.101	0.064	0.081
E	0.069	0.061	0.067	0.33	0.376	0.38	0.069	0.063	0.083	0.077	0.07	0.078
F	0.381	0.477	0.76	0.073	0.092	0.071	1.367	1.386	1.171	0.853	0.126	0.146
G	0.062	0.076	0.067	0.092	0.103	0.083	1.421	1.308	1.084	0.221	0.214	0.138
H	0.066	0.073	0.068	0.777	0.916	0.93	1.489	1.096	1.031	0.136	0.131	0.118

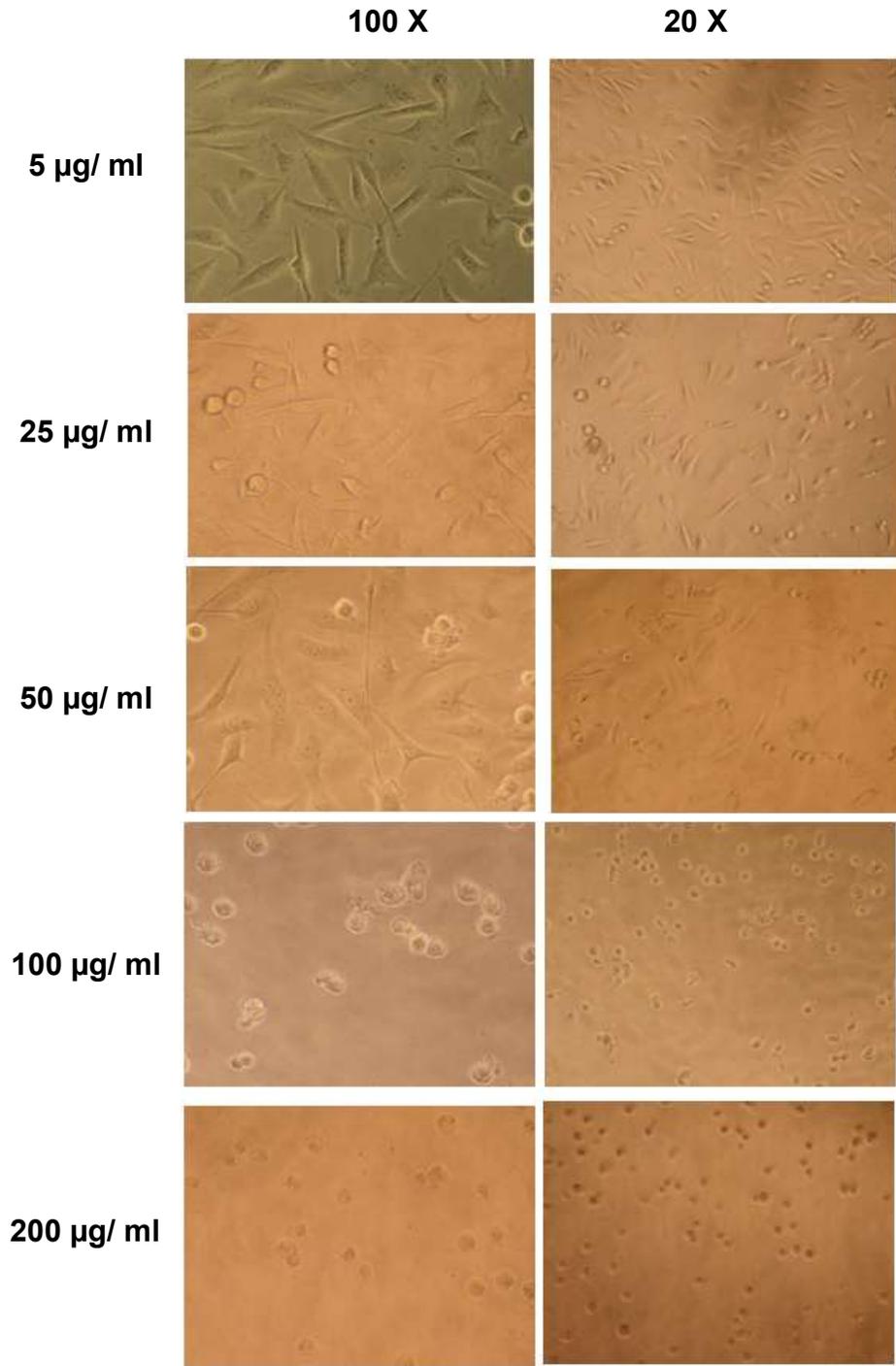


FIGURA 6.11. Fotografías en el microscopio óptico a 20X y a 100X de las células MDA con el extracto de fluidos supercríticos a 5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

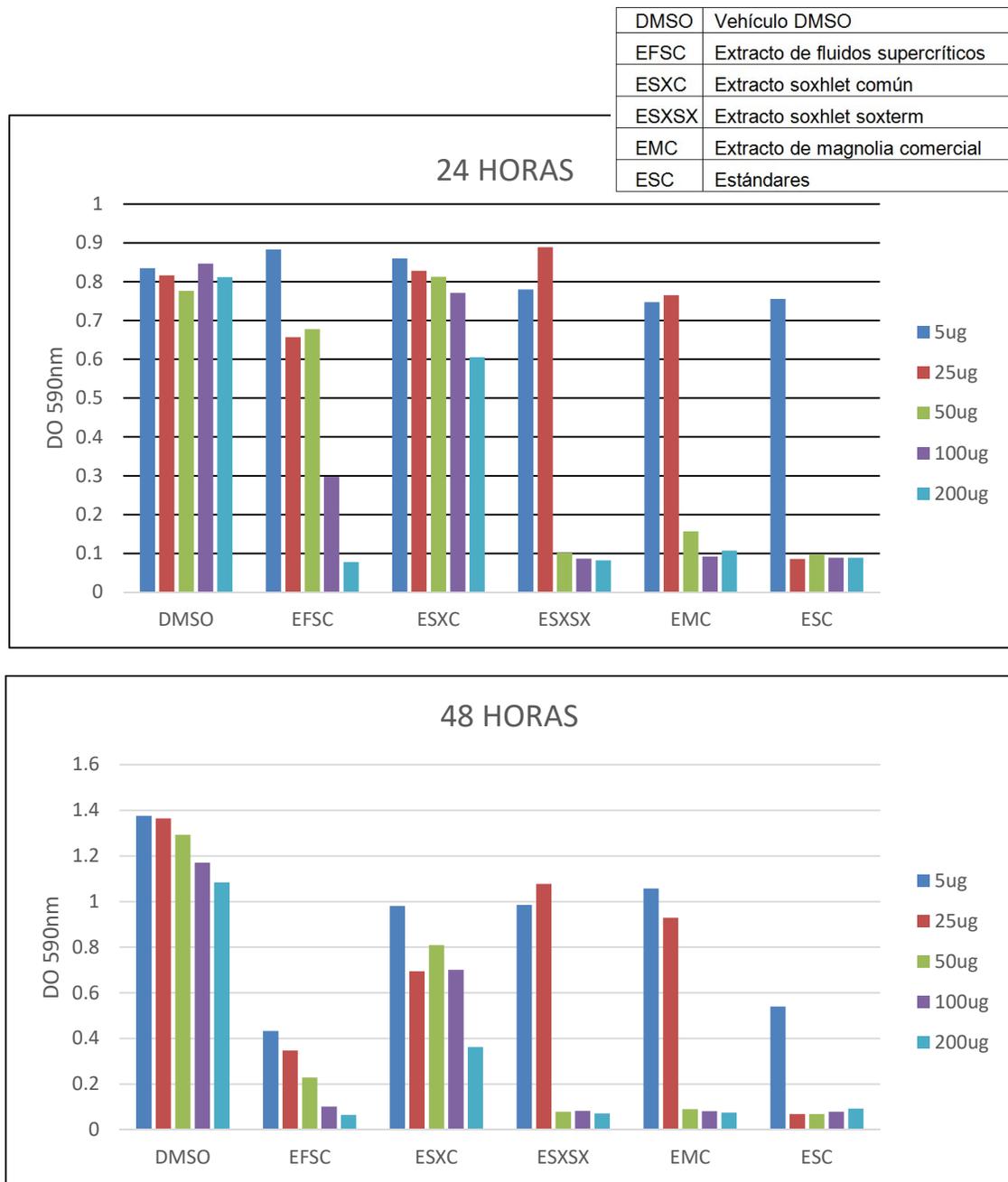


FIGURA 6.12. Densidades ópticas de los extractos. Concentración (5, 25, 50, 100 y 200 µg/ml) en el eje X y densidad óptica en el eje Y, a las 24 y 48 horas de incubación con el ensayo MTT.

7. CONCLUSIONES

Las hojas de *Magnolia grandiflora* cortadas en noviembre de 2015 no contienen Honokiol y Magnolol en concentraciones cuantificables.

El uso de etanol como disolvente acarreador, es necesario para mejorar la extracción de las moléculas de Honokiol y Magnolol, ya que ambas moléculas son ligeramente solubles en CO₂.

El sistema experimental permitió encontrar un punto óptimo de extracción (P=23.15 MPa, T=33.8 °C, t= 30 min), del cual Magnolol es extraído con mayor rendimiento que Honokiol 96.29% y 80.17% respectivamente.

Los ensayos de proliferación celular muestran que los extractos evaluados presentan citotoxicidad en células de cáncer de mama (MDA), además de que es progresiva conforme aumenta la concentración de los extractos, también muestra una mayor citotoxicidad a las 48 horas, por lo que el extracto de fluidos supercríticos se comporta igual a los extractos de Soxhlet, Soxterm, Liftmode y Sigma.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda probar otras partes de la planta de *Magnolia grandiflora*, como son corteza, flores y fruto, haciendo un estudio por estaciones del año, para comprobar si efectivamente esta variedad de magnolia no contiene Honokiol y Magnolol.

Probar otros disolventes a condiciones supercríticas, así como su proporción y estudiar el efecto que presentan sobre el rendimiento de la extracción de Honokiol y Magnolol.

Efectuar ensayos de proliferación celular calculando el IC_{50} para cada extracto, para comparar el efecto citotóxico en el 50% de las células.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, C.J.A., Domínguez, F., Regalado, A.G., Sánchez, I.G., Cerbón, M.A. y Carranca, A.G. (2014). *Magnolia dealbata* sedes extract exert cytotoxic and chemopreventive effects on MDA-MB231 breast cancer cells. *Pharmaceutical Biology*. pp. 1-7.
- Aravind, S. R., Manu, M. J., Varghese, S., balaram, P. y Sreelekha, T.T. (2012). Antitumor and Immunopotentiating Activity of Polysaccharide PST001 Isolated from the Seed Kernel of Tamarindus indica: An InVivo Study in Mice. *The Scientific World Journal*. **361382**. p.p. 14.
- Azab, S. S., Abdel, M. D. y Eldahshan, O. A. (2013). Phytochemical, cytotoxic, Hepatoprotective and antioxidant properties of *Delonix regia* leaves extract. *Medicinal chemistry research*. **22**. 4269-4277.
- Bastidas, B. E., Navarro, N., Quezada, J. D., Ruiz, B., Villanueva, M.T. y Garzon, P. (1998). Anticonvulsant effects of *Magnolia grandiflora* L., in the rat. *Journal of ethnopharmacology*. Vol. **61**. pp.143-152.
- Brunner, G., 1994. Gas Extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes. Springer- Verlag Berlin. Vol. **4**. pp.180.
- Cardenas, S.B.A., López, L.A.R., Martínez, B.B.P., Bermúdez, T.K.y Trejo, T.G. (2012). Avances en la fitoquímica de *Cuphea aequipetala*, *C. aequipetala* var. *hispid*a y *C. lanceolata*: extracción y cuantificación de los compuestos Fenólicos y actividad antioxidante. *Revista mexicana de Ingeniería Química*. **11-3**, pp.401-413
- Centro de Prensa sobre Cancer. Febrero de 2015. Organización Mundial de la Salud. Nota descriptiva No. 297.
- Chiang, Y.L., Ming, C.T., Fu, C. C., Chih, C. C. y Ye, C. H. (1994). Magnolol and honokiol isolated from *Magnolia officinalis* protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation. *Elsevier Science. Biochemical Pharmacology*. **47**. pp. 549-553.
- Clarck, A. M., Feraly, F.S. y Li, W. S. (1980). Antimicrobial activity of fenolic constituents of *Magnolia grandiflora* L. *Journal of Pharmaceutical Science*.Vol. **70**. pp. 951-952.
- Cragg, G. M. y Newman, D.j. (2005), Plants as a source of anti-cancer agents, ELSEVIER, *Journal of Ethnopharmacology*. **100**. Pp. 72-79.
- Del Valle, M. L., Tenorio, L. F. A., Zarco, O. G. y Pastelín, H.G. (2007). Vulgarenol, a sesquiterpeno isolated from *Magnolia grandiflora*, induces nitric oxide synthases II and III overexpression in guinea pig herats. *Journal of Biosciences*. Vol. **62**. pp. 725-730.

- Domínguez, O. M. A., Muñoz, M. O., García, R. R. V., Vázquez, H. M., Gallegos, J. E. y Cruz, S. J. S. (2009). Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Moussonia deppeana*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. **9**. pp. 13-19.
- Esquivel, F. A. y Vargas, P., 2007. Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Tecnología en Marcha*. **20**(4), pp. 41-50.
- Fei, F. E. y Tzi, B. N. (2015). A trypsin inhibitor from rambutan seeds with Antitumor, Anti-HIV-1 reverse transcriptase, and nitric oxide-inducing properties. Springer, *Appl Biochem Biotechnol*. pp.1-15
- Feraly, E.F.S. y Chan, Y.M. (1977). Isolation and characterization of the sesquiterpene Lactone Costunolide, Partenolide, Costunolide Diepoxide, Santamarine and Reynosin from *Magnolia grandiflora* L. *Journal of pharmaceutical sciences*. Vol. **67**(3). pp.347-350.
- Freshney, R.I. (2000), Culture of animal cell. Manual of Basic Technique. John Wiley and Sons Inc. New York. Ed.4. pp. 31-42.
- Guzmán, M.A.S., Carranca, A.G. y Esquinca, A.R.G. (2009). In vitro and in vivo antiproliferative activity of Laherradurin and Cherimolin-2 of *Annona diversifolia* Saff. *Phytotherapy Research*. **23**. pp. 2-6.
- Hendrick, J.L., Mulcahey, L.J. y Taylor, L.T. (1992) Supercritical Fluid Extraction. *Mikrochimica acta*, **108**, pp. 115-132.
- Hernández, C.M.E. (1980). Flora de Veracruz Magnoliaceae. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. Fascículo **14**. pp. 4-6.
- Hoi, C.P., Ho, Y.P., Baum, L. y Chow, A. H. L. (2010). Neuroprotective effect of Honokiol and Magnolol, Compounds from *Magnolia officinalis*, on Beta-amyloid- induced Toxicity in PC12 cells. *Phytotherapy Reserch*. Vol. **24**. pp.1538-1542.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, INEGI (2016). Recuperado de URL:[inegi.org.mx/sala de prensa/aproposito/2016/](http://inegi.org.mx/sala_de_prensa/aproposito/2016/).
- Jacyno, J. M., Montemurro, N., Bates, A. D. y Cutler, H. G. (1991). Phytotoxic and Antimicrobial properties of ciccolorenona de *Magnolia grandiflora* L. *Journal Agriculture Food chem*. Vol. **39** (6) pp. 1166-1168.
- Jennings, W.D., Deutsch, M.H., Zalkow, H.L. y Teja, S.A. (1992). Supercritical Extraction of taxol from the Bark of Taxus Brevifolia. *The journal of supercritical Fluids*, **5**. 1-6.
- Khaizil, E. Z, Aina, N.S. y Mohd D.S. (2013). Preliminary Study on Anti-proliferative Activity of Methanolic Extract of *Nephelium lappaceum* Peels towards Breast (MDA-MB-231), Cervical (HeLa) and Osteosarcoma (MG-63) Cancer Cell Lines. *Health and the Environment Journal*. **4-2**. pp. 66-79.

- Kumarasamy, K.P, Nallaperumal, N., Natarajan, C. y Nallamadan, J. (2014). An *invitro* cytotoxicity study of *Cnidoscopus Chayamansa* Mcvaugh on selected cell lines. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. **3-8**, pp. 1110-1116.
- Leal, F.P., Braga, E.M.M., Sato, D.N., Carvalho, J.E., Marques, M.O.M. y Meireles, M.A.A. (2003). Funtional propieties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Agricultural and food chemistry*. **51**, pp.2520-2525.
- Lim, T. K. (2014). *Magnolia grandiflora*. Edible Medicinal and Non Medicinal Plants. Springer Science. Vol. **8**. pp. 243-275.
- Lopez, A. V., Benedicto, J., Robaugh, D. (1997) Supercritical Fluid Extraction of Oxindole Alkaloids from *Uncaria Tormentosa*.J. High Resol. *Cromatogr*. **20**, 231-236.
- Manu, M. J., Aravind, S.R., Suraj K. G., Pillai, R. K., Mini, S., Sreelekha, T.T. (2014). Antitumor activity of galactoxyloglucan-gold nanoparticles against murine ascites and solid carcinoma. Elsevier. **116**. pp. 219-227.
- Mendiola, L. J. A. (2008) Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos. Tesis doctoral en ciencias. Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Mohamed, S. M., Hassan, E. M. e Ibrahim, N. A. (2010). Cytotoxic and antiviral activities of aporphine alkaloids of *Magnolia grandiflora* L. *Natura Product Research*. Vol.**24** (15). pp. 1395-1402.
- Montañés S. F.O. (2009) Aplicación de la tecnología de fluidos supercríticos a la purificación de carbohidratos prebióticos. Tesis de doctoral en ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Moo, H. V. M., Estrada, M. I., Estrada, L. R., Cuevas, G. L., Ortiz, V. E., Vargas, M.L.V., Betancur, D. A. y Sauri, E. D. (2014). Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. ELSEVIER, *Food Chemistry*. **152**. pp. 508-515.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological Methods*.Vol. **65**. pp. 55-63.
- Ogiu, K. y Morita, M. (1952). Curare-like action of Magnocurarina, islated from *Magnolia Obovata*. *The Japanese Journal of Pharmacology*. Vol. **2** (2) pp. 89-96.
- Ordoñez, F.A., Parada, F., Rojas, N.Y. y Rodríguez, I. (2006). Estudio comparativo de la extracción de cafeína con CO₂ supercrítico y acetato de etilo. Revista de ingeniería. Universidad de los Andes. No. **24**. pp. 34-42.
- Organización Mundial de la Salud, OMS (2017). Cancer, Datos y cifras. Recuperado de URL: who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es.

- Padilla, F. C., Rincón, A. M. y Rached, L. B. (2008). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Vol. **58** (3). pp. 303-308.
- Palos, S. G. M. R. (2007). Evaluación de la actividad antioxidante de la chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) en un modelo experimental de diabetes en ratas wistar. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada Unidad Querétaro.
- Pereira, G.C. y Meireles, M. A. A. (2010). Supercritical fluid extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. Springer, 3, 340-372.
- Qiang, W, Manish, K., Bergen III, H. R., Cheville, J.C., Karnes, R.J., Hong, C., Young, C.Y.F., Tindall, D.J., McNiven, M.A. y Donkena, K.V. (2014) Preclinical Evaluation of the supercritical Extract of *Azadirachta indica* (Neem) Leaves in vitro and in vivo on inhibition of prostate cancer tumor growth. *Molecular Cancer therapeutics*. Pp. 1067-1077.
- Rodríguez, V.M., Sousa, E.M.B.D., Monteiro, A. R., Filho, O.C., Marques, M.O.M, Mereiless, M.A.A. (2002). Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO₂: a Pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure+ solute+ solvent. ELSEVIER. The journal of supercritical fluids. **22**, 21-36.
- Téllez, A. A. N., Castro, C., Riveros, M. T. y Torrenegra, R. (2006). Efectos citotóxicos *in vitro* de extractos y fracciones de *Espeletia killipii* Cuatr: frente a líneas celulares tumorales humanos. *Brazilian Journal of pharmacognosy*. Vol. **16** (1) pp. 12-16.
- Tello, J., Viguera, M., Calvo, L. (2011). Extraction of caffeine from Robusta coffee (*Coffea canephora* var. Robusta) husks using supercritical carbon dioxide. ELSEVIER, Journal of Supercritical Fluids. **59**. pp. 53-60.
- Tsai, T., Chen, C. (1992). Identification and determination of honokiol and magnolol from *Magnolia officinalis* by high-performance liquid chromatography with photodiode-array UV detection. ELSEVIER, *Journal of Chromatography*. **598**. pp. 143-146.
- Serna, G. M., Guzman, V.J.D. (2010). Una Mirada a las Magnoliaceas. *Revista Politecnica*. Vol. **11** pp 105-111.
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de Tecnología de productos fitoterapeúticos. Convenio Andres Bello-Cooperación Iberoamericana y CYTED. pp. 17-25.
- Stockert, J. C., Blázquez, C.A., Blázquez, C.A., Cañete, M., Horobin, R. W. y Villanueva, A. (2012). MTT assay for cell viability, intracellular localization of the formazan products is in lipid, Droplets. *Acta histochemica* Vol. **114** pp. 785-796.

Suto, K., Ito, Y., Sagara, K., Itokawa, H. (1997). Determination of magnolol and honokiol in Magnoliae Cortex using supercritical fluid chromatography on-line coupled with supercritical fluid extraction by on-column trapping. ELSEVIER, *Journal of Chromatography*. **786**. pp. 366-370.

Uscanga, P.A.C. (2014). Efecto citotóxico de los extractos acuoso y metanólico de *Cuphea aequipetala*, sobre líneas celulares de cáncer y un modelo murino. Tesis de maestría UANL, Facultad de ciencias biológicas.

Vázquez, F. L. (2009). Extracción con fluidos supercríticos y síntesis enzimática para la obtención de lípidos funcionales. Tesis doctoral en ciencias. Universidad Autónoma de Madrid, España.

Villavicencio, N.M.A., Pérez, E.B.E. y Mendoza, P.E. (2008) Citotoxicidad en células HeLa de extractos de tres especies de plantas medicinales de Hidalgo, México. *Polibotánica*. **26**. pp. 137-147.

Xie, J., Li, H., Zhu, X., Wang, P., Su, W. (2011). Efficient and selective Extraction of magnolol de *Magnolia Officinalis* by mechanochemical extraction technique. Elsevier. *Chemical Engineering and processing*. **50**, 325-330.

Zuñiga, M. A. (2006). Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Iserfia laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Tesis doctoral en ciencias. Instituto politécnico Nacional. México.

APENDICE A

Se siembran células de MDA (cáncer de mama) en medio DMEM en un tubo Corning de la siguiente manera:

1. Se desecha el medio contenido en el tubo.
2. Se lavan las células contenidas en el tubo utilizando PBS.
3. Se despegan las células de las paredes del tubo usando tripsina e inmediatamente se agrega un ml de DMEM, se centrifuga 1 min a 2000 rpm (40 cm de diámetro), se desecha el sobrenadante.
4. Se resuspende con 5 ml de DMEM y se disuelven bien, posteriormente se toma una alícuota y se coloca en cámara de Neubauer con azul de tripano Para diferenciar las células viables, a las cuales se les tiñe de azul la pared celular. Se cuentan las células viables para diluir en DMEM para obtener un total de 5000 células por pozo.
5. Se efectúan diluciones de DMSO para obtener las mismas concentraciones de este compuesto utilizado por cada extracto (5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$), colocándolas en los pozos por triplicado.
6. Se efectúa una curva de Cisplatino utilizando 6 concentraciones (2.5, 20, 45,65, 80 y 100 $\mu\text{g/ml}$).
7. Posteriormente se llenan dos charolas con 96 pozos, y se incuban por 24 a 37°C (Figura A1).
8. Pasadas las 24 horas se procede a agregar las concentraciones anteriormente calculadas de extracto, DMSO y Cisplatino, para lo cual previamente se elimina el medio contenido en las charolas. Las codificaciones en las charolas con las diferentes concentraciones de los extractos se muestra en la tabla 5.4.



FIGURA A1. Llenado de charola con 96 pozos.

9. Se Incuba una charola por 24 horas y otra por 48 horas.
10. Pasadas las 24 horas se elimina nuevamente el medio contenido en las charolas y se agrega la solución de MTT (Figura A2).
11. Posteriormente se incuba la charola por 3 horas. Pasado el tiempo se retira la solución de MTT y se agrega DMSO agitando suave pero homogéneamente la charola (Figura A3).
12. Finalmente se leen a 590 nm en un espectrofotómetro marca Epoch (Figura A4).

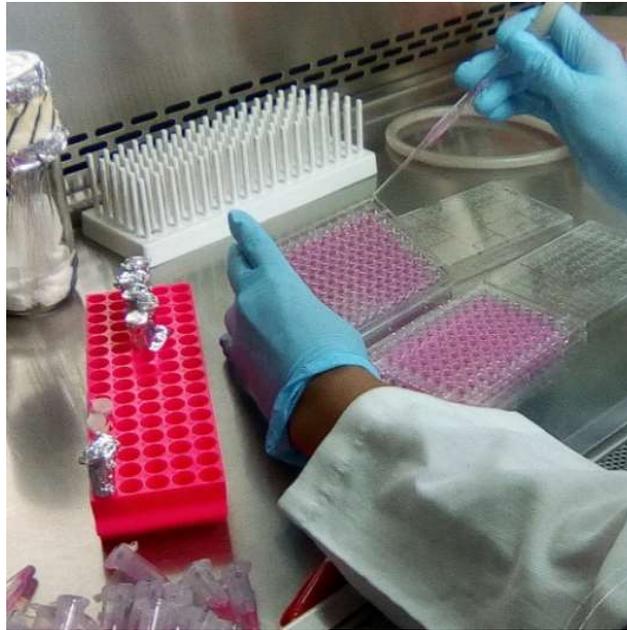


FIGURA A2. Se aspira el medio DMEM antes de agregar MTT

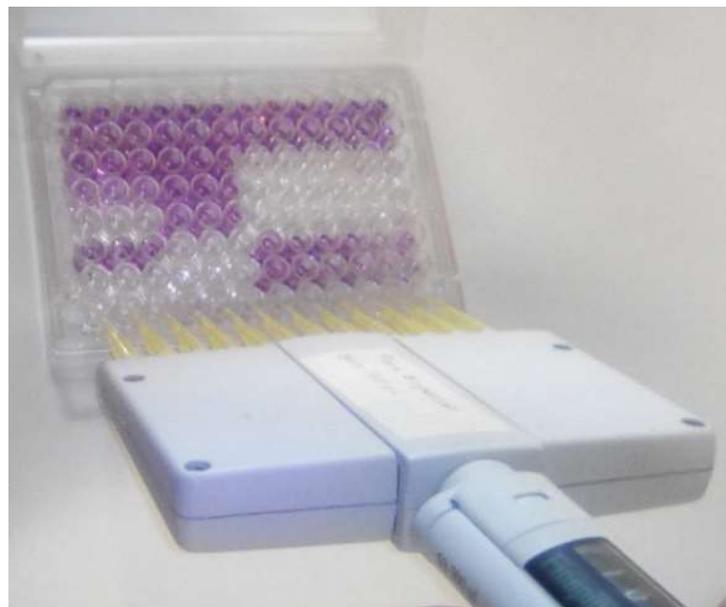


FIGURA A3. Se agrega MTT en charolas de 96 pozos.



FIGURA A4. Lectura de Charola de 96 pozos con MTT en espectrofotómetro Epoch.