

ISSN

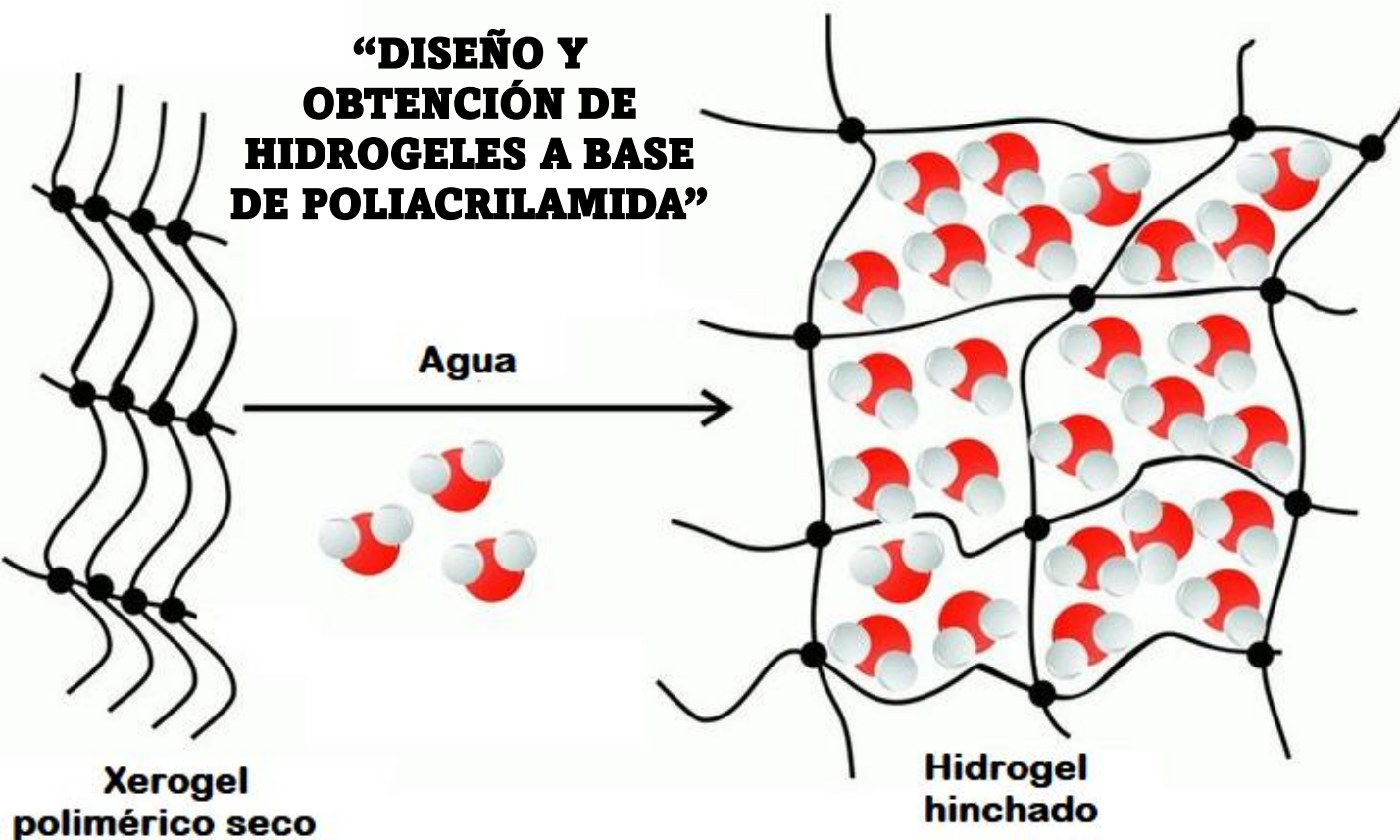
2954-3444

Revista SNIQBA



Revista de la Sociedad Nacional de Ingeniería
Química y Bioquímica Aplicada, A.C.

**“DISEÑO Y
OBTENCIÓN DE
HIDROGELES A BASE
DE POLIACRILAMIDA”**



Rev. SNIQBA

Vol. 2, No. 2

Agosto-Diciembre, 2023

www.sniqba.com.mx/journal

Semestral.

DERECHOS DE AUTOR

Las Figuras, calidad de los esquemas y la contenidos generales de esta publicación son de plena responsabilidad de los autores.

Prohibida su reproducción total o parcial sin permiso escrito del titular del derecho.

Información legal

REVISTA SNIQBA, año 2 No. 2, Agosto - Diciembre 2023, es una Publicación semestral de investigación multidisciplinaria relacionada con las ingenierías Química y Bioquímica, editada por la Sociedad Nacional de Ingeniería Química y Bioquímica Aplicada, A.C., Carretera a Cedral KM 5+600, Ejido San José de las Trojes, Matehuala, SLP, C.P. 78700, Tel. +52(488)1290604, www.sniqba.com.mx/journal/, Editor responsable: Víctor Manuel Ovando Medina. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2022-041412005500-102, ISSN: “**2954-3444**”, ambos entregados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este Número, Víctor Manuel Ovando Medina, Carretera a Cedral KM 5+600, Ejido San José de las Trojes, Matehuala, SLP, C.P. 78700, fecha de última modificación, 21 de diciembre de 2023.

Indizada en
Latindex
Folio: 27577

Volumen 2, No. 2
2023, MEXICO

Revista SNIQBA es una publicación sobre conocimiento relevante y reciente de cualquier campo de interés en Investigación de la Ingeniería Química y Bioquímica.

Rev. SNIQBA es revisada por pares que publica:

- Artículos originales de investigación
- Comunicaciones cortas
- Estudios de caso
- Actas en suplementos (artículos completos de congresos del área de Ingeniería Química y Bioquímica)

Rev. SNIQBA es una publicación semestral sin fines de lucro; Se solicita una tarifa de recuperación de \$72 USD (\$1200 MX) para la publicación solamente después de ser aceptados.

Revista SNIQBA

Indizada en **Latindex**
Folio: 27577

ISSN:
2954-3444

**Arbitraje Vol. 2, No. 2,
Agosto-Diciembre 2023**

***Revista
SNIQBA***

- Dra. Isidro Palos Pizarro, UA de Tamaulipas
- Dra. Aidé Sáenz Galindo, UAdeC
- Dra. Sonia Ruiz González, UA de Chiapas
- Dra. Rosa Eréndira Fosado Quiroz, UASLP
- Dr. Miguel Ángel Corona Rivera, UASLP
- Dra. Iveth D. Antonio Carmona, UAAAN
- Dra. Elsa Cervantes González, UASLP

ISSN:

2954-3444

EDITOR EN JEFE

Dr. Víctor M. Ovando-Medina

SECCIONES

- **Materiales:** Biomateriales, Nanoestructuras, Polímeros, Cerámicos y Compositos, Impresión 3-D aplicado a la ingeniería Química
- **Bio-procesos:** Ingeniería de Bioprocesos, Biotecnología Médica, Biotecnología de Alimentos y Biotecnología Ambiental
- **Procesos:** Simulación y control, Optimización de procesos químicos, Diseño y Modelado, Cinética y diseño de reactores y Procesos de separación
- **Ambiental:** Sustentabilidad, Remediación, Prevención y control y Catálisis.
- **Sustentabilidad Energética:** Fuentes alternas de energía, Políticas Energéticas
- **Alimentos:** Nutrición, Fisicoquímica de alimentos, Inocuidad de alimentos y Tecnologías emergente

Rev. SNIQBA

ISSN:

2954-3444

ÍNDICE

Página

Rev. SNIQBA

EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ROSMARINUS OFFICINALIS AND THYMUS VULGARIS: COMPARISON OF CONVENTIONAL VS. MICROWAVE METHOD

1-9

Juanita Daria Flores Valdez, Adali Oliva Castañeda Facio, Claudia Magdalena López Badillo, Felipe Avalos Belmontes, Juan Alberto Ascacio Valdés, Sandra Cecilia Esparza González, Aidé Sáenz Galindo

OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LAVANDULA Y ROSMARINUS OFFICINALIS, EMPLEANDO EXTRACCIÓN CONVENCIONAL Y NO CONVENCIONAL

10-18

Wendy Yaneth Villastrigo López, Aide Sáenz Galindo, Miriam Desiree Dávila Medina, Adali Oliva Castañeda Facio, Christian Javier Cabello Alvarado

DISEÑO Y OBTENCIÓN DE HIDROGELES A BASE DE POLIACRILAMIDA: ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE HINCHAMIENTO

19-28

José Juan Cedillo-Portillo, Jesús Guillermo Soriano-Moro, María Teresa Zayas-Pérez, Valeria Jordana González-Coronel, Miriam Vega Hernández

ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD Y COMPORTAMIENTO DINÁMICO DE UNA COLUMNA DE DESTILACIÓN PARA UNA MEZCLA AZEOTRÓPICA

29-39

Moisés Lobatón Montiel, Elsa Hynmar Fernández Martínez, Brian Manuel González Contreras

ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS FÍSICOQUÍMICOS QUE SE PRESENTAN EN UNA INFUSIÓN AL VARIAR LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

40-47

Monica Rivera Rivera, Marco Antonio Godínez Ruíz, Rebeca Gloria Tejada, Martha Patricia Valencia Pérez, Betsabe Hernández Santos

IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIABLES FÍSICOQUÍMICAS QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE PHB POR *Bacillus megaterium* MNSH1-9K-1

47-55

Andrea Margarita Rivas-Castillo, Brandon Daniel Pérez-García, María del Carmen Escutia-León, Norma Gabriela Rojas-Avelizapa

ISSN:

2954-3444

Vol. 2, No. 2

Ago-Dic 2023,

MEXICO

EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM *ROSMARINUS OFFICINALIS* AND *THYMUS VULGARIS*: COMPARISON OF CONVENTIONAL VS. MICROWAVE METHOD

EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* Y *THYMUS VULGARIS*: COMPARACIÓN DEL MÉTODO CONVENCIONAL CONTRA MICROONDAS

Juanita Daria Flores Valdez¹, Adali Oliva Castañeda Facio¹, Claudia Magdalena López Badillo¹, Felipe Avalos Belmontes¹, Juan Alberto Ascacio Valdés¹, Sandra Cecilia Esparza González², Aidé Sáenz Galindo^{1*}.

¹Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Saltillo, Coahuila, México

²Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Odontología, Saltillo, Coahuila, México

E-mail: aidesaenz@uadec.edu.mx

Received: August 24, 2023

Revised: September 27, 2023

Accepted: October 29, 2023

Abstract

Rosmarinus officinalis L. (rosemary) and *Thymus vulgaris* L. (thyme) are Mediterranean plants that have demonstrated diverse properties (antimicrobial, antioxidant, antiseptic, anti-inflammatory, etc.), thanks to which the extracts of these plants are used for different applications. However, to obtain a good extraction yield, as well as bioactive compounds, it is necessary to determine the extraction methodology. The extraction methods most frequently used are conventional (maceration, Soxhlet distillation, etc.). However, non-conventional methods, such as microwaves or ultrasound, have been utilized due to being considered green energies since the use of these methods can reduce extraction time and improve yields. Therefore, in this research, ethanolic extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* were obtained using two different extraction techniques, one conventional (solid-liquid) and the other assisted with microwaves. The bioactive compounds present in the extracts were rosmarinic, carnosic, caffeic acids, rosmanol, quercetin, and luteolin. These were identified by FTIR-(ATR) and HPLC. The extracts demonstrated heat resistance above 200 °C. The extracts MRE, CRE, and CTE showed a better inhibition to *E. coli*, whereas the ETC extract showed a better inhibition of *S. aureus*. Due to the results obtained, both extraction methods are reliable for obtaining bioactive compounds from plants of the Lamiaceae family, compounds that could be used in food, cosmetics and/or pharmaceuticals.

Keywords: Rosemary, Thyme, Extracts, Bioassays

Resumen

Rosmarinus officinalis L. (romero) y *Thymus vulgaris* L. (tomillo) son plantas mediterráneas las cuales han demostrado poseer diversas propiedades (antimicrobianas, antioxidantes, antisépticas, antiinflamatorias, etc.), gracias a las cuales, los extractos de estas plantas han sido utilizados en diferentes aplicaciones. Sin embargo, para lograr obtener un buen rendimiento de extracción, así como, compuestos bioactivos, es necesario determinar

bien la metodología de extracción. Los métodos de extracción más comúnmente empleados son los convencionales (maceración, destilación Soxhlet, etc), por otro lado, se han utilizado métodos no convencionales como lo es el microondas o el ultrasonido, gracias a que se consideran energías verdes, ya que con el uso de estos se puede reducir el tiempo de extracción y mejorar los rendimientos. Por lo que, en esta investigación se obtuvieron extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris*, mediante dos técnicas de extracción diferentes, una convencional (sólido-líquido) y otra asistida con microondas. Los compuestos bioactivos presentes en los extractos fueron ácidos rosmarínico, carnósico, cafeico, rosmanol, quercetina, luteoil, etc. Los cuales fueron identificados mediante FTIR-(ATR) y HPLC. Todos los extractos demostraron una resistencia térmica por encima de los 200 °C. Los extractos de MRE, CRE y CTE obtuvieron una mejor inhibición frente *E. coli*, mientras que para *S. aureus* fue el extracto ETC. Debido a los resultados obtenidos, ambos métodos de extracción son confiables para la obtención de compuestos bioactivos a partir de plantas de la familia Lamiaceae, para el área de alimentos, cosmética y/o farmacéutica.

Palabras clave: Romero, Tomillo, Extractos, Bioensayo

Introduction

Mediterranean plants have attracted great interest from different researchers due to the beneficial characteristics they have been shown to possess, attributed to their high content of bioactive compounds, the main ones being polyphenols and carotenoids (Munekata et al., 2020), among them are properties such as antiviral (Sanna et al., 2015), antimicrobial, antioxidants (Alirezalu et al., 2020), anti-inflammatory (Conforti et al., 2008), etc.

The Lamiaceae family are Mediterranean plants that are widely used for culinary purposes, as spices, conservators, and antioxidants, as well as in medicine, like antiseptic, due to the wide variety of phytochemicals they contain (Calinescu et al., 2017; Milevskaia et al., 2017). Specifically, *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus vulgaris* L., commonly called rosemary and thyme, respectively, are plants native to the Mediterranean basin and are widely used as food flavoring and conservatives (Calinescu et al., 2017). Moreover, they are well known for their antibacterial, antifungal, antioxidant (Ojeda-Sana et al., 2013; Vallverdú-Queralt et al., 2014), anti-inflammatory, antiviral, antimutagenic, antiseptic, insecticidal properties (Calinescu et al., 2017).

Extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* are commonly rich in bioactive compounds. *Rosmarinus officinalis* are mainly rosmarinic acid and carnosic acid (Jacotet-Navarro et al., 2016), whereas *Thymus vulgaris* typically contains rosmarinic acid, caffeic acid, hydroxybenzoic acid (Vallverdú-Queralt et al., 2014). However, the constitution of bioactive compounds in the extract depends on different factors, such as extraction method, extracting solvent, temperature, pressure, time, part of the plant, etc. (Andrade et al., 2018).

Therefore, the extraction technique is the key to obtaining an efficient process with high yields. The most common methods used are conventional (maceration, Soxhlet extraction, solid-liquid extraction, hydrodistillation, etc.). Nevertheless, new extraction techniques, considered more eco-friendly, have been developed and used in recent years, including microwave-assisted and ultrasound-assisted extraction (Elyemni et al., 2019; Moreira et al., 2017).

The bioactive compounds obtained from the extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris*, regardless of the extraction method, can be used in different areas, such as in food for the development of packaging materials, storage (Stahl-Biskup & Venskutonis, 2012), cosmetics as skin conditioning agents or as fragrance ingredients (Fiume et al., 2018), in pharmaceuticals as antiseptics, anti-inflammatories (Alu'datt et al., 2018), etc.

Therefore, in this research, the ethanol extraction of bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris*. Through two different methodologies, one conventional (solid-liquid extraction) and the other microwave-assisted, to compare both extraction methods for their potential use in food, cosmetics and/or pharmaceutical applications.

Experimental section

The leaves and stems of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* were used to obtain the bioactive compounds. These were dried at room temperature and subsequently ground. Then, 100 g of the plant was placed in a reactor, and 1 L of absolute ethanol was added. The conditions for the conventional method (MC) were 70 °C for 30 min with magnetic

stirring of 600 rpm, while for the microwave method (MM) 70 °C for 30 min at 800 W. They were then filtered and rota evaporated to obtain the bioactive compounds from each plant (*Rosmarinus officinalis* extract by microwave (MRE), *Rosmarinus officinalis* by conventional (CRE), *Thymus vulgaris* by microwave (MTE) and *Thymus vulgaris* by conventional (CTE)).

The yield percentage, as well as the extraction conditions, are described in Table 1.

Table 1. Conditions and extraction yields by MC and MM.

Plant	Microwave	Yield (%)	Conventional	Yield (%)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	30 min, 70 °C, 800 W	8	30 min, 70 °C, 600 rpm	15
<i>Thymus vulgaris</i>	30 min, 70 °C, 800 W	5	30 min, 70 °C, 600 rpm	8

The extracts obtained were analyzed by infrared spectroscopy (IR Spectrum spectrophotometer, GX-Perkin-Elmer employing the Attenuated Total Reflection (ATR) technique, using a diamond tip attachment, FTIR-(ATR)), high-performance liquid chromatography (Varian Prostar, with diode array detector (280 nm). 1.8 mL of sample was filtered (0.45 µm membranes). Separation of the compounds was performed on a Grace Denali c-18 column at 30 ° C. Mobile phase A was methanol (wash), B acetonitrile, and 3% acetic acid C, flow rate 1 mL/min, and injection volume 10 µL. Mass analysis was performed using a Varian 500-MS ion trap, electrospray ionization (ESI), capillary voltage 90 V, negative mode ([M-H] - m/z), and mass acquisition range 100-2000 m/z, HPLC-MS). For this thermogravimetric analysis (TGA), a TA instruments Q500 thermal analyzer was used, with a heating rate of 10 °C/min and a temperature range of 30-800 °C. Bioassays of antimicrobial activity were carried out against *E. coli* and *S. aureus*, for which dilutions of the cultures of the pathogenic bacteria were made up to 1x10⁻³. Then, 300 µL of the last dilution was placed with a 1000 µL automatic pipette (SCILOGEX brand) on the Petri dish with nutrient agar, spread with a sterile isopod, and finally, four sterile filter paper disks were placed on the Petri dish, and 7 µL of the extract were placed on each one, each extract was evaluated in duplicate with the different bacteria to obtain a total of eight replicates, these were left incubating for 24 h and after this time was observed to verify the presence or absence of inhibition,

determined by a halo of inhibition around the disc, compared with the control.

Results

FTIR-(ATR) analysis was carried out to know the functional groups present in the samples. Figure 1 shows the IR spectra of *Rosmarinus officinalis* extracts, where influential bands with wave numbers at 3351 cm⁻¹ vibration of -OH bond, 2919 cm⁻¹ stretching of -CH₃, 2850 cm⁻¹ stretching of -CH₂, 1685 cm⁻¹ vibration of C=O, 1453 cm⁻¹ tension of C=C bond, 1274 cm⁻¹ vibration of O-H and at 1031 cm⁻¹ stretching of C-O are observed. This coincides with what was reported by Mohammed et al. in 2022; in their research, they performed extracts of rosemary, using absolute ethanol as solvent, and the FTIR analysis presented main bands at 3299 cm⁻¹ attributed to the presence of alcohol, at 2922, 2832, 2993, 2981 cm⁻¹ coming from the -CH₃ and -CH₂ groups present in chlorophyll groups and 1152, 11029 and 1057 cm⁻¹ the vibration of the C-O bond due to the presence of acids in the sample (Mohammed et al., 2023). Also, Hameed, et al. and Piñeros et al. report that these bands are due to the presence of rosmarinic and carnosic acid, which are the most frequently extracted in rosemary ethanolic extracts (Hameed et al., 2015; Piñeros Hernández et al., 2017).

The infrared spectra for *Thymus vulgaris* are presented in Figure 2. In these, important bands are observed at wavenumbers 3337 cm⁻¹ due to the vibration of the -OH bond, 2924 and 2850 cm⁻¹ due to the stretching of the -CH₃ and -CH₂ bonds, respectively; 1688 cm⁻¹ the tension of the C=O bond, 1447 cm⁻¹ the stretching of C=C, 1268 cm⁻¹ the vibration of the C-C bond, 1030 cm⁻¹ stretching of the C-O bond and 806 cm⁻¹. Ardjoum and collaborators, in 2021, performed ethanolic extractions of thyme, where they reported bands with wave numbers at 3407, 2962, 2876, 1614, 1422, and 811 cm⁻¹. They mention that the bands between 1614 and 1422 cm⁻¹ are assigned to the phenolic ring present in the thymol. In addition, the peak at 811 cm⁻¹ is due to vibrations of the C-H bond coming from an out-of plane aromatic ring (Ardjoum et al., 2021).

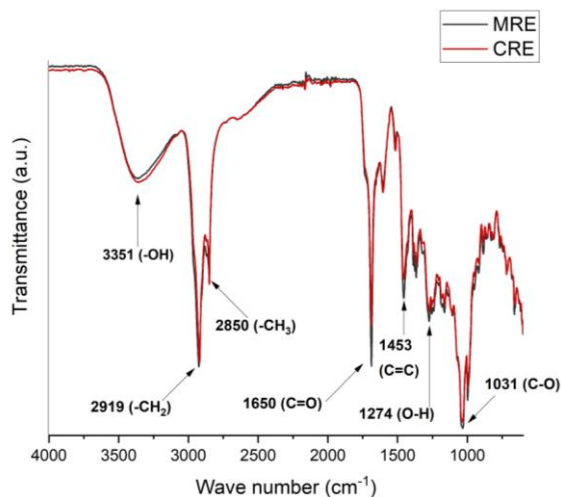


Figure 1. FTIR-ATR spectra of *Rosmarinus officinalis* extracts.

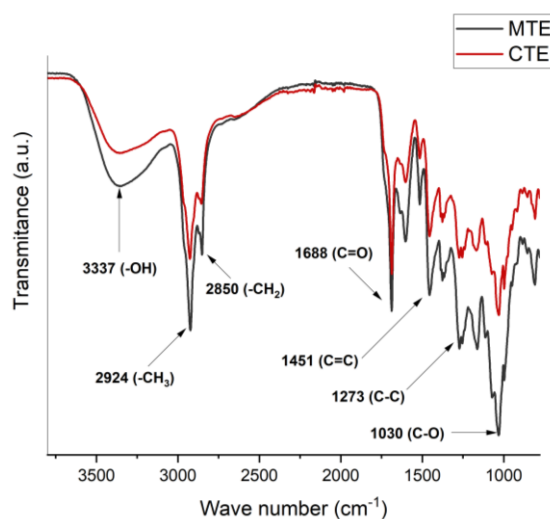


Figure 2. FTIR-ATR spectra of *Thymus vulgaris* extracts.

Thus, according to the results obtained, it is possible to elucidate that the extracts contain phenols, which are considered to be one of the main components responsible for the antimicrobial activity of the extract (Cervilla et al., 2012; Nasrollahzadeh et al., 2016).

HPLC-MS analysis was then performed to determine the family and compounds present

in each of the extracts. Table 2 and 3 describes each compound and family found for each extract. The compounds identified by HPLC for both extracts using the different extraction methodologies were mainly rosmarinic acid, rosmanol, caffeic acid, coumarin, quercetin, luteolin, carnosic acid, and hydroxybenzoic acid. These results are similar to what is reported in the literature, with the main

bioactive compounds present in *Rosmarinus officinalis* being rosmarinic acid, rosmanol, carnosol, caffeic acid, luteolin, ferulic acid, quercetin, coumarinic acid, catechol, hydroxybenzoic acid, vanillic acid, cinnamic acid (Ezzat et al., 2016; Hisham et al., 2022; Kanakidi et al., 2022; Luță et al., 2023). And for *Thymus vulgaris* extract the most frequently found bioactive compounds are rosmarinic acid, quercetin, coumarinic acid, caffeic acid, rutin, quercetin, gallic acid, ferulic acid, catechol, luteolin, hydroxybenzoic acid, among others (Luță et al., 2023; Shahar et al., 2023).

The thermograms of the extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* are presented in Figure 3. The thermal stability of the extracts was determined by this analysis (TGA). In the case of the *Rosmarinus officinalis* extract, a degradation temperature of approximately 224 °C was obtained. This is similar to that reported by Piñeros et al. who obtained an ethanolic extract of rosemary by a conventional method, which presented degradation above 200 °C (Piñeros Hernandez et al., 2017). Moreover, *Thymus vulgaris* extract presented a degradation temperature of 204 °C. In 2020, and collaborators, reported that the thermal stability of an extract of *Thymus vulgaris* is above 190 °C, so it agrees with the obtained result (Radünz et al., 2020).

Therefore, we can elucidate that the degradation temperature of the extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris*, obtained by conventional and microwave-assisted techniques, is above 200 °C. Hence, it is determined that the extracts do not suffer any chemical decomposition during the extraction and recovery process.

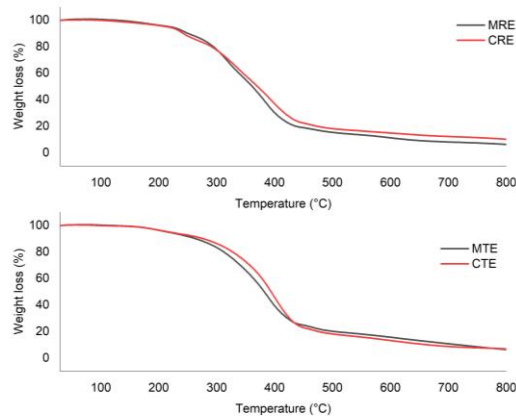


Figure 3. Thermograms of the extract of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris*.

Table 2. Compounds identified by HPLC of *Rosmarinus officinalis* by conventional and microwave-assisted extraction.

Extract	Retention time	Mass (m/z)	Family	Compound
MRE	5.370	340.9	Hydroxycinnamic acids	Caffeic acid 4-O-glucoside
	32.517	476.8	Methoxyflavonols	Isorhamnetin 3-O-glucoside
	33.976	608.8	Flavonols	Quercetin 3-O-xylosyl-glucuronide
	35.209	358.8	Hydroxycinnamic acids	Rosmarinic acid
	38.064	652.7	Flavonols	Quercetin 3-O-(6"-acetyl-galactoside) 7-O-rhamnoside
	45.484	328.8	Methoxyflavonols	3,7-Dimethylquercetin
	46.990	324.9	Hydroxycinnamic acids	p-Coumaric acid 4-O-glucoside
	49.049	344.8	Phenolic terpenes	Rosmanol
CRE	5.959	340.9	Hydroxycinnamic acids	Caffeic acid 4-O-glucoside
	26.868	386.9	Lignans	Medioresinol
	29.045	304.9	Catechins	(+)-Gallocatechin
	34.649	520.9	Anthocyanins	Petunidin 3-O-(6"-acetyl-galactoside)
	35.434	476.8	Flavonols	Quercetin 3-O-glucuronide
	38.740	358.8	Hydroxycinnamic acids	Rosmarinic acid
	49.815	324.9	Hydroxycinnamic acids	p-Coumaric acid 4-O-glucoside

Table 3. Compounds identified by HPLC of *Thymus vulgaris* extracts by conventional and microwave-assisted extraction.

Extract	Retention time	Mass (m/z)	Family	Compound
MTE	6.216	341.0	Hydroxycinnamic acids	Caffeic acid 4-O-glucoside
	31.406	387.0	Lignans	Medioresinol
	34.574	305.0	Catechins	(+)-Gallocatechin
	38.267	447.0	Flavones	Luteolin 6-C-glucoside
	39.609	595.0	Flavonols	Quercetin 3-O-glucosyl-xyloside
	41.540	302.9	Dihydroflavonols	Dihydroquercetin
	45.319	358.9	Hydroxycinnamic acids	Rosmarinic acid
	50.159	286.9	Other polyphenols	Phlorin
	CTE	6.021	340.9	Hydroxycinnamic acids
20.011		358.8	Lignans	Lariciresinol
23.108		336.8	Hydroxycinnamic acids	3-p-Coumaroylquinic acid
25.859		386.9	Lignans	Medioresinol
27.782		304.9	Catechins	(+)-Gallocatechin
33.675		446.8	Flavones	Luteolin 6-C-glucoside
36.850		358.8	Hydroxycinnamic acids	Rosmarinic acid
41.683		286.8	Other polyphenols	Phlorin
45.805		270.8	Other polyphenols	Arbutin
47.709	330.9	Phenolic terpenes	Carnosic acid	

Bioassays of the extracts with *E. coli* and *S. aureus* were also performed. Figure 4 shows the qualitative results obtained for the antimicrobial load of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* extracts against the selected microorganisms using the disk diffusion method. An antibiotic was used as a control, which showed the highest inhibitory effect compared to the tested extracts. Figure 5 presents the bar graph of the inhibition halos (mm) obtained for each of the extracts. According to the results of this test, the extracts showed good inhibition for *E. coli*, with inhibition halos of 12.68 (MRE), 13.29 (CRE), 11.15 (MTE), and 12.82 (CTE) mm. Whereas, for the *S. aureus* strain, halos of 13.52 (MRE), 13.87 (CRE), 10.45 (MTE), and 15.03 (CTE) mm were obtained.

Different researchers mention that gram-negative bacteria are less sensitive than gram-positive bacteria, therefore, these results can be attributed to the lipopolysaccharides in the cell wall of gram-negative bacteria, which may prevent the bioactive components present in the extract from reaching the membrane (Weerakkody et al., 2010)

Bonilla and coworkers, in 2016, performed bioassays against *E. coli* and *S. aureus*, of an ethanolic extract of rosemary obtained by the conventional method, resulting in a weak inhibition of this (Bonilla & Sobral, 2016). Furthermore, an ethanolic extract of thyme was tested by Mokhtari and collaborators against *E. coli* and *S. aureus* strains, finding an inhibition halo of 18.43 mm and 28.67 mm, respectively (Mokhtari et al., 2023).

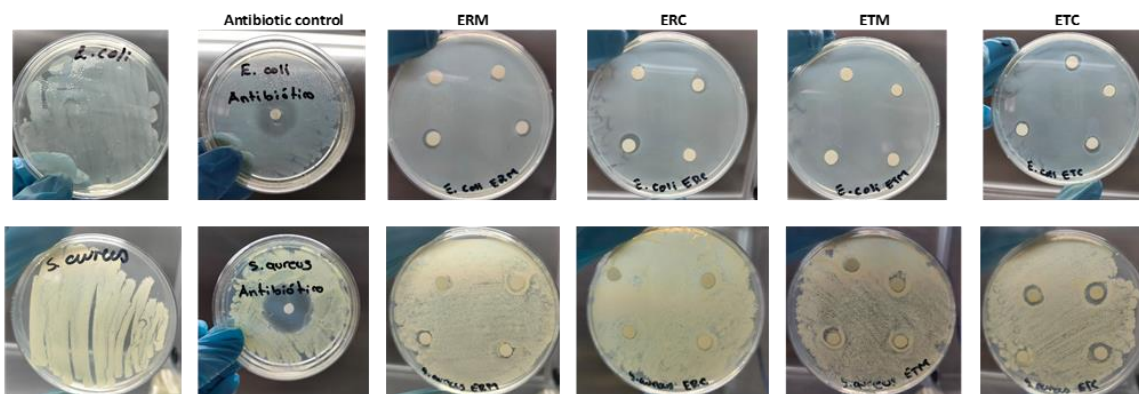


Figure 4. Inhibition of bacterial growth (*E. coli* and *S. aureus*) of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* extracts.

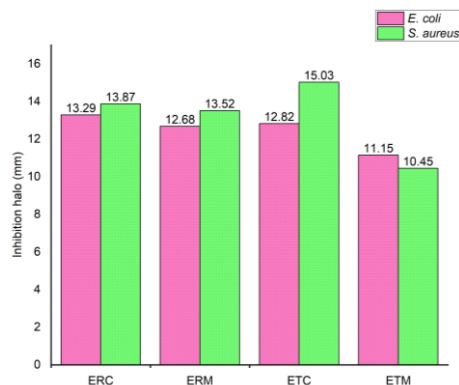


Figure 5. Inhibition halos (mm) of the extracts against *E. coli* and *S. aureus* strains.

Conclusion

The extraction of bioactive compounds from two plants of the Lamiaceae family, rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and thyme (*Thymus vulgaris*) was successfully carried out using a conventional and a microwave-assisted method. Employing FTIR-(ATR) and HPLC analysis, it was possible to identify the functional groups and compounds present in each of the extracts: rosmarinic acid, rosmanol, caffeic acid, luteolin, carnosic acid, and quercetin. In addition, the extracts showed decomposition temperatures above 200 °C. The MRE, CRE, and CTE extracts obtained better inhibition against *E. coli*, while for *S. aureus* it was the ETC extract. Therefore, according to the results obtained, it can be deduced that there is no difference between the extraction methods, except that CTE obtained a better inhibition against the strains analyzed.

Acknowledgments

To CONAHCYT for the grant 1078907 awarded. As well as the support provided through the SEP-CONACYT Basic Sciences Project 2017-2018 CB2017-2018 A1-S-44977.

References

- Alirezalu, K., Pateiro, M., Yaghoubi, M., Alirezalu, A., Peighambaroust, S. H., & Lorenzo, J. M. (2020). Phytochemical constituents, advanced extraction technologies and techno-functional properties of selected Mediterranean plants for use in meat products. A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 292–306. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.010>
- Alu'datt, M. H., Rababah, T., Alhamad, M. N., Gammoh, S., Al-Mahasneh, M. A., Tranchant, C. C., & Rawshdeh, M. (2018). Pharmaceutical, Nutraceutical and Therapeutic Properties of Selected Wild Medicinal Plants: Thyme, Spearmint, and Rosemary. In *Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods* (pp. 275–290). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814625-5.00014-5>
- Andrade, M. A., Ribeiro-Santos, R., Costa Bonito, M. C., Saraiva, M., & Sanches-Silva, A. (2018). Characterization of rosemary and thyme extracts for incorporation into a whey protein based film. *LWT*, 92, 497–508. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.041>
- Ardjoum, N., Chibani, N., Shankar, S., Fadhel, Y. Ben, Djidjelli, H., & Lacroix, M. (2021). Development of antimicrobial films based on poly(lactic acid) incorporated with *Thymus vulgaris* essential oil and ethanolic extract of Mediterranean propolis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 185, 535–542. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.194>
- Bonilla, J. ;, & Sobral, P. J. A. (2016). Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extracts of guarana, boldo, rosemary and cinnamon. In *Braz. J. Food Technol.* <http://bjft.ital.sp.gov.br>
- Calinescu, I., Asofiei, I., Gavrilă, A. I., Trifan, A., Ighigeanu, D., Martin, D., Matei, C., & Buleandra, M. (2017). Integrating Microwave-Assisted Extraction of Essential Oils and Polyphenols from Rosemary and Thyme Leaves. *Chemical Engineering Communications*, 204(8), 965–973. <https://doi.org/10.1080/00986445.2017.1328678>
- Cervilla, L. M., Blasco, B., Rios, J. J., Rosales, M. A., Sánchez-Rodríguez, E., Rubio-Wilhelmi, M. M., Romero, L., & Ruiz, J. M. (2012). Parameters Symptomatic for Boron Toxicity in Leaves of Tomato Plants. *Journal of Botany*, 2012, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2012/726206>
- Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G. A., Uzunov, D., Tubaro, A., Menichini, F., & Loggia, R. Della. (2008). In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(1), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.015>
- Elyemni, M., Louaste, B., Nechad, I., Elkamli, T., Bouia, A., Taleb, M., Chaouch, M., & Eloutassi, N. (2019). Extraction of Essential Oils of *Rosmarinus officinalis* L. by Two Different Methods: Hydrodistillation and Microwave Assisted Hydrodistillation. *The Scientific World Journal*, 2019, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2019/3659432>
- Ezzat, S. M., Salama, M. M., ElMeshad, A. N., Teaima, M. H., & Rashad, L. A. (2016). HPLC–DAD–MS/MS profiling of standardized rosemary extract and enhancement of its anti-wrinkle activity by encapsulation in elastic nanovesicles. *Archives of Pharmacal Research*, 39(7), 912–925. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0744-6>
- Fiume, M. M., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Marks, J. G., Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W., Gill, L. J., &

- Heldreth, B. (2018). Safety Assessment of *Rosmarinus officinalis* (Rosemary)-Derived Ingredients as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 37(3_suppl), 12S-50S. <https://doi.org/10.1177/1091581818800020>
- Hameed, I. H., Ibraheam, I. A., & Kadhim, H. J. (2015). Gas chromatography mass spectrum and fouriertransform infrared spectroscopy analysis of methanolic extract of *Rosmarinus oficinalis* leaves. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 7(6), 90–106. <https://doi.org/10.5897/JPP2015.0348>
- Hisham, S. M., Mohammad, A. M., & Mohammed, M. J. (2022). The Effect of Extracts and Phenolic Compounds Isolation from *Rosmarinus officinalis* Plant Leaves on *Tribolium castaneum* Mortality. *International Journal of Drug Delivery Technology*, 12(2), 814–819. <https://doi.org/10.25258/ijddt.12.2.61>
- Jacotet-Navarro, M., Rombaut, N., Deslis, S., Fabiano-Tixier, A.-S., Pierre, F.-X., Bily, A., & Chemat, F. (2016). Towards a “dry” bio-refinery without solvents or added water using microwaves and ultrasound for total valorization of fruit and vegetable by-products. *Green Chemistry*, 18(10), 3106–3115. <https://doi.org/10.1039/C5GC02542G>
- Kanakidi, L.-D., Tsimogiannis, D., Kiokias, S., & Oreopoulou, V. (2022). Formulation of Rosemary Extracts through Spray-Drying Encapsulation or Emulsification. *Nutraceuticals*, 2(1), 1–21. <https://doi.org/10.3390/nutraceuticals2010001>
- Luță, E. A., Biță, A., Moroșan, A., Mihaiescu, D. E., Mihai, D. P., Popescu, L., Bejenaru, L. E., Bejenaru, C., Popovici, V., Olaru, O. T., & Gîrd, C. E. (2023). Implications of the Cultivation of Rosemary and Thyme (Lamiaceae) in Plant Communities for the Development of Antioxidant Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14). <https://doi.org/10.3390/ijms241411670>
- Milevskaya, V. V., Temerdashev, Z. A., Butyl'skaya, T. S., & Kiseleva, N. V. (2017). Determination of phenolic compounds in medicinal plants from the Lamiaceae family. *Journal of Analytical Chemistry*, 72(3), 342–348. <https://doi.org/10.1134/S1061934817030091>
- Mohammed, J., Oba, O. A., & Pasaoglulari Aydinlik, N. (2023). Preliminary Phytochemical Screening, GC-MS, FT-IR Analysis of Ethanolic Extracts of *Rosmarinus Officinalis*, *Coriandrum Sativum* L. and *Mentha Spicata*. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 51(1), 93–102. <https://doi.org/10.15671/hjbc.1073300>
- Mokhtari, R., Kazemi Fard, M., Rezaei, M., Moflakharzadeh, S. A., & Mohseni, A. (2023). Antioxidant, Antimicrobial Activities, and Characterization of Phenolic Compounds of Thyme (*Thymus vulgaris* L.), Sage (*Salvia officinalis* L.), and Thyme-Sage Mixture Extracts. *Journal of Food Quality*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/2602454>
- Moreira, M. M., Barroso, M. F., Boeykens, A., Withouck, H., Morais, S., & Delerue-Matos, C. (2017). Valorization of apple tree wood residues by polyphenols extraction: Comparison between conventional and microwave-assisted extraction. *Industrial Crops and Products*, 104, 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.038>
- Munekata, P. E. S., Alcántara, C., Žugčić, T., Abdelkebir, R., Collado, M. C., García-Pérez, J. V., Jambrak, A. R., Gavahian, M., Barba, F. J., & Lorenzo, J. M. (2020). Impact of ultrasound-assisted extraction and solvent composition on bioactive compounds and in vitro biological activities of thyme and rosemary. *Food Research International*, 134. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109242>
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S. M., Rostami-Vartooni, A., & Hussin, S. M. (2016). Green synthesis of CuO nanoparticles using aqueous extract of *Thymus vulgaris* L. leaves and their catalytic performance for N-arylation of indoles and amines. *Journal of Colloid and Interface Science*, 466, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.12.018>
- Ojeda-Sana, A. M., van Baren, C. M., Elechosa, M. A., Juárez, M. A., & Moreno, S. (2013). New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*, 31(1), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.022>
- Piñeros Hernández, D., Medina Jaramillo, C., López Córdoba, A., & Goyanes, S. (2017). Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 63, 488–495. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.034>
- Piñeros Hernandez, D., Medina Jaramillo, C., López Córdoba, A., & Goyanes, S. (2017). Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food*

Hydrocolloids, 63, 488–495.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.034>

Radünz, M., dos Santos Hackbart, H. C., Camargo, T. M., Nunes, C. F. P., de Barros, F. A. P., Dal Magro, J., Filho, P. J. S., Gandra, E. A., Radünz, A. L., & da Rosa Zavareze, E. (2020). Antimicrobial potential of spray drying encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil on the conservation of hamburger-like meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 330.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108696>

Sanna, G., Farci, P., Busonera, B., Murgia, G., La Colla, P., & Giliberti, G. (2015). Antiviral properties from plants of the Mediterranean flora. *Natural Product Research*, 29(22), 2065–2070.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2014.1003187>

Shahar, B., Aribam, I., Santosh, O., Chongtham, N., Indira, A., & Dolma, N. (2023). Nutritional Composition, Antioxidant Activity and Characterization of Bioactive Compounds from *Thymus Serpyllum* L.: An Underexploited Wild Aromatic Plant Evaluation of wild plants for food and medicines View project Nutritional composition, antioxidant activity and characterization of bioactive compounds from *Thymus serpyllum* L.: An underexploited wild aromatic plant.
<https://doi.org/10.2139/ssrn.4369359>

Stahl-Biskup, E., & Venskutonis, R. P. (2012). Thyme. In *Handbook of Herbs and Spices: Second Edition* (Vol. 1, pp. 499–525). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1533/9780857095671.499>

Vallverdú-Queralt, A., Regueiro, J., Martínez-Huélamo, M., Rinaldi Alvarenga, J. F., Leal, L. N., & Lamuela-Raventos, R. M. (2014). A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chemistry*, 154, 299–307.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.106>

Weerakkody, N. S., Caffin, N., Turner, M. S., & Dykes, G. A. (2010). In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. *Food Control*, 21(10), 1408–1414.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.04.014>

OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE *LAVANDULA* Y *ROSMARINUS OFFICINALIS*, EMPLEANDO EXTRACCIÓN CONVENCIONAL Y NO CONVENCIONAL

OBTAINING BIOACTIVE COMPOUNDS FROM *LAVANDULA* AND *ROSMARINUS OFFICINALIS*, USING CONVENTIONAL AND NON-CONVENTIONAL EXTRACTION

Wendy Yaneth Villastrigo López¹, Aide Sáenz Galindo^{1*}, Miriam Desiree Dávila Medina¹, Adali Oliva Castañeda Facio¹, Christian Javier Cabello Alvarado²

¹ Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Saltillo, Coahuila, Blvd. Venustiano Carranza y José Cárdenas Valdés, C.P. 25280. Saltillo, Coahuila, México.

² CONAHCYT-Centro de Investigación en Química Aplicada, Enrique Reyna H. No. 140, San José de los Cerritos, C.P. 25294. Saltillo, Coahuila, México.

*E-mail: aidesaenz@uadec.edu.mx

Received August 23,2023; Revised: October 06, 2023; Accepted October 29, 2023

Resumen

Los compuestos bioactivos que se encuentran presentes en las plantas de *L. officinalis* y *R. officinalis*, se han usado ampliamente en diversas aplicaciones, debido a las propiedades que poseen, entre las que encuentran las antimicrobianas, anticancerígenas y antioxidantes. Existen diversas metodologías para extracción de estos compuestos, las cuales se clasifican en convencionales y no convencionales, sin embargo, algunas de ellas resultan ser ineficientes ya que presentan tiempos largos de extracción, altos costos y bajos porcentajes de rendimiento. En este trabajo de investigación se realizó la comparación de un método convencional y otro no convencional para extraer los compuestos bioactivos que se encuentran presentes en las hojas de *R. officinalis* y *L. officinalis*, utilizando como disolvente etanol y un tiempo de extracción de 25 minutos en ambas técnicas. La extracción por técnica no convencional es mucho más selectiva, debido a que en los bioensayos de antibiosis *in vitro* se obtuvieron halos de inhibición más amplios, que fueron de 17 mm para LAM y 16 mm en ROM, frente a *Staphylococcus aureus*. Además, mediante FTIR-ATR y HPLC-MS se observó que ambas metodologías permiten extraer compuestos de gran interés como los terpenos fenólicos, ácidos metoxicinámicos, ácidos hidroxicinámicos, catequinas y flavonoles. Concluyendo que estas metodologías son excelente alternativa para la extracción de compuestos bioactivos de *R. officinalis* y *L. officinalis*, puesto que se obtuvieron altos porcentajes de rendimiento y los extractos presentaron propiedades antibacterianas frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Palabras clave: *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula officinalis*, método convencional, método no convencional.

Abstract

The bioactive compounds present in *L. officinalis* and *R. officinalis* plants have been widely used in various applications, due to the properties they possess, including antimicrobial, anticancer and antioxidant activities. There are several methodologies for the extraction of these compounds, which are classified into conventional and non-conventional, however, some of them are inefficient because they have long extraction times, high costs and low yield percentages. Therefore, in this research work a comparison of a conventional and a non-conventional method

to extract the bioactive compounds present in the leaves of *R. officinalis* and *L. officinalis* was carried out, using ethanol as an extracting solvent and an extraction time of 25 minutes in both techniques. Showing that the extraction by non-conventional technique is much more selective, due to the in vitro antibiosis bioassays, the largest inhibition halos were obtained, which were 17 mm for LAM and 16 mm in ROM, against *Staphylococcus aureus*. In addition, by means of FTIR-ATR and HPLC-MS it was observed that both methodologies allow the extraction of compounds of great interest such as phenolic terpenes, methoxycinnamic acid, hydroxycinnamic acid, catechins and flavonols. It was concluded that both methodologies are excellent alternatives for the extraction of bioactive compounds from *R. officinalis* and *L. officinalis*, since good yield percentages were obtained, and the extracts showed antibacterial properties against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula officinalis*, conventional method, non-conventional method.

Introduction

Plants are a very important source of bioactive compounds, which provide them with medicinal properties, such as antimicrobial, anticancer and antioxidant properties (Jain et al., 2019).

Lavender belongs to the Lamiaceae family in the *Lavandula* genus. It is a shrub that grows in Mediterranean and sunny areas, it can reach 20 to 80 cm in height. It has therapeutic effects and has been used since ancient times for the treatment of pathologies such as colds, diarrhea, fatigue, as well as respiratory problems; it is also used to moderate depression, as well as stress, anxiety and insomnia (Diass et al., 2023).

On the other hand, *Rosmarinus officinalis* is a medicinal plant that belongs to the Lamiaceae family and is commonly known as rosemary; it can reach up to 1.5 m in height. Several studies have shown that its leaves contain a high content of terpenes, catechins, phenolic terpenes, among which rosmarinic acid, carnosol and carnosic acid stand out (Andrade et al., 2018).

Both plants possess bioactive compounds such as polyphenols that have aroused great interest due to their antimicrobial, anticancer and antioxidant properties. Therefore, the extraction of these types of compounds is of great interest to the pharmaceutical, food and textile industries (Selvamuthukumaran et al., 2017).

The extraction methods traditionally used are the conventional ones, such as maceration, hydrodistillation, extraction by distillation, leaching, extraction with organic solvents and extraction with soxhlet, however, these techniques are not viable because they can degrade the secondary metabolites, long extraction times are used, they are of high costs and generally the most used solvents in

these techniques are organic, volatile and toxic compounds (Wong et al., 2020).

Because of this, the search has begun for extraction alternatives that are more environmentally friendly by using non-toxic, less expensive solvents and shorter extraction times. These extraction methods are known as non-conventional, among which are microwave, ultrasound and plasma, which have been reported to have several advantages when compared with conventional methods, providing a considerable reduction in extraction time, energy savings, environmentally friendly solvents are used and also an increase in the percentage yield of secondary metabolites (Hernández et al., 2023).

Therefore, in this research work, a comparison is made between a conventional method (heating grill) and a non-conventional method (microwave) in the extraction of bioactive compounds from dried leaves of *Lavandula officinalis* and *Rosmarinus officinalis* using the same conditions in both techniques, with the objective of observing the differences in percentage yield, characterization and antibacterial tests.

Experimental

The leaves of *Rosmarinus officinalis* and *Lavandula officinalis* were left to dry at room temperature for seven days and finally crushed. Subsequently, ethanolic extracts were made by placing 100 g of organic matter in 1000 mL of ethanol, by conventional and non-conventional techniques.

The non-conventional extraction was carried out by microwave in a reactor (Ultrasonic Microwave Cooperative Workstation model XO-SM400) (Figure 1) and the conventional extraction in a heating grill, using a temperature of 70 °C and an extraction time of 25 minutes in both methods. After the time elapsed, they were rotaevaporated and the supernatant was left to dry at room temperature. Table 1, shows the abbreviations used for each of the extracts.

Table 1. Abbreviations of the extracts obtained.

Extract	Type of extraction
LAC	<i>Lavandula officinalis</i> obtained by conventional method (heating grill)
LAM	<i>Lavandula officinalis</i> obtained by non-conventional method (microwave)
ROC	<i>Rosmarinus officinalis</i> obtained by conventional method (heating grill)
ROM	<i>Rosmarinus officinalis</i> obtained by non-conventional method (microwave)



Figure 1. Microwave reactor (Ultrasonic Microwave Cooperative Workstation model XO-SM400).

Once the extracts were obtained, they were characterized by infrared spectroscopy (FTIR-ATR), using an IR Spectrum spectrophotometer, GX-Perkin-Elmer by the attenuated total reflection (ATR) technique and a diamond tip attachment.

For the high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) technique with a diode array detector (280 nm). Compound separation was performed on a Grace Denali c-18 column at 30 °C. A Varian 500-MS ion trap, electrospray ionization (ESI), capillary voltage 90 V and mass acquisition range 100-2000 m/z were used.

In the thermogravimetric analysis, a TA instruments Q500 thermal analyzer was used, with a heating rate of 10 °C / min and a temperature range of 30-700 °C.

Finally, in the in vitro antibiosis bioassay, filter paper impregnated with dilutions of the extracts obtained were used and placed in nutrient agar against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The petri dishes were placed in an incubator for 24 hours at 37 °C and finally the presence or absence of inhibition was observed.

Results and discussion

Different yield percentages were obtained in each of the methods used, as shown in Table 2, for *Rosmarinus officinalis* extracts yields of 14.11 % were obtained when using the non-conventional method and 13.89 % when using the conventional method, while for *Lavandula officinalis* extracts yield percentages of 13.25 % were obtained by the non-conventional method and 12.47 % when using the conventional method. As can be seen, the highest yield percentages were obtained when using the conventional method; however, the differences are not significant and in both methods the yield percentages are higher than those reported in the literature.

Lava et al. extracted bioactive compounds from the *Rosmarinus officinalis* plant by maceration for 72 hours and using ethanol as the extracting solvent, obtaining a yield of 5.48 % (Lava et al., 2022). Meanwhile, Campos et al. also obtained extracts of *Rosmarinus officinalis* by maceration, using a time of 15 days and ethanol as solvent, obtaining a yield percentage of 13.5 % (Campos et al., 2020). On the other hand, Flores et al. performed *Rosmarinus officinalis* extracts with ultrasound for 1 and 2 h and ethanol as solvent, where they obtained yield percentages of 11.10 % and 10.42 %, respectively (Flores et al., 2022).

Table 2. Percentage yields of *Rosmarinus* and *Lavandula officinalis* extracts.

Extract	Percentage yields (%)
ROC	13.89
ROM	14.11
LAC	12.47
LAM	13.25

Soler et al. carried out extractions of dried leaves of *Lavandula angustifolia* using a conventional and a non-conventional method. For the conventional method they used hydrodistillation, for which they weighed 130 g of plant matter and placed it in deionized water with times of 30, 60, 90 and 120 minutes, where they obtained yield percentages of 0.26, 0.35, 0.32, 0.22 % respectively. While for the conventional method they used ultrasound, placing 100 g of dry leaves in 80 mL of deionized water with times of 20, 25 and 27 minutes, who managed to obtain yield percentages of 0.31, 0.69 and 0.16 %, respectively. It was observed that the highest yield percentages were obtained when an ultrasound bath was used to obtain the extracts, which varied according to time (Soler et al., 2021).

The FTIR-ATR results of *Lavandula officinalis* showed similar behavior both in those obtained by the conventional and non-conventional methods, as shown in Figure 2 and 3 since the same bands are observed at 3394 cm^{-1} for the stretching of the O-H bond that refers to the presence of alcohols, phenols and ethers. At 2922 and 2851 cm^{-1} bands corresponding to methyl and methylene stretches are shown. The carbonyl (C=O) stretches are found at 1731 cm^{-1} , which is due to the presence of ketones and carboxylic acids.

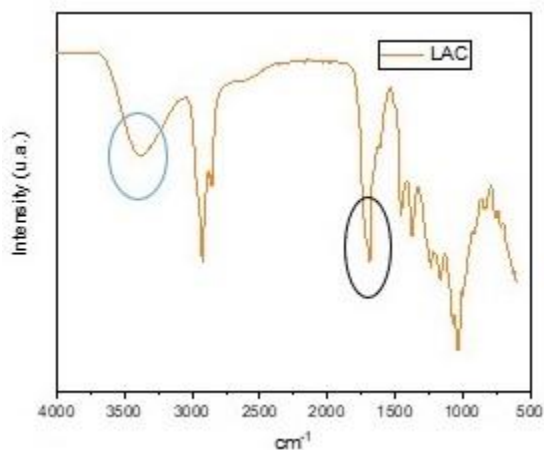


Figure 2. FTIR-ATR spectra of *Lavandula officinalis* extract obtained by heating grill.

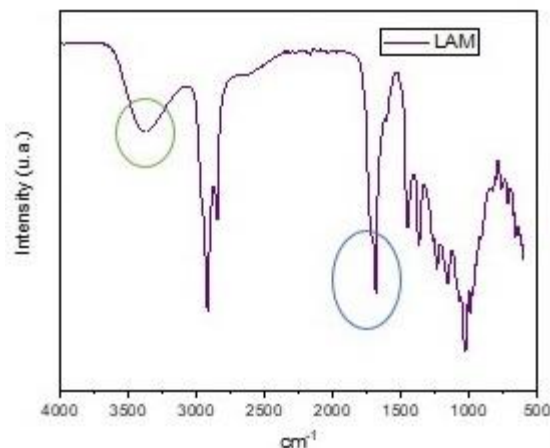


Figure 3. FTIR-ATR spectra of *Lavandula officinalis* extracts obtained by microwave.

On the other hand, in the extracts of *Rosmarinus officinalis*, the same behavior was also observed in both treatments (Figure 4 and 5). The O-H bond stretches are found at 3382 cm^{-1} , at 2928 and 2850 cm^{-1} methyl and methylene stretches are observed, while at 1701 cm^{-1} stretches of the C=O bond found in carboxylic acids and ketones are shown.

The FTIR-ATR results obtained agree with those published by Nidhi et al. who reported similar stretches in *Rosmarinus* and *Lavandula officinalis*. In *Lavandula officinalis* they highlighted the presence of C-H stretches at 2925 cm^{-1} and at 1748 cm^{-1} stretches of the C=O bond. While in *Rosmarinus officinalis*, they reported 2925 cm^{-1} bond stretches and at 1749 cm^{-1} C=O bond stretches (Nidhi et al., 2018; Silverstein et al., 2005).

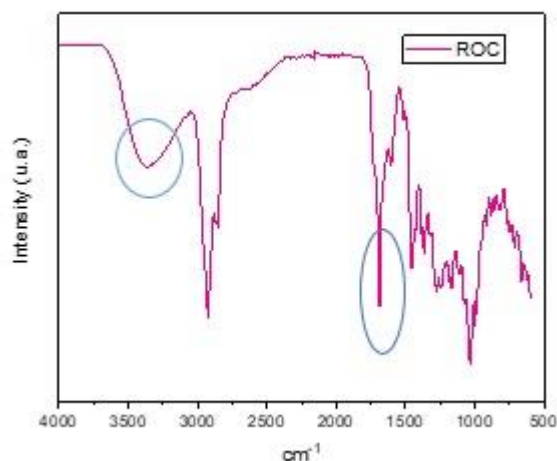


Figure 4. FTIR-ATR spectra of *Rosmarinus officinalis* extracts obtained by heating grill.

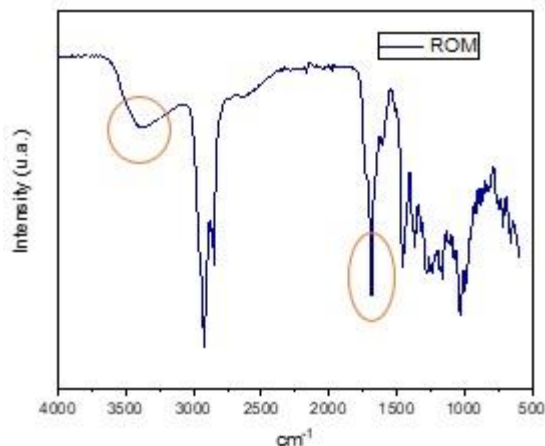


Figure 5. FTIR-ATR spectra of *Rosmarinus officinalis* extracts obtained by microwave.

The FITR-ATR results agree with those obtained in the HPLC-MS characterization, since the bands observed correspond to functional groups that are present in the chemical structures of the bioactive compounds of *Rosmarinus officinalis* (Figure 6) and *Lavandula officinalis* (Figure 7).

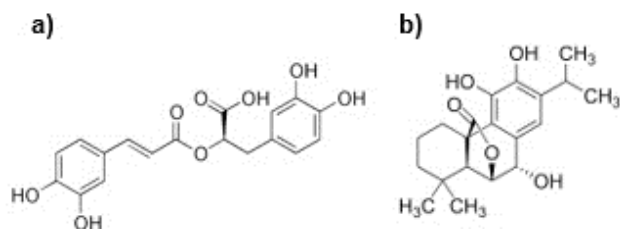


Figure 6. Chemical structures of bioactive compounds present in *Rosmarinus officinalis* leaves: a) rosmarinic acid and b) rosmanol.

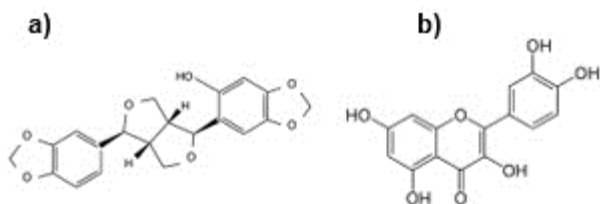


Figure 7. Chemical structures of bioactive compounds present in *Lavandula officinalis* leaves: a) sesaminol and b) quercetin.

The HPLC-MS analysis was able to identify families such as hydroxycinnamic acids, flavonols, methoxycinnamic acids, lignans and catechins. Table 3, shows the bioactive compounds extracted from *Lavandula officinalis* leaves, including sesaminol, medioresinol, quercetin, which have been reported in the literature as potent antimicrobials (Slighoua et al., 2022).

Table 3. HPLC-MS analysis of *Lavandula officinalis* extracts obtained by conventional and non-conventional methods.

Extract	TR*	Mass (m/z)	Compound	Family
LAC	1.257	352.7	1-Caffeoylquinic acid	Hydroxycinnamic acids
	5.793	341.0	Caffeic acid 4-O-glucoside	Hydroxycinnamic acids
	23.06	325.0	Feruloyl tartaric acid	Methoxycinnamic acids
	30.624	354.9	Ferulic acid 4-O-glucoside	Methoxycinnamic acids
	33.572	387.0	Medioresinol	Lignans
	34.643	327.0	p-Coumaroyl tyrosine	Hydroxycinnamic acids
	43.276	300.8	Quercetin	Flavonols
	43.519	121.0	Benzoic acid	Hydroxybenzoic acids
	44.153	431.0	Apigenin 6-C-glucoside	Flavones
	LAM	0.606	352.6	1-Caffeoylquinic acid
2.03		330.7	Galloyl glucose	Hydroxycinnamic acids
2.84		368.6	Sesaminol	Lignans
5.86		341.0	Caffeic acid 4-O-glucoside	Hydroxycinnamic acids
26.06		324.9	Feruloyl tartaric acid	Methoxycinnamic acids
32.57		354.9	Ferulic acid 4-O-glucoside	Methoxycinnamic acids
34.63		326.9	p-coumaroyl tyrosine	Hydroxycinnamic acids

*(TR) Retention time (min)

Table 4, shows the bioactive compounds present in the leaves of *R. officinalis*, including rosmarinic acid and rosmanol, which are the main compounds to which the antibacterial properties of this plant are attributed (Alvarado et al., 2021).

Table 4. HPLC-MS analysis of *Rosmarinus officinalis* extracts obtained by conventional and non-conventional methods.

Muestra	TR*	Masa (m/z)	Compuesto	Familia	
ROC	5.60	340.8	Caffeic acid 4-O-glucoside	Hydroxycinnamic acids	
	24.94	386.8	Medioresinol	Lignans	
	26.26	304.8	(+)-Gallic catechin	Catechins	
	32.77	476.8	Quercetin 3-O-glucuronide	Flavonols	
	34.29	608.8	Quercetin 3-O-glucuronide	Flavonols	
	35.96	358.7	Ácido rosmarínico	Methoxycinnamic acids	
	38.83	652.7	Quercetin 3-O-(6"-acetyl-galactoside) 7-O-rhamnoside	Flavonols	
	39.52	622.8	Apigenin 7-O-diglucuronide	Flavones	
	42.93	324.9	Feruloyl tartaric acid	Methoxycinnamic acids	
	45.76	344.8	Rosmanol	Phenolic terpenes	
	ROM	5.42	340.8	Caffeic acid 4-O-glucoside	Hydroxycinnamic acids
		19.05	310.6	Caffeoyl tartaric acid	Hydroxycinnamic acids
		24.92	386.7	Medioresinol	Lignans
26.43		304.8	(+)-Gallic catechin	Catechins	
32.42		476.8	Quercetin 3-O-glucuronide	Flavonols	
33.83		608.7	Quercetin 3-O-xylosyl-glucuronide	Flavonols	
35.43		358.7	Ácido rosmarínico	Hydroxycinnamic acids	
39.96		622.7	Apigenin 7-O-diglucuronide	Flavones	
43.17	324.8	Feruloyl tartaric acid	Methoxycinnamic acids		

*(TR) Retention time (min)

The major compound in the *Rosmarinus officinalis* plant was rosmarinic acid, which was found in the two extraction methods employed, with retention times of 35.96 (ROC) and 35.43 minutes (ROM) and a mass of 358.7 (m/z), which agrees with that reported by Córdova et al, who reported the presence of rosmarinic acid in aqueous extracts of *Rosmarinus officinalis*, with a retention time of 13.21 minutes and a mass of 359 (m/z) (Córdova et al., 2021).

Figure 8 shows the thermogravimetric analysis of the ethanolic extracts of *Lavandula officinalis*, which, regardless of the treatment, show a gradual loss of 85 % in weight at approximately 316 °C. Figure 9 shows the thermograms of the *Rosmarinus officinalis* extracts, showing the same behavior with a loss in weight of 85% at 318 °C, which is attributed to the loss of water and some of the families present in the

extracts. These temperatures are also an indication that the raw materials used are stable at high temperatures.

Flores et al. obtained ethanolic extracts of *Rosmarinus officinalis* obtained by ultrasound bath, indicating that in the thermogravimetric analysis they obtained a loss in weight of 50 % at a temperature of 350 °C, demonstrating that the extracts are stable at temperatures above 300 °C (Flores et al., 2022).

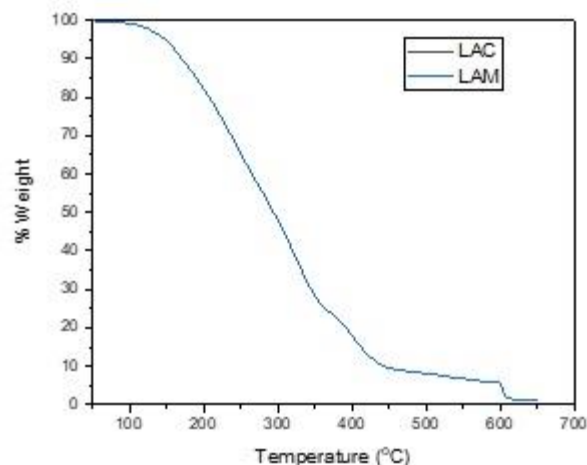


Figure 8. Thermograms of *Lavandula officinalis* extracts.

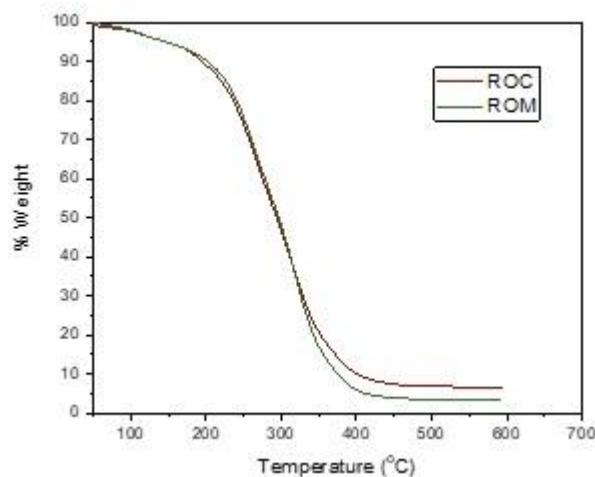


Figure 9. Thermograms of *Rosmarinus officinalis* extracts.

Finally, Figure 10 shows the analysis of the in vitro antibiosis bioassay. The largest inhibition halos were obtained with the extracts of *Rosmarinus* and *Lavandula officinalis* obtained by microwaves for both bacteria. Against *Staphylococcus aureus*, inhibition halos of 17 mm were obtained for LAM and 16 mm for

ROM, while for *Escherichia coli* they were 14 mm for LAM and 15 mm for ROM.

Escherichia coli is a gram-negative bacterium with a cell wall layer composed of lipopolysaccharides, a periplasmic space and a cytoplasmic membrane (Flores et al., 2022), unlike gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* whose cell wall contains peptidoglycan and teichoic acid (Hurtado et al., 2002; Cervantes et al., 2014). The bioactive compounds present in the extracts directly affect the cell membrane of bacteria and the cytotoxic activity directly affects the mitotic phase of gram-positive and gram-negative bacteria. Microorganisms such as *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* are susceptible to the bioactive compounds of *Lavandula* and *Rosmarinus officinalis* extracts, where rosmarinic acid, carnosol, flavonoids, caffeic acid and carnosic acid prevail (Pardo et al., 2022).

Montero et al. obtained an oily extract of *Rosmarinus officinalis* using steam distillation and evaluated the minimum inhibitory concentration against *Escherichia coli*, showing that there was no turbidity in the test and therefore there was no bacterial growth, concluding that the oily extract has antibacterial properties against this pathogen (Montero et al., 2017).

On the other hand, Fernandez et al. demonstrated that ethanolic extracts of *Rosmarinus officinalis* obtained by maceration have antibacterial properties against *Staphylococcus aureus*, since they reported inhibition halos of 26.88, 25.84 and 24.57 mm at concentrations of 100, 75 and 50% of the extract, respectively (Fernandez et al., 2022).

Conclusion

It is concluded that the leaves of *Lavandula* and *Rosmarinus officinalis* contain bioactive compounds that provide antibacterial properties. It was also demonstrated that both conventional and non-conventional methods are a good alternative for the extraction of bioactive compounds of interest, however, the microwave (non-conventional technique) presented better results in the in vitro antibiosis bioassay and it has also been demonstrated that it is a selective and greener extraction technique, which indicates that it is environmentally friendly.

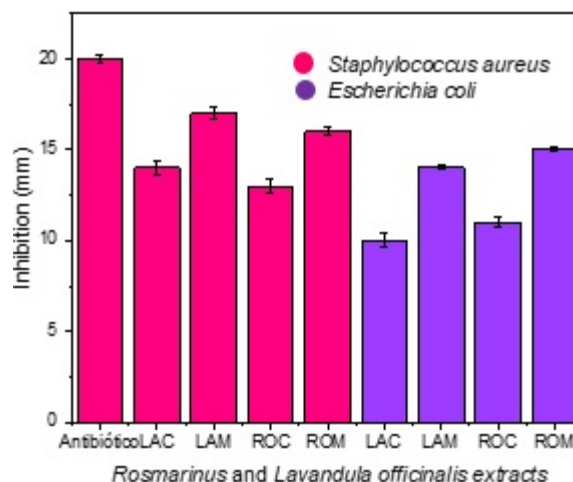


Figure 10. Determination of the antibacterial effect of ethanolic extracts of *Rosmarinus* and *Lavandula officinalis* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Acknowledgments

We thank the Universidad Autónoma de Coahuila and the Facultad de Ciencias Químicas, CONAHCYT for the grant awarded and the support provided through the project SEP-CONACYT Ciencias Básica 2017-2018 CB2017-2018 A1-S-44977.

Referencias

- Alvarado, M. C., Arias, J. D., & Palma, M. I. (2021). Development of an antimicrobial compound with silver nanoparticles synthesized from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaf extract, to be applied on fruits. *Chemical Engineering and Development*, 3(1), 1-16.
- Andrade, J. M., Faustino, C., Garcia, C., Ladeiras, D., Reis, C. P., Rijo, P. (2018). *Rosmarinus officinalis* L.: An update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Science*, 4(4). <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0124>
- Campos, J. N., & Santa, F. M. (2022). Formulation and quality control of a cream elaborated from the ethanol extract of the leaves of *Rosmarinus officinalis* L. Thesis to obtain the degree of bachelor in pharmacy and biochemistry. Maria Auxiliadora University. Lima, Peru.
- Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. M. (2014). General characteristics of *Staphylococcus*

aureus. *Latin American Journal of Clinical Pathology*, 61(1), 28-40.

- Córdova, K. C., Sáenz, A., Ascacio, J. A., Avalos, F., Moggio, I., & Castañeda, A. (2021). Synthesis of silver nanoparticles by aqueous extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Citrus sinensis*. *Afinidad*, 594, 225-233.
- Diass, K., Brahmi, F., Mokhtari, O., Abdellaouib, S., & Hammouti, B. (2021). Biological and pharmaceutical properties of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula officinalis* L. *Materials Today: Proceedings*, 45(8), 7768-7773. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.03.495>
- Diass, K., Merzouki, M., Elfazazi, K., Azzouzi, H., Challioui, A., Azzaoui, K., Hammaouti, B., Touzani, R., Depeint, F., Gotor, A., & Rhazi, L. (2023). Essential oil of *Lavandula officinalis*: Chemical composition and antibacterial activities. *Plants MDPI*, 12, 1571. <https://doi.org/10.3390/plants12071571>
- Fernández, D., García, H., & Junchaya, V. A. (2022). In vitro antibacterial activity of the ethanol extract of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Thesis to obtain the degree of pharmaceutical chemist. Professional School of Pharmaceutical Sciences and Biochemistry, Huancayo, Peru.
- Flores, C., Rocha, R. C., Barrios, E., Lozano, P., & Cortés, G. (2022). *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: two multidrug-resistant bacteria that we can share with our pets. *Invurnus*, 17(1), 1-15.
- Flores, E., Villastrigo, W. Y., Narro, R. I., Esparza, S. C., Dávila, M. D., Cabello, C. J., Castañeda, A. O., & Sáenz, A. (2022). Obtaining a composite based on Nylon 6 nonwoven fabric with ultrasound-assisted rosemary extracts with biological applications. *Afinidad*, 596, 1-10.
- Hernández, J. A., Reyes, A., Hernández, I., Peláez, A., & Campos, R. G. (2023). Sustainable technologies (microwaves, ultrasound and supercritical CO₂) for extraction of bioactive compounds in propolis. *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*, 9, 20-25.
- Hurtado, M. P., De la parte, M. A., & Brito, A. (2002). *Staphylococcus aureus*: review of the mechanisms of pathogenicity and pathophysiology of staphylococcal infection. *Journal of the Venezuelan Society of Microbiology*, 22(2).
- Jain, C., Khatana, S., & Vijayvergia, R. (2019). Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. *International Journal of pharmaceutical sciences and research*, 10, 494-504. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(2\).494-04](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(2).494-04)
- Lava, J. J., & García, F. J. (2022). Antidepressant effect of hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* (rosemary) leaves in albino mice. Thesis to obtain the degree of Pharmaceutical Chemist. Universidad Nacional de Mayor de San Marcos, Lima, Peru.
- Montero, M. A., Martínez, J. A., Avilés, D. F., Valle, E. L., & Pazmiño, N. P. (2017). Effect antimicrobial of extract of *Rosmarinus officinalis* on strain of *Escherichia coli*. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 5(2).
- Nidhi, P., Kumari, R., Thakur, S., Devi, R., Sharma, R., Kashyap, S., Dev, K., & Sourirajan, A. (2018). Role of essential oils of medicinal plants (*Eucalyptus globulus*, *Thuja occidentalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula officinalis*) to treat broad spectrum bacterial and fungal pathogens and as antioxidants in food and health. *International Conference on New Horizons in Green Chemistry and Technology*, 1-20.
- Pardo, L., Arias, J., & Molleda, P. (2022). Preparation of silver nanoparticles synthesized from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaf extract and their use as a preservative. *La Granja. Journal of Life Sciences*, 35(1).
- Selvamuthukumaran, M., & Shi, J. (2017). Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. *Food Quality and Safety*, 1(1), 61-81. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx004>
- Silverstein, R., Webster, F., & Kiemle, D. J. (2005). Spectrometric identification of organic compounds. Seven edition, Editorial John Wiley & Sons, Inc.
- Slighoua, M., Chebaibi, M., Mahdi, I., Amrati, F. E., Conte, R., Cordero, M. A., Alotaibi, A., Saghrouchni, H., Agour, A., Zair, T., Bari, A., Boustia, D. (2022). The LC-MS/MS identification

and analgesic and wound healing activities of *Lavandula officinalis* chaix: in vivo and in silico approaches. *Plants*, 11(23), 3222. <https://doi.org/10.3390/plants11233222>

Soler, R., & Ortiz, A. J. (2021). Ultrasound-assisted extraction of value-added compounds. Thesis to obtain the degree of Industrial Chemical Engineer. University of Jaén, Escuela Politécnica Superior de Linares, Jaén, Spain.

Wong, J. E., Aguilar, P., Veana, F., & Muñoz, D. B. (2020). Impact of green extraction technologies for obtaining bioactive compounds from citrus fruit residues. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 23, 1-11. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.255>

*Revista SNIQBA***DISEÑO Y OBTENCIÓN DE HIDROGELES A BASE DE POLIACRILAMIDA: ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE HINCHAMIENTO****DESIGN AND OBTAINING OF POLYACRYLAMIDE-BASED HYDROGELS: STUDY OF THE KINETICS OF SWELLING**

José Juan Cedillo-Portillo¹, Jesús Guillermo Soriano-Moro^{1*}, María Teresa Zayas-Pérez¹, Valeria Jordana González-Corone², Miriam Vega Hernández²

¹Centro de Química-ICUAP, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, Puebla, Puebla México

²Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, Puebla, Puebla, México
E-mail: jesus.soriano@correo.buap.mx

Received: October 02, 2023; Revised: October 31, 2023; Accepted: November 05, 2023

Resumen

En el presente estudio se evaluó la cinética de hinchamiento de hidrogeles de poliacrilamida sintetizados mediante la polimerización vía radicales libres. El efecto de la relación del hinchamiento y la difusión de agua se estudiaron con agua desionizada. La cinética de hinchamiento de los hidrogeles se explica mediante un mecanismo de penetración del agua dentro de las cadenas poliméricas, la difusión del agua se lleva a cabo mediante un proceso de difusión del tipo menos fickiano para las muestras PAM35-BIS1 y PAM35-BIS3, mientras que la muestra PAM35-BIS5 presentó un mecanismo del tipo anómalo asimétrico. Se observa que la velocidad de hinchamiento se ajusta a un modelo de primer orden, los mejores valores de hinchamiento se observaron para la muestra PAM35-BIS1, la cual contiene la menor concentración del agente entrecruzamiento alcanzando un hinchamiento del 560 %. Por otro lado, el análisis termogravimétrico mostró que la concentración del agente de entrecruzamiento evaluada no es determinante, debido a que se tiene una tendencia muy cercana como función de la temperatura. Por otra parte mediante la espectroscopía infrarroja se determinaron los grupos funcionales característicos para este polímero en la región de 3350 cm^{-1} aparecen los estiramientos del enlace N-H de la amida y en 1645 cm^{-1} el estiramiento del C=O correspondiente al grupo amida, los cuales son grupos funcionales presentes en la poliacrilamida, además de ser grupos altamente polares lo cual ayuda a la formación de puentes de hidrógeno y la adsorción de agua en este tipo de sistemas, lo que los hace candidatos para su posible empleo dentro del área de las ciencias ambiental.

Palabras clave: Hidrogeles, Poliacrilamida, Polímeros

Abstract

In the present study, the swelling kinetics of polyacrylamide hydrogels synthesized by free radical polymerization was evaluated. The effect of the swelling ratio and water diffusion were studied with deionized water. The swelling kinetics of the hydrogels is explained by a mechanism of water penetration within the polymeric chains, the diffusion of water is carried out by a diffusion process of the less Fickian type for the samples PAM35-BIS1 and PAM35-BIS3, while the PAM35-BIS5 sample presented an anomalous type mechanism, it is also observed that the swelling

speed conforms to a first-order model, the best swelling values were observed for the PAM35-BIS1 sample, which contains the lowest concentration of the crosslinking agent reaching a swelling of 560 %, on the other hand, the thermogravimetric analysis showed that the concentration of the crosslinking agent evaluated is not decisive, since there is a very close trend as a function of temperature. On the other hand, by means of infrared spectroscopy, the characteristic functional groups for this polymer were determined. In the region of 3350 cm^{-1} the stretching of the N-H bond of the amide appears and at 1645 cm^{-1} the stretching of the C=O corresponding to the amide group. which are functional groups present in polyacrylamide, in addition to being highly polar groups which help the formation of hydrogen bonds and the adsorption of water in this type of system, which makes them candidates for possible employment within the area of environmental sciences.

Keywords: Hydrogels, Polyacrylamide, Polymers

Introducción

Hace 30 años los hidrogeles aparecieron en la industria de la agricultura y los pañales, posteriormente su empleo se ha ido diversificando en aplicaciones más específicas. En la actualidad diversos investigadores centran su atención en hidrogeles poliméricos con aplicaciones en diversas áreas como: la electrónica, farmacología, ciencias ambientales, biomedicina y la agricultura (Fan *et al.*, 2008) (Bashir *et al.*, 2020). Los hidrogeles poliméricos, son redes macromoleculares hidrofílicas tridimensionales entrecruzadas que tienen una alta capacidad de retención de agua o de fluidos acuosos debido a sus grupos funcionales hidrofílicos como -COOH, -OH, NH_2 , $-\text{CONH}_2$, y $-\text{SO}_3\text{H}$ (Awasthi *et al.*, 2022; Ahmadian *et al.*, 2023). Los hidrogeles poliméricos son materiales blandos, porosos y con un alto contenido de agua a base de biomacromoléculas y/o polímeros sintéticos, los cuales poseen propiedades tanto físicas como químicas únicas tales como; la porosidad, la biocompatibilidad y la capacidad de almacenar más del 20 % de agua, lo que los hace candidatos ideales en diversas aplicaciones como; la dosificación de fármacos, andamios para regeneración celular, remoción de contaminantes ambientales, dosificación de agua ó nutrientes en la agricultura (Hoffman, 2002; Khan *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2023).

Clasificación de los hidrogeles

Los hidrogeles se pueden clasificar de diferentes formas algunas de estas son: con base a su origen, composición, configuración, carga iónica y tamaño (Ahmadian *et al.*, 2023), en cuanto a su origen los hidrogeles pueden originarse de polímeros naturales, polímeros sintéticos o una combinación de ambos, los polímeros naturales presentan por lo regular características mecánicas deficientes, pero son altamente utilizado en aplicaciones biomédicas,

farmacéuticas y ambientales, debido a su naturaleza no toxica y biocompatible (Mushtaq *et al.*, 2022), entre los cuales encontramos diversos polisacáridos y proteínas como el quitosano, el ácido hialurónico, la gelatina, el colágeno y el alginato (Chen, 2020), mientras que entre los polímeros sintéticos se tiene a la poliacrilamida (PAM), el poli(metacrilato de metilo) (PMMA), el poli(etilenglicol) (PEG) y el poli(alcohol vinílico) (PVA) dando como resultado la obtención de hidrogeles con mejores propiedades como por ejemplo; una alta resistencia mecánica, baja inmunogenicidad y estructura adaptable (Dimatteo *et al.*, 2018; Başıyigit *et al.*, 2023).

Otra clasificación para los hidrogeles es mediante el tipo de entrecruzamiento, es decir entrecruzados de forma física, química o una combinación de las dos, el entrecruzamiento físico, es el resultado de interacciones entre dos puntos en una cadena polimérica ya sea igual o diferente y se da sin enlaces químicos, básicamente por interacciones físicas como: interacciones electrostáticas, enlaces por puente de hidrogeno, fuerzas iónicas, fuerzas de Van del Waals entre otras, mientras que los procesos de entrecruzamiento químico se lleva a cabo en la polimerización por la formación de un enlace químico a lo largo de dos cadenas poliméricas, el enlace químico da como resultado una estructura más fuerte en la red polimérica (Awasthi *et al.*, 2022; Ganguly y Margel, 2022).

El comportamiento del hinchamiento que se lleva a cabo en hidrogeles se puede describir mediante el empleo de diversos modelos matemáticos, el hinchamiento en el equilibrio se refiere al estado estacionario, el antes y el después de que el hidrogel se ha sometido a un cambio de volumen como resultado a la exposición a un disolvente; sin embargo, para la mayoría de las aplicaciones es necesario conocer el comportamiento del hidrogel al estar en contacto con el disolvente, por lo que es

importante describir el comportamiento dinámico del hidrogel (Porter *et al.*, 2007).

El comportamiento dinámico de adsorción de agua es muy importante para brindar una aplicación para este tipo de materiales ya sea dentro del área ambiental, así como del área biomédica, en los últimos años se ha investigado el tipo de mecanismo de penetración de agua en polímeros reticulados, con contribuciones importantes en la comprensión de la difusión fickiana clásica, cuando se difunde el disolvente dentro del hidrogel la respuesta de este no es inmediata, de tal manera que la penetración del disolvente dentro de la red de las cadenas del hidrogel polimérico se encuentra en función de la estructura de este, por lo que, el transporte en estos casos puede resumirse a tres tipos de fuerzas impulsoras: a) un gradiente de concentración penetrante, b) un gradiente de tensión del polímero y c) fuerzas osmóticas (Brazel y Peppas, 1999; Porter *et al.*, 2007; González *et al.*, 2012).

En todas las aplicaciones donde se involucra a los hidrogeles la capacidad de difusión de moléculas de agua, la tasa de hinchamiento, así como la retención de agua son factores importantes que permite caracterizar este tipo de materiales, por lo general el hinchamiento se encuentra determinado por la difusión de las moléculas de agua en las cadenas vítreas de los xerogeles; sin embargo, cambiando la relación del agente de entrecruzamiento en relación con el monómero o la concentración del polímero se puede modificar este comportamiento (Yavari y Azizian, 2022).

En este estudio se sintetizaron hidrogeles a base de poli(acrilamida), así mismo se investigaron las características de hinchamiento, así como el porcentaje de hinchamiento, la difusión del disolvente y se evaluaron los modelos de la cinética de hinchamiento utilizando una ecuación de primer y segundo orden, dicho estudio se extendió a todas las concentraciones de agente de entrecruzamiento empleado en la síntesis de hidrogeles.

Sección Experimental

Reactivos

Para la realización del trabajo experimental se emplearon como reactivos: Acrilamida (AAm), utilizada como monómero, se adquirió de Sigma Aldrich, la cual se utilizó sin purificación previa, como iniciador de la reacción de polimerización se utilizó

persulfato de potasio (KPS), en tanto que como agente de entrecruzamiento se utilizó *N,N*-metilbisacrilamida (NNMBA), para el lavado de los hidrogeles se utilizó metanol grado comercial, todos los experimentos fueron llevados a cabo con agua desionizada, se utilizó una balanza marca: VELAB modelo VE-300 y un horno de vacío marca: ECOSHEL modelo: HV-20, para la síntesis y el secado de los hidrogeles.

Síntesis de Hidrogeles

En este estudio, se sintetizaron hidrogeles de poli(acrilamida) (PAM) entrecruzada mediante polimerización en solución acuosa por radicales libres de AAm, para ello se sintetizó una serie de hidrogeles mediante el siguiente procedimiento: se preparó una disolución de acrilamida al 35 % (p/v) en agua desionizada y se adicionaron diferentes concentraciones de (NNMBA), que corresponden al 1, 3 y 5 %, y el 1 % (p/p) de KPS, posteriormente se llevó a un baño de ultrasonido por 15 min para asegurar que todos los reactivos se hubieran solubilizado, transcurrido el tiempo la solución preparada se vertió en cajas Petri de 24 pocillos que sirvieron como moldes para la obtención de los hidrogeles, posteriormente se llevaron a una estufa de vacío por 50 min a 60 °C.

El hidrogel sintetizado se extrajo de los moldes y se puso en contacto con agua desionizada para el lavado y posteriormente en metanol al 30 % v/v en agua destilada. Finalmente, los hidrogeles se secaron en un horno a una temperatura cercana a 60 °C hasta alcanzar un peso constante.

Estudio de hinchamiento dinámico

El estudio de hinchamiento dinámico se llevó a cabo mediante el método de gravimetría, el cual consiste en ir midiendo la ganancia en peso del agua con respecto al tiempo de la inmersión del material en agua desionizada, para ello, los hidrogeles fueron secados a peso constante hasta obtener los xerogeles. Los xerogeles se sumergieron en vasos de precipitado con exceso de agua a temperatura ambiente.

A un tiempo determinado se sacaron los hidrogeles y se retiró el exceso de agua con papel absorbente y se tomaron los pesos con una balanza analítica y se devolvieron al vaso de precipitado, finalmente se llegó al equilibrio alrededor de 75 h, después de registrar 3 mediciones sucesivas, cada formulación

se realizó por triplicado y los valores reportados fueron los promedios y su variación estándar.

Porcentaje de hinchamiento

Los valores de hinchamiento se calcularon con la ecuación 1:

$$S = \frac{mt - m_0}{m_0} * 100\% \quad (1)$$

Donde el S es el porcentaje de Hinchamiento mt es el peso del hidrogel hinchado en un tiempo dado y m_0 es el peso del hidrogel seco (xerogel) (Yavari y Azizian, 2022).

Difusión de agua

La ley de Fick se utiliza para explicar la cinética de expansión y la difusión de las estructuras poliméricas. La cinética de hinchamiento es dada por (Ritger y Peppas, 1987), con la ecuación 2:

$$F = \frac{St}{Se} = kt^n \quad (2)$$

A partir de las gráficas de hinchamiento en un tiempo, se evaluó el ajuste en la ecuación de la difusión para tiempos cortos.

Donde "St" representa el hinchamiento a un tiempo dado "Se" representa el hinchamiento en el equilibrio y n es la difusión exponencial del disolvente dicho valor que se encuentra en función de la estructura de la red de los hidrogeles. Por lo que, para conocer el tipo de difusión, se debe conocer el parámetro de "n". El exponencial de difusión de "n" se puede estimar a partir de la pendiente del ajuste lineal de los datos del grafico $\ln Fv/s \ln t$ de la región donde el hinchamiento aun no alcanza el equilibrio, es decir, donde solo el 60 % de la masa del disolvente penetra en la estructura de los hidrogeles (Guilherme *et al.*, 2015).

Modelado matemático de la cinética de adsorción

Para determinar el mecanismo de hinchamiento de los hidrogeles en agua desionizada, se evaluó su ajuste a las ecuaciones integradas de cinética de primer y segundo orden con respecto al hinchamiento, según lo planteado por Schott (Schott, 1992; Xu *et al.*, 2010).

$$\frac{dS}{dt} = k(S_e - S_t) \quad \text{primer orden (3)}$$

$$\frac{t}{w} = A + Bt \quad \text{segundo orden (4)}$$

Análisis térmico

El análisis térmico fue realizado en un TGA Q500 en el intervalo de 30 a 700 °C, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, las mediciones térmicas fueron realizadas bajo atmosfera de nitrógeno con una velocidad de flujo de 50 mL/min y la masa de la muestra analizada vario entre 9 a 11 mg.

Espectroscopia infrarroja (FT-IR)

Para la caracterización química se realizó el análisis mediante espectroscopia infrarroja (FT-IR), empleando un equipo marca Perkin-Elmer, mediante Attenuated Total Reflected (ATR), las muestras fueron analizadas sin ningún tratamiento previo y corridas en el intervalo de 4500 a 600 cm^{-1} , con una resolución de 2 cm^{-1} y 32 scans.

Resultados

Hinchamiento dinámico

En la Figura 1, se presenta una fotografía donde se observa un hidrogel a base de poliacrilamida en estado xerogel y un hidrogel en el hinchamiento en el equilibrio, donde se puede observar el cambio de volumen del hidrogel.

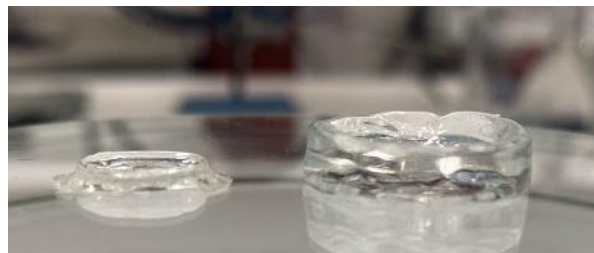


Figura 1. Hinchamiento de hidrogel a base de poliacrilamida.

Espectroscopia infrarroja

En la Figura 2, se presentan los espectros (FT-IR), correspondientes a los hidrogeles sintetizados con diferentes concentraciones de agente de entrecruzamiento que van del 1, 3 y 5 %, donde se pueden observar bandas características en la región de 3350 a 3180 una banda amplia correspondiente a los estiramientos del enlace N-H de la amida, en 2915 y 2835 cm^{-1} una banda de mediana intensidad, correspondiente a los estiramientos tanto simétricos

como asimétricos del CH₂ y dos bandas en la región de 1645 y 1590 cm⁻¹ del grupo C=O atribuido a la amida primaria y la vibración del alargamiento N-H, así mismo se observa que no hay una diferencia significativa en cada uno de los espectros analizados.

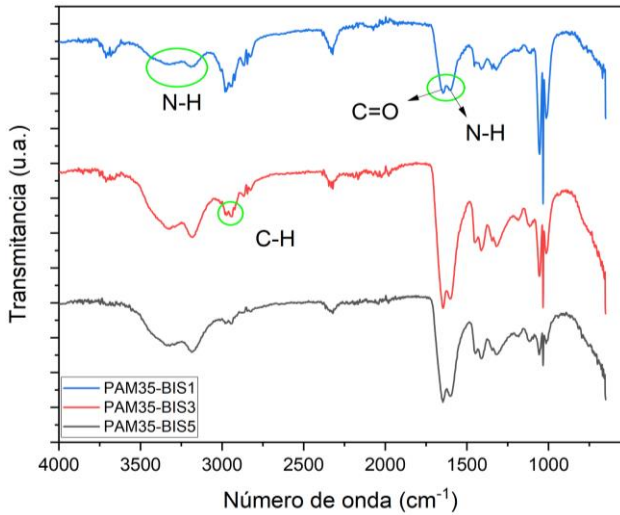


Figura 2. Espectros FT-IR de los hidrogeles sintetizados.

En la Figura 3. Se puede observar la gráfica del porcentaje de hinchamiento, términos generales los hidrogeles presentaron dos fases de hinchamiento, la primera etapa consta de un hinchamiento acelerado la cual está gobernada por una cinética de orden cero mientras que la segunda etapa se lleva a cabo mediante un hinchamiento lento hasta llegar al punto de equilibrio.

Es posible observar que el porcentaje de hinchamiento se encuentra correlacionado directamente con el porcentaje del agente de entrecruzamiento, dicho aumento se debe principalmente a que las cadenas presentan mayor movimiento y es más fácil la difusión del disolvente dentro del polímero. Los valores del porcentaje de hinchamiento se muestran en la Tabla 1. En donde se observa que el hidrogel PAM35-BIS1, fue el hidrogel con el mayor porcentaje de hinchamiento lo cual está directamente relacionado con la concentración del agente de entrecruzamiento, lo cual era un comportamiento esperado debido a que entre mayor sea la concentración del agente de entrecruzamiento se esperan mayores uniones por lo tanto las cadenas poliméricas se encuentran más compactas y será más difícil la penetración del

disolvente, un resultado similar a este lo reportó Lin *et al.*, 2023, estos autores reportaron la obtención de hidrogeles a base de poli(acrilamida) con quitosano; sin embargo, el tiempo de síntesis fue de 4 h para la obtención de los hidrogeles.

Por otra parte Tang *et al.*, 2022, reportó la obtención de hidrogeles entrecruzados a base de poli(acrilamida) con goma xantana mediante el método de un solo paso por medio de polimerización UV, reportando que la adición de la goma xantana ayudo a que el hidrogel no se disgregara después de las 30 h, lo cual es un comportamiento diferente al reportado en este trabajo debido a que, el hidrogel sintetizado no se disgrega aun después de 72 h, lo cual se debe al entrecruzamiento químico.

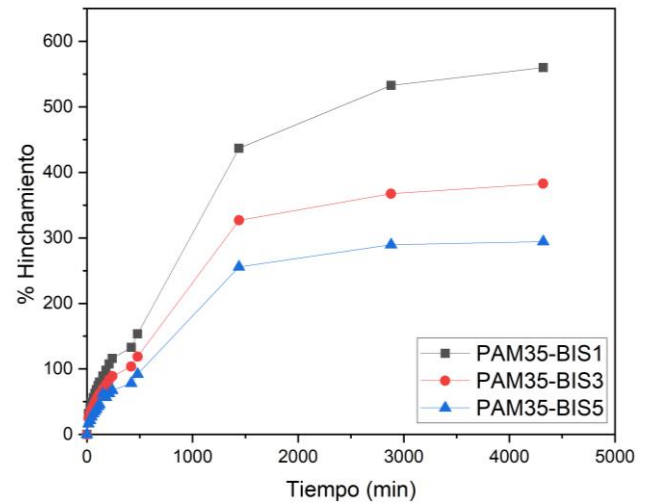


Figura 3. Porcentaje de hinchamiento de hidrogeles en función del tiempo con diferentes concentraciones de agente de entrecruzamiento.

Tabla 1. Porcentaje de hinchamiento para los hidrogeles con diferentes concentraciones del agente de entrecruzamiento.

Muestra	% Hinchamiento
PAM35-BIS1	560.03
PAM35-BIS3	382.81
PAM35-BIS5	294.36

A partir de los datos obtenidos en la determinación del porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles se

desarrollan las isotermas de hinchamiento para cada hidrogel sintetizado.

Estudio cinético

El hinchamiento de los hidrogeles se debe, al movimiento a gran escala de las cadenas poliméricas esta separación entre las cadenas va incrementando cada vez más con el hinchamiento, en dichos sistemas a medida que penetra el disolvente en el hidrogel el movimiento de las cadenas poliméricas no es inmediata, por lo tanto, la penetración de las moléculas de agua dentro de las redes poliméricas está en función de la estructura de la red.

Los hidrogeles sintetizados se investigaron desde el punto de vista del proceso de difusión del agua, es decir el mecanismo de transporte de agua dentro del hidrogel y el coeficiente de difusión. En este sentido se analizó el porcentaje del agente de entrecruzamiento (NNMBA) sobre los parámetros cinéticos de los hidrogeles sintetizados.

El comportamiento observado en cada uno de los casos presenta una tendencia similar de dos etapas: la primera corresponde a un hinchamiento acelerado mientras que la segunda etapa se lleva a cabo un hinchamiento lento hasta llegar al equilibrio, dentro de la primera etapa se construyeron gráficos como los que se muestran en la Figura 4, para calcular la difusión del agua dentro de los hidrogeles sintetizados.

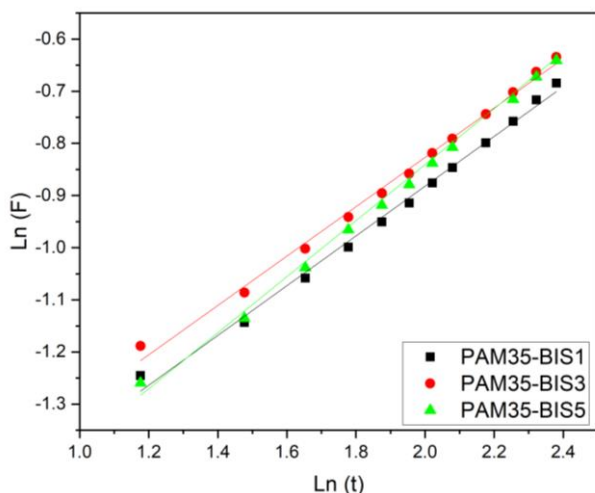


Figura 4. Difusión Fickiana para los hidrogeles de poliacrilamida en diferentes concentraciones del agente de entrecruzamiento.

Como se mencionó anteriormente, la pendiente del gráfico corresponde al coeficiente de difusión (n) el cual indica el tipo de mecanismo para el transporte del agua dentro del hidrogel. Un valor de $n = 0.50$ indica un proceso de difusión Fickiana ideal. Lo cual indica que la difusión del disolvente es mucho más lenta que la relajación de las cadenas poliméricas. Por el contrario, si n es mayor a 0.50, pero menor a 1 el tipo de transporte es anómalo ó no Fickiano, es decir la velocidad de la difusión del disolvente es proporcional a la relajación de las cadenas poliméricas. En la situación en que $n = 1$ el mecanismo de transporte es conocido como caso II, en el cual la velocidad de difusión del disolvente es mayor que la relajación de las cadenas poliméricas (Teodorescu *et al.*, 2010).

Los valores determinados mediante las ecuaciones de la recta para cada uno de los hidrogeles sintetizados se muestran en la Tabla 2. En las muestras PAM35-BIS1 y PAM35-BIS3 se tiene que $n < 0.5$, mientras que para la muestra PAM35-BIS5 el valor de n es mayor a 0.5, pero menor a 1. Cuando se presenta un aumento en la concentración del agente de entrecruzamiento por consecuencia se tiene un aumento en el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, al incrementar el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas aumenta el valor de n , lo cual se debe a que al aumentar la concentración del agente de entrecruzamiento se tiene una red tridimensional con mayor número de uniones, por consecuencia el control del proceso de difusión se da mediante un proceso controlado por la relajación de las cadenas poliméricas, lo cual se debe a que es más difícil la difusión de las moléculas de agua dentro de las cadenas poliméricas, un comportamiento similar al obtenido lo reporto Bajpai y Giri, 2003, reportando la obtención de hidrogeles a base de poliacrilamida adicionados con carboximetilcelulosa, mediante la polimerización vía radicales libres, estos autores reportaron que la difusión del agua estaba directamente relacionada con la concentración de agente de entrecruzamiento y la concentración del polímero en el hidrogel.

Tabla 2. Valores para el exponente n para los hidrogeles sintetizados con diferentes concentraciones del agente de entrecruzamiento.

Muestra	n
PAM35-BIS1	0.477
PAM35-BIS3	0.473
PAM35-BIS5	0.523

Posteriormente para conocer la constante de velocidad del hinchamiento (K) de los hidrogeles se empleó el modelo matemático de Schott. En este modelo se evaluaron las ecuaciones de primer y segundo orden, a partir de gráficos de los cuales se pudo determinar la k , así mismo, se reportó el ajuste en las ecuaciones de primer y segundo orden teniendo como resultado que todos los hidrogeles sintetizados presentan un mejor ajuste con la ecuación de primer orden (Schott, 1992).

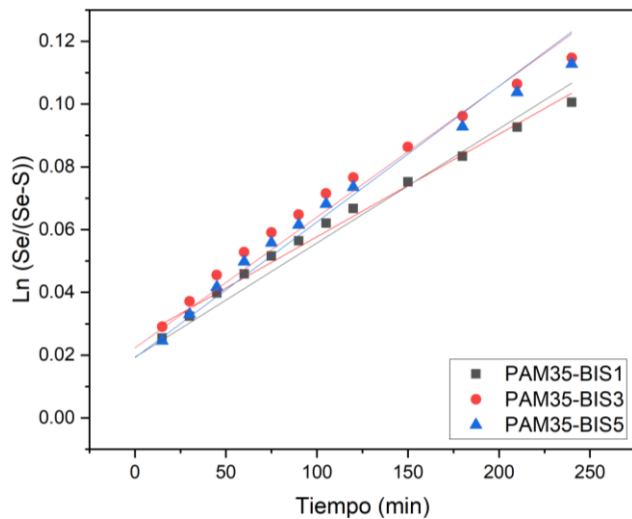


Figura 5. Ajuste lineal del hinchamiento a las cinéticas de primer orden para los hidrogeles con diferentes concentraciones del agente de entrecruzamiento.

Los coeficientes lineales de los ajustes de las cinéticas de primer y segundo orden, referidas en las Figuras 5 y 6 se muestran en la Tabla 3.

Mediante los resultados de las gráficas anteriores se encontró que el incremento de la velocidad de hinchamiento está relacionado con la concentración del agente de entrecruzamiento y es inversamente proporcional al hinchamiento, esto debido a que entre mayor sea la concentración del agente de entrecruzamiento es mayor el número de uniones dentro de la cadena polimérica y disminuye la

cantidad de grupos hidrófilos disponibles, lo cual dificulta la penetración de las moléculas de agua dentro de los hidrogeles, desencadenando en la disminución del hinchamiento y aumentando la velocidad de hinchamiento.

Tabla 3. Coeficientes de ajuste lineal para las cinéticas de primer y segundo orden.

Muestra	R^2 (primer orden)	K_1 (min^{-1}) 10^{-4}	R^2 (segundo orden)	K_2 (min^{-1})
PAM35-BIS1	0.9903	3.640	0.9512	5.198×10^{-6}
PAM35-BIS3	0.9891	4.170	0.9555	8.759×10^{-6}
PAM35-BIS5	0.9883	4.327	0.9536	1.001×10^{-5}

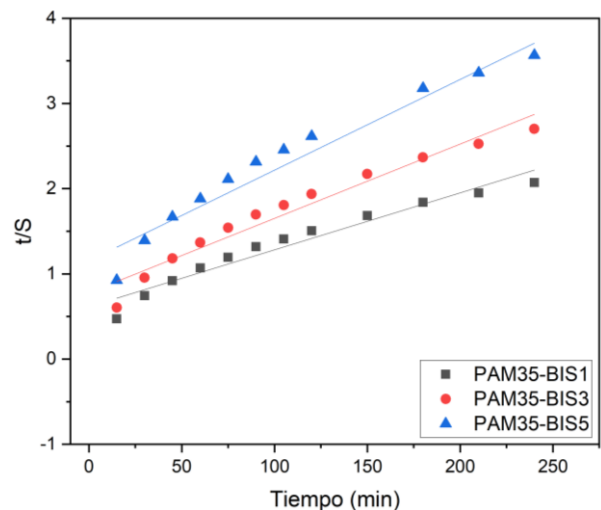


Figura 6. Ajuste lineal del hinchamiento a las cinéticas de segundo orden para los hidrogeles con diferentes concentraciones del agente de entrecruzamiento.

Análisis termogravimétrico

Se estudio la degradación de los hidrogeles en el intervalo de temperatura de 30 a 700 °C, en la Figura 7, se presentan los termogramas analizados así como, sus derivadas para cada uno de los hidrogeles sintetizados, todos los hidrogeles sintetizados presentan un comportamiento similar a la temperatura, teniendo cuatro principales pérdidas en peso, la primera pérdida es la deshidratación del hidrogel, la segunda etapa es la pérdida de los

grupos laterales (Imidización), la tercera etapa se da por la descomposición de la matriz de la poli(acrilamida), y por último la cuarta pérdida corresponde a la pirólisis del material (Zamani-Babgohari *et al.*, 2023).

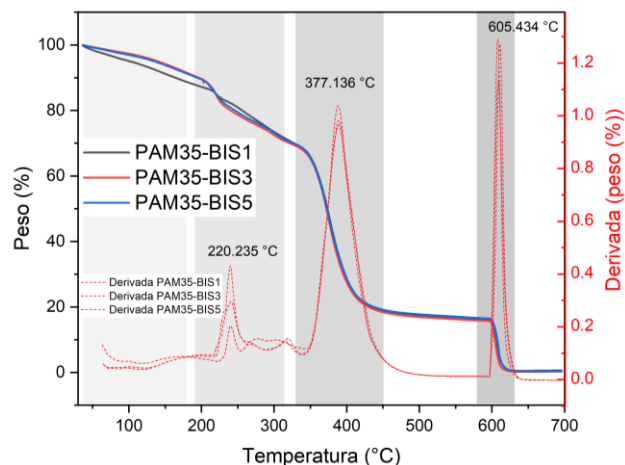


Figura 7. Termogramas de los hidrogeles sintetizados.

Conclusiones

En este trabajo se sintetizaron una serie de hidrogeles a base de poli(acrilamida) con diferente concentración del agente de entrecruzamiento, mediante un método sencillo, el contenido de agua en el equilibrio de los hidrogeles se vio relacionado directamente con la concentración del agente de entrecruzamiento, al disminuir la concentración del agente de entrecruzamiento aumenta el porcentaje de hinchamiento, por otra parte de acuerdo a los valores del coeficiente de difusión (n), los hidrogeles PAM35-BIS1 y PAM35-BIS3 presentaron un proceso de difusión tipo Fickiana ideal o menos Fickiana, mientras que el hidrogel PAM35-BIS5, presentó un mecanismo de penetración del agua del tipo anómalo, todos los hidrogeles presentaron un ajuste en la cinética de hinchamiento de primer orden.

Con respecto a el análisis termogravimétrico, todos los hidrogeles presentaron una tendencia similar en cuanto a la resistencia a la temperatura, la cual no se ve afectada para estos sistemas al variar la concentración del agente de entrecruzamiento y mediante la espectroscopía infrarroja, se observaron las bandas de los grupos funcionales característicos para este polímero, así mismo se propone el uso de este tipo de hidrogeles amigables con el medio

ambiente dentro de las ciencias ambientales debido a la alta adsorción de agua y su buena estabilidad.

Agradecimientos

Se agradece al Laboratorio de Química Ambiental del Centro de Química-ICUAP, así como el apoyo brindado por la Facultad de ingeniería Química y el Centro de Investigación en Química Aplicada, a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por brindar las instalaciones necesarias para la realización la estancia posdoctoral, al CONAHCYT por la beca posdoctoral otorgada CVU 863187 y el proyecto 2023 VIEP-BUAP-100409466.

Referencias

- Ahmadian, M., Derakhshankhah, H., & Jaymand, M. (2023). Recent advances in adsorption of environmental pollutants using metal–organic frameworks-based hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123333. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123333>
- Awasthi, S., Gaur, J. K., Bobji, M. S., & Srivastava, C. (2022). Nanoparticle-reinforced polyacrylamide hydrogel composites for clinical applications: A review. *Journal of Materials Science*, 57(17), 8041–8063. <https://doi.org/10.1007/s10853-022-07146-3>
- Bajpai, A. K., & Giri, A. (2003). Water sorption behaviour of highly swelling (carboxy methylcellulose-g-polyacrylamide) hydrogels and release of potassium nitrate as agrochemical. *Carbohydrate Polymers*, 53(3), 271–279. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00071-7](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00071-7)
- Bashir, S., Hina, M., Iqbal, J., Rajpar, A. H., Mujtaba, M. A., Alghamdi, N. A., Wageh, S., Ramesh, K., & Ramesh, S. (2020). Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties, and Their Applications. *Polymers*, 12(11), 2702. <https://doi.org/10.3390/polym12112702>
- Başıyğit, B., Altun, G., Yüçetepe, M., Karaaslan, A., & Karaaslan, M. (2023). Locust bean gum provides excellent mechanical and release attributes to soy protein-based natural hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 231,

123352.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123352>
- Brazel, C. S., & Peppas, N. A. (1999). Mechanisms of solute and drug transport in relaxing, swellable, hydrophilic glassy polymers. *Polymer*, 40(12), 3383–3398. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(98\)00546-1](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00546-1)
- Chen, Y. (2020). Properties and development of hydrogels. En *Hydrogels Based on Natural Polymers* (pp. 3–16). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816421-1.00001-X>
- Dimatteo, R., Darling, N. J., & Segura, T. (2018). In situ forming injectable hydrogels for drug delivery and wound repair. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 127, 167–184. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.03.007>
- Fan, S., Tang, Q., Wu, J., Hu, D., Sun, H., & Lin, J. (2008). Two-step synthesis of polyacrylamide/poly(vinyl alcohol)/polyacrylamide/graphite interpenetrating network hydrogel and its swelling, conducting and mechanical properties. *Journal of Materials Science*, 43(17), 5898–5904. <https://doi.org/10.1007/s10853-008-2855-z>
- Ganguly, S., & Margel, S. (2022). 3D printed magnetic polymer composite hydrogels for hyperthermia and magnetic field driven structural manipulation. *Progress in Polymer Science*, 131, 101574. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2022.101574>
- González, N., Prin, J. L., Benítez, J. L., Ramírez, A., García, A., Ramírez, M., Sabino, M., & Rojas de Gáscue, B. (2012). Estudio de la cinética de difusión en hidrogeles sintetizados a partir de acrilamida-co-ácido acrílico con turba y almidón vía calentamiento convencional y bajo radiación microondas. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 32(1), 136–144.
- Guilherme, M. R., Aouada, F. A., Fajardo, A. R., Martins, A. F., Paulino, A. T., Davi, M. F. T., Rubira, A. F., & Muniz, E. C. (2015). Superabsorbent hydrogels based on polysaccharides for application in agriculture as soil conditioner and nutrient carrier: A review. *European Polymer Journal*, 72, 365–385. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.04.017>
- Hoffman, A. S. (2002). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(1), 3–12. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00239-3)
- Khan, S. A., Siddiqui, M. F., & Khan, T. A. (2020). Ultrasonic-assisted synthesis of polyacrylamide/bentonite hydrogel nanocomposite for the sequestration of lead and cadmium from aqueous phase: Equilibrium, kinetics and thermodynamic studies. *Ultrasonics Sonochemistry*, 60, 104761. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104761>
- Lin, X., Liu, Z., Chen, R., Hou, Y., Lu, R., Li, S., Ren, S., & Gao, Z. (2023). A multifunctional polyacrylamide/chitosan hydrogel for dyes adsorption and metal ions detection in water. *International Journal of Biological Macromolecules*, 246, 125613. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125613>
- Mushtaq, F., Raza, Z. A., Batool, S. R., Zahid, M., Onder, O. C., Rafique, A., & Nazeer, M. A. (2022). Preparation, properties, and applications of gelatin-based hydrogels (GHs) in the environmental, technological, and biomedical sectors. *International Journal of Biological Macromolecules*, 218, 601–633. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.168>
- Porter, T., Stewart, R., Reed, J., & Morton, K. (2007). Models of Hydrogel Swelling with Applications to Hydration Sensing. *Sensors*, 7(9), 1980–1991. <https://doi.org/10.3390/s7091980>
- Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, 5(1), 23–36. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90034-4](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90034-4)
- Schott, H. (1992). Kinetics of swelling of polymers and their gels. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81(5), 467–470. <https://doi.org/10.1002/jps.2600810516>
- Tang, S., Gong, Z., Wang, Z., Gao, X., & Zhang, X. (2022). Multifunctional hydrogels for wound

dressings using xanthan gum and polyacrylamide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 217, 944–955. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.181>

Teodorescu, M., Cursaru, B., & Stanescu, P. O. (2010). Swelling and Diffusion Characteristics of Hydrogels Synthesized from Diepoxy-terminated Poly(ethylene glycol)s and Aliphatic Polyamines. *Soft Materials*, 8(3), 288–306. <https://doi.org/10.1080/1539445X.2010.495631>

Wang, S., Yu, P., Li, X., Zhao, Z., Dong, Y., & Li, X. (2023). Design and fabrication of functional hydrogels with specific surface wettability. *Colloid and Interface Science Communications*, 52, 100697. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2023.100697>

Xu, S., Fan, L., Zeng, M., Wang, J., & Liu, Q. (2010). Swelling properties and kinetics of CaCl₂/polyacrylamide hygroscopic hybrid hydrogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 371(1–3), 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.09.003>

Yavari, N., & Azizian, S. (2022). Mixed diffusion and relaxation kinetics model for hydrogels swelling. *Journal of Molecular Liquids*, 363, 119861. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119861>

Zamani-Babgohari, F., Irannejad, A., Khayati, G. R., & Kalantari, M. (2023). Non-isothermal decomposition kinetics of commercial polyacrylamide hydrogel using TGA and DSC techniques. *Thermochimica Acta*, 725, 179532. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2023.179532>

ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD Y COMPORTAMIENTO DINÁMICO DE UNA COLUMNA DE DESTILACIÓN PARA UNA MEZCLA AZEOTRÓPICA

SENSITIVITY ANALYSIS AND DYNAMIC BEHAVIOR OF A DISTILLATION COLUMN FOR AN AZEOTROPIC MIXTURE

Moisés Lobatón Montiel, Elsa Hynmar Fernández Martínez, Brian Manuel González Contreras*

Universidad Autónoma de Tlaxcala, Facultad de Ciencias Básicas, Ingeniería y Tecnología, Calzada Apizaquito S/N, Tlaxcala, México. E-mail: elsahynmar.fernandez@uatx.mx

Received September 16, 2023; Revised: November 23, 2023; Accepted November 28, 2023

Resumen

La destilación es una operación de separación intensiva y presenta una baja eficiencia termodinámica, lo que genera costos operativos elevados. En general, las columnas de destilación tienen diversos problemas en el rendimiento del sistema de control, siendo las mezclas azeotrópicas las que lo complican aún más. Además, un sistema mal condicionado es ocasionado por la incertidumbre en las condiciones de operación del proceso, así como del modelo del sistema. Asimismo, la direccionalidad es una característica crucial para definir un esquema de control eficiente. En el caso de la mezcla Etanol/Agua, se presenta un azeótropo de temperatura de ebullición mínimo que limita obtener purezas altas. Su comportamiento dinámico representa un problema interesante de control debido a la termodinámica del sistema y a la no linealidad multivariable del modelo, donde las variables tienen interacciones significativas y están sujetas a perturbaciones, lo que genera los inconvenientes de direccionalidad y mal condicionamiento. En este trabajo, se llevó a cabo un análisis de sensibilidad utilizando simulaciones en estado estacionario del sistema Etanol/Agua, con impacto en el consumo energético cerca de la composición azeotrópica. Asimismo, se realizó la simulación dinámica del sistema con controladores PI con la finalidad de observar el comportamiento de las variables de interés en la respuesta del sistema. Los resultados muestran que con un controlador PI se verifica la direccionalidad, el mal condicionamiento y la no linealidad del sistema azeotrópico, pero el tiempo de estabilidad es más grande respecto con un controlador avanzado.

Palabras clave: Etanol-Agua, Azeótropo, Control, Simulación dinámica, Análisis de sensibilidad

Abstract

Distillation is a separation-intensive operation and has low thermodynamic efficiency, resulting in high operating costs. In general, distillation columns have several problems in control system performance, with azeotropic mixtures complicating it even more. In addition, a poorly conditioned system is caused by uncertainty in the operating conditions of the process as well as the system model. Also, directionality is a crucial characteristic to define an efficient control scheme. In the case of the Ethanol/Water mixture, there is a minimum boiling temperature azeotrope that limits obtaining high purities. Its dynamic behavior represents an interesting control problem due to the thermodynamics of the system and the multivariable nonlinearity of the model, where the variables have significant interactions and are subject to perturbations, which generates the drawbacks of directionality and ill-conditioning. In this work, a sensitivity analysis was carried out using steady state simulations of the Ethanol/Water system, with impact on the energy consumption near the azeotropic composition. Also, the dynamic simulation of the system with PI controllers was performed in order to observe the behavior of the variables of interest in the

system response. The results show that with a PI controller the directionality, ill-conditioning and nonlinearity of the azeotropic system are verified, but the stability time is longer than with an advanced controller.

Keywords: Ethanol-Water, Azeotrope, Control, Dynamic Simulation, Sensitivity analysis

Introducción

El diseño, la optimización y el control de columnas de destilación convencionales (Srygley & Holland, 1965; Skogestad, 1992; Herbert, 2000; Liu et al., 2011; Dimian et al., 2014; Ng, et al., 2017; Giri & Mahajan, 2023) y de la destilación asistida de sistemas azeotrópicos (Abu-Eishah & Luyben, 1985; Li et al., 2017; Yi & Chien, 2019; Zhu et al., 2021; Xu et al., 2022) han sido ampliamente estudiadas a través del tiempo. Se han reportado estudios (Uddin et al., 2018; Shen et al., 2016; Lei, 2017) sobre la separación de componentes que forman azeótropos, en las que se desean obtener altas purezas cerca de la composición azeotrópica en columnas de destilación convencionales, tanto en estado estacionario, como en estado dinámico (Dimian et al., 2014).

La ingeniería de procesos en el área de destilación ha desarrollado tecnologías relacionadas con el ahorro energético y las bajas eficiencias termodinámicas que presentan los sistemas azeotrópicos (Kiss & Ignat, 2012b; Kiss & Ignat, 2013; Kim, 2016; Lee & Kim, 2018). La naturaleza de estos sistemas muestra propiedades fisicoquímicas que hacen que la separación sea compleja, debido a que, en condiciones normales, la destilación no puede producir componentes más puros que el azeótropo, generando con ello altos consumos de energía y problemas en el control de la columna (Mahdi et al., 2015; Taqvi et al., 2016; Taqvi et al., 2017). Las columnas de destilación de alta pureza son conocidas por sus características peculiares, que incluyen una dinámica complicada, no linealidad e interacción, lo cual, produce un problema de control (Zhu et al., 2009).

El sistema Etanol/Agua forma un azeótropo de temperatura de ebullición mínima (ver Figura 1), con una composición azeotrópica del 89% molar (93.5% en peso) y una temperatura azeotrópica de 78.1°C. En este punto la volatilidad relativa de la mezcla tiene un valor de uno, por lo tanto, no hay separación de los componentes debido a su termodinámica. Por lo que en una columna de destilación convencional sólo es posible obtener el etanol con una pureza inferior a la composición azeotrópica (Tavan & Hosseini, 2013; Gil et al., 2012; Henley & Seader, 2018). La estimación del Equilibrio Líquido-Vapor (ELV) del sistema se calcula mediante la ley de Raoult modificada con un modelo de composición local como Wilson, NRTL o UNIQUAC; los cuales

determinan el coeficiente de actividad para la fase líquida.

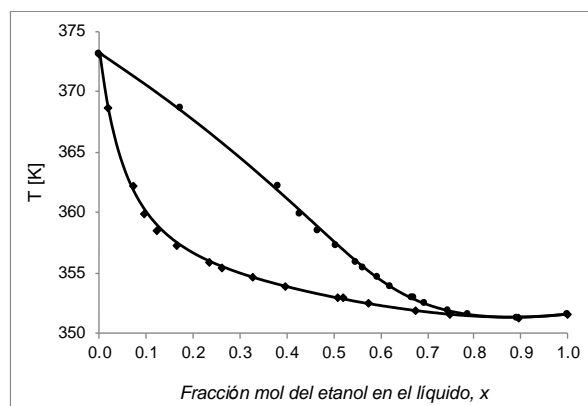


Figura 1.- Estimación del Equilibrio Líquido-Vapor de la mezcla Etanol/Agua comparada con datos experimentales.

Existen diversos métodos (Dimian et al., 2019; Frolkova & Raeva, 2010; Kaminski et al., 2008) para modificar o romper el punto azeotrópico con la intención de purificar el componente de interés, más allá de la composición azeotrópica: la pervaporación, la adsorción, la destilación por cambio de presión, la destilación azeotrópica, la destilación extractiva y la destilación cíclica.

Previo a esta purificación para el caso específico de la deshidratación de etanol (90-93.5% en peso) se lleva a cabo la pre-concentración de etanol desde un 5 hasta 12% en peso de etanol. En el sistema de deshidratación de bio-etanol, la columna pre-concentradora requiere los más altos consumos energéticos (Kiss & Suszwalak, 2012; Kiss & Ignat, 2012b; Kiss & Ignat, 2013;) debido a la gran cantidad de agua a separar en esta etapa, más la energía de separación que se requiere al acercarse a la composición azeotrópica.

Las simulaciones en estado estacionario se emplean para verificar el balance de materia y energía del sistema (Luyben & Chien, 2010; Henley & Seader, 2018), además de que nos permiten realizar análisis y evaluaciones de separación y energéticas.

Para que la simulación dinámica de la columna se dé como un proceso real en operación, se requiere de un impulso propiciado por un cambio en la presión. La simulación dinámica requiere tanto de las condiciones del proceso como del dimensionamiento

adecuado de los equipos que conforman el sistema de destilación (válvulas, intercambiadores de calor, tanques, columna, bombas, divisores, entre otros) para su controlabilidad durante la operación dinámica (Luyben & Chien, 2010).

La tarea de separación de mezclas azeotrópicas implica disminuir problemas que afecten la controlabilidad de la columna y el incremento de las cargas térmicas (energía en el condensador y rehervidor). Para alcanzar las composiciones de productos deseadas se aplican estrategias de control que permitan mantener las variables en el sistema y, al mismo tiempo, evitar que las perturbaciones afecten la obtención del producto deseado, sobre todo, cerca de la composición azeotrópica. Asimismo, la no linealidad en la dinámica de sistemas provoca problemas en los esquemas de control convencionales (Liu et al., 2011).

Para resolver los inconvenientes presentados en la separación de sistemas azeotrópicos, se utilizan estrategias de control avanzadas (Uddin et al., 2018; Liu et al., 2011). Además, se emplean algoritmos de control precisos y diseñados considerando criterios de controlabilidad dentro de la zona de funcionamiento de la destilación para mantener las condiciones óptimas de operación y garantizar la producción continua de productos.

En este trabajo se realiza una discusión sobre el análisis de sensibilidad mediante simulaciones en estado estacionario del sistema Etanol/Agua para cuantificar la cantidad de energía de separación en la cercanía de la composición azeotrópica, donde se espera que en su proximidad la energía requerida es mayor. Se realiza la simulación dinámica del sistema con controladores PI con la finalidad de observar el comportamiento de las variables más sensibles en la respuesta del sistema, así como la verificación del consumo energético de la separación en estado dinámico. La aportación del trabajo radica en validar los controladores lineales antes de llegar al límite azeotrópico y así justificar el diseño de controladores avanzados.

Para controlar una columna de destilación se requiere conocer algunas propiedades como la no linealidad, el mal condicionamiento y la direccionalidad. Por mal condicionado se entiende que la ganancia en lazo abierto de un sistema, como la columna de destilación, depende en gran medida de la dirección de entrada, o lo que es lo mismo, que el sistema tiene un número de condición alto

(Skogestad et al., 1988). También se dice que un sistema mal condicionado se caracteriza por una fuerte direccionalidad porque las entradas en direcciones correspondientes a ganancias altas en el sistema son fuertemente amplificadas, mientras que las entradas en direcciones correspondientes a ganancias bajas del sistema no lo son (Sågfors & Waller, 1998).

El diseño de controladores desacoplados busca establecer manipulaciones independientes encargadas de controlar una sola variable de entre varias del sistema, tratando de evitar las interacciones entre las otras variables. Las interacciones ocurren cuando las múltiples variables están interconectadas y se afectan entre sí. Por ello son denominados sistemas multivariables acoplados o interactuantes.

Por ejemplo, las Figuras 2 y 3 muestran las respuestas en lazo abierto para un sistema de dos salidas (Y_1 y Y_2) y dos entradas (u_1 y u_2), es decir, un sistema 2×2 . Las respuestas indican que se trata de un proceso que es interactivo, no lineal y mal condicionado. Para el caso de la Figura 2, donde se presenta la salida Y_1 , se observa que los cambios de la entrada u_1 no provocan cambios en la salida de manera proporcional a los cambios que provoca la entrada u_2 en la Figura 3.

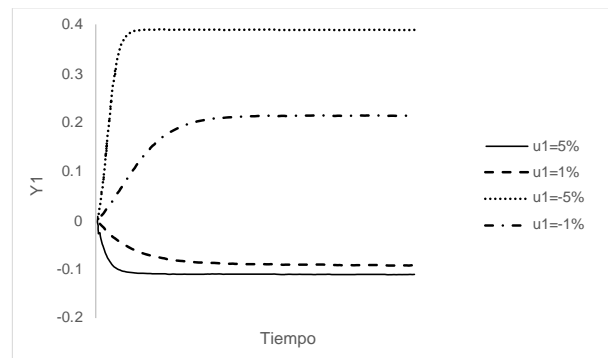


Figura 2.- Respuesta de la salida de la planta Y_1 para cambios de escalón en u_1 . (Ravi Srinivas et al., 1995).

Esto refleja la interacción entre lazos del sistema y, al mismo tiempo, muestra que la direccionalidad es elevada para u_2 respecto a u_1 . Por otro lado, cambios positivos en u_1 provocan que la salida varíe de forma negativa, mientras que cambios negativos provocan cambios positivos. Lo contrario ocurre para el caso de la entrada u_2 . Esto es un reflejo de que se trata de un sistema mal condicionado.

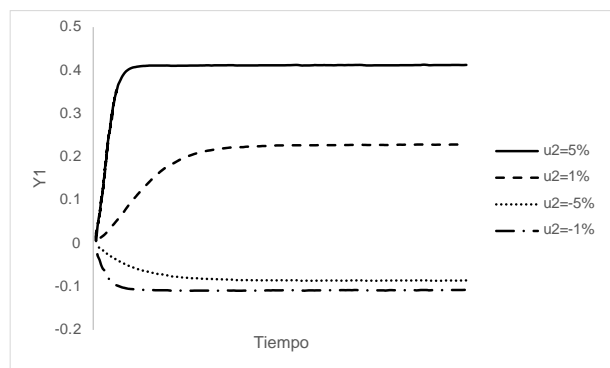


Figura 3.- Respuesta de la salida de la planta Y1 para cambios de escalón en u2. (Ravi Srinivas et al., 1995).

La propiedad más significativa es la no linealidad del sistema. La dinámica no lineal de las columnas de destilación convencionales incluye altas ganancias en estado estacionario, grandes retrasos de respuesta y una fuerte dependencia de las ganancias, así como magnitudes y direcciones de las perturbaciones, particularmente aquellas para productos con alta pureza (Liu et al., 2011).

El tipo de control aplicado en la dinámica del sistema es tipo pre-alimentado a excepción del control de la presión. En un sistema de control pre-alimentado, la información sobre la variable controlada se anticipa y se introduce en el sistema antes de que ocurra una desviación, lo que permite una respuesta más rápida y precisa.

Por otro lado, un sistema de control retroalimentado ajusta la salida del proceso en función de la diferencia entre la variable controlada y la deseada (Broll et al., 1995). Bajo ciertas condiciones, puede tener una respuesta más lenta y menos precisa en comparación con el control pre-alimentado.

La elección entre uno u otro depende de la naturaleza del proceso y los objetivos de control. El control pre-alimentado es efectivo cuando se pueden prever las perturbaciones o se requiere una respuesta instantánea, pero puede ser más complicado de implementar y requiere una comprensión detallada del proceso. El control retroalimentado es ampliamente aplicable y fácil de implementar.

Metodología del Proceso de Simulación

Las simulaciones en estado estacionario y en estado dinámico se llevaron a cabo en el simulador de procesos UniSim Design de Honeywell versión R460.

El modelo termodinámico que se empleó en el simulador para predecir el ELV no ideal del sistema Etanol/Agua fue UNIQUAC (UNIversal QUAsiChemical), con el cual se estimaron los coeficientes de actividad de la fase líquida para corregir la no idealidad de la mezcla; mientras que para la fase vapor se consideró gas ideal. Se eligió este modelo también con fines comparativos con la literatura. El modelo tiene dos contribuciones, una combinatorial g^C , que representa el tamaño molecular con parámetros de sustancias puras y las diferencias de forma y otra contribución residual g^R , que cuantifica las interacciones moleculares con dos parámetros por cada par de moléculas. Las ecuaciones que describen este modelo termodinámico son muy conocidas (Henley & Seader, 2018) y debido a que el simulador estima el ELV, incluirlas, está fuera del alcance de este trabajo.

Modelamiento de la destilación

El modelo riguroso de una columna de destilación convencional en estado dinámico se basa en las ecuaciones que representan los balances de materia y energía, el equilibrio y las restricciones (sumatorias) de las etapas en equilibrio con mezclado perfecto entre las fases (Figura 4), denominado como ecuaciones MESH. (Kenig & Blagov, 2014; Bisgaard et al., 2015; Henley & Seader, 2018).

$$\frac{d(M_{i,j})}{dt} = L_{i-1}x_{i-1,j} + V_{i+1}y_{i+1,j} + F_i z_{i,j} - (L_i + U_i)x_{i,j} - (V_i + W_i)y_{i,j} \quad i = 1, \dots, N \setminus \{k\} \quad (1)$$

$$\frac{d(M_{T,i}h_i^L)}{dt} = L_{i-1}h_{i-1}^L + V_{i+1}h_{i+1}^V + F_i h_{F,i} + Q_i + q_i - (L_i + U_i)h_i^L - (V_i + W_i)h_i^V, \quad i = 1, \dots, N \setminus \{k\} \quad (2)$$

$$K_{i,j} = \frac{y_j}{x_i} \quad i = 1, \dots, N \setminus \{k\} \quad (3)$$

$$\sum_{j=1}^c x_j - 1 = 0 \quad \sum_{j=1}^c y_j - 1 = 0 \quad (4)$$

Donde $M_{i,j}$ es la cantidad molar del componente j en la etapa i . L_i, V_i, F_i son los flujos de líquido, vapor y alimentación de la etapa i ; U_i y W_i son los flujos de líquido y vapor de bifurcación de las corrientes L_i y V_i . Mientras que $x_{i,j}$, $y_{i,j}$ y $z_{i,j}$ son las composiciones del líquido, vapor y alimentación del componente j en la etapa i . MT representa la cantidad molar total de la etapa i , h_i^L , h_i^V y h_i^F son las entalpías de las corrientes

del líquido, vapor y alimentación de la etapa i . Q_i y q_i son los flujos de calor externo e interno respectivamente.

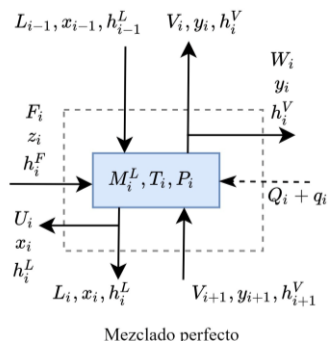


Figura 4.- Representación esquemática de una etapa ideal.

El conjunto de ecuaciones (1-4) se resuelve de manera rigurosa en cualquier simulador de procesos en el área de Ingeniería Química para una columna de destilación, tanto en estado estacionario como dinámico.

Simulaciones en estado estacionario

Las simulaciones en el estado estacionario de las columnas de destilación son importantes como estudio previo a la simulación dinámica, debido a que permiten analizar las variables en el sistema y verificar el balance de materia y energía. Para la separación en el sistema Etanol/Agua, el incremento significativo de las cargas térmicas cuando la pureza se acerca a la composición azeotrópica está relacionado con el control de la columna en el estado dinámico. En la Figura 5 se muestra el esquema de la columna de destilación convencional en el ambiente de simulación de UniSim en estado estacionario. Se emplearon las especificaciones sugeridas en Uddin et al., (2018).

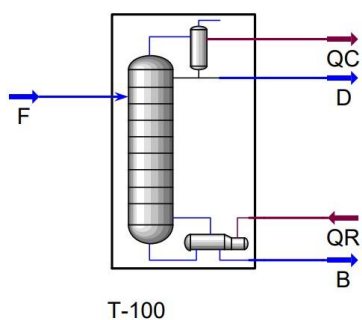


Figura 5.- Simulación en estado estacionario de una columna convencional para separar Etanol de Agua.

El flujo de alimentación de una mezcla Etanol y Agua se introdujo en la columna de destilación a razón de 21.42 kmol/h con una concentración molar de Etanol del 25% a la temperatura de 77 °C y presión de 130.95 kPa. La columna de destilación binaria de la planta piloto experimental tiene un número fijo de 15 etapas; en este estudio se consideraron los 15 platos teóricos más el re-hervidor y el condensador, ya que en la literatura no se especifica este dato.

Con la finalidad de validar los parámetros del modelo termodinámico en el simulador se compararon los perfiles de composición y las cargas térmicas con composiciones de etanol desde el 80 hasta el 84 porcentual molar utilizando cuatro conjuntos de parámetros de la literatura (Gmehling & Onken, 2002) para la mezcla Etanol/Agua (Tabla 1) y los parámetros proporcionados por el simulador. Asimismo, se determinó qué conjunto de parámetros proporcionaba menor energía en la separación. Dado que las cargas térmicas en el condensador y en el re-hervidor de la columna se incrementan en la proximidad del azeótropo, este análisis se extendió hasta el 88% molar para cubrir todas las composiciones previas a la composición azeotrópica y verificar el efecto de la composición de destilado sobre la energía de separación.

Tabla 1.- Parámetros para la mezcla Agua/Etanol del modelo UNIQUAC.

Parámetros	A_{12}	A_{21}
1	9.5115	307.7309
2	21.7366	262.9622
3	-94.6899	427.5173
4	130.8159	168.4557
UniSim	50.8846	232.0090

Los parámetros de interacción del modelo UNIQUAC A_{12} y A_{21} están expresados en cal/mol.

Simulaciones en estado dinámico

En la Figura 6 se muestra la simulación dinámica para separar Etanol de Agua en el entorno del simulador. A diferencia del estado estacionario, en el estado dinámico se adicionaron más equipos, así como la especificación de las alturas de los mismos, de tal forma que permitieran el movimiento de flujo a través de todo el proceso de separación. También fue necesario especificar las dimensiones de la columna según lo establecido en la planta piloto descrita en (Uddin et al., 2018), la cual tiene una longitud de 5.5 m y un diámetro de 0.15 m

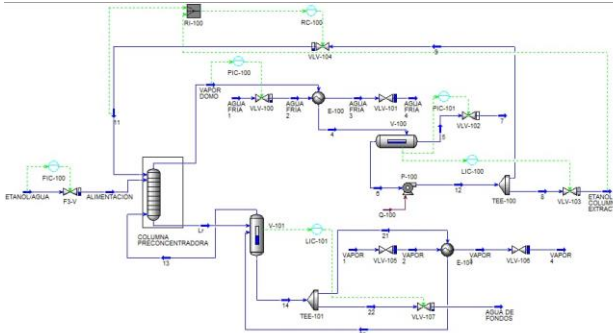


Figura 6.- Simulación dinámica de una columna convencional para separar Etanol de Agua.

La columna tiene 4 controladores principales (Uddin et al., 2018), uno para el flujo de alimentación, otro para la presión en el domo de la columna y dos para los niveles de los tanques del condensador y el sumidero de la columna. Para este trabajo se adicionaron 2 controladores más, uno para la relación de reflujo a la columna, debido a que este facilita las perturbaciones en el sistema y otro para la presión de la válvula de desfogue en el tanque de condensados, este es relevante para evitar problemas de inundación.

Tabla 2.- Ganancias y tiempos integrales de los controladores PI.

Controlador	K_c	T_i
Flujo de alimentación	0.05	0.025
Presión en domo de columna	0.045	0.14
Nivel del tanque de condensados	1.5	45
Nivel de sumidero de columna	1.8	43.6
Relación de reflujo	0.025	0.025
Válvula de alivio (tanque de condensados)	0.08	0.06

La estrategia de control utilizada para cada uno de los controladores fue del tipo Proporcional-Integral, debido a que estos son los que están integrados en el simulador. En la Tabla 2 se presentan las ganancias y los tiempos integrales para todos los controladores empleados en la simulación dinámica de la columna convencional del sistema Etanol/agua. Los cálculos para determinar los valores mostrados se realizaron de acuerdo con las reglas de sintonización de Ziegler-Nichols (Dimian et al., 2014).

Resultados

Las cargas térmicas del condensador y del re-ebullición se muestran en la Tabla 3 y fueron obtenidas partir de las simulaciones en estado estacionario con los cuatro conjuntos de parámetros del modelo UNIQUAC. Se observa que el conjunto de parámetros 2 y los parámetros del simulador son equivalentes y proporcionan la menor carga energética, por lo que se decidió utilizar los parámetros del simulador para realizar los análisis posteriores en los estados estacionario y dinámico.

Tabla 3.- Energía de separación en condensador y re-ebullición utilizando diferentes conjuntos de parámetros.

Parámetros	Q_c [kW]	Q_r [kW]
1	87.43	94.04
2	77.84	84.74
3	83.38	90.19
4	83.22	89.88
UniSim	77.98	84.94

Asimismo, se muestra el comportamiento de los perfiles de composición (comportamiento típico de un sistema binario) utilizando el conjunto de parámetros 2 y los parámetros del simulador (Figura 7). Se puede ver que el comportamiento de los mismos es semejante y se traslapan, por lo que es indistinto usar un conjunto de parámetros u otro, además de que ambos proporcionan la más baja térmica de las simulaciones en estado estacionario.

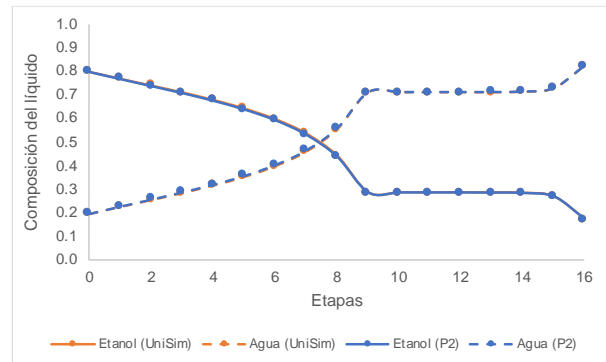


Figura 7.- Comparación de los perfiles de composición del líquido con dos conjuntos de parámetros.

El comportamiento de la energía de separación que incluye las cargas térmicas en el condensador y en el re-ebullición se muestran en la Figura 8. En la literatura se considera este análisis hasta el 84% molar, composición a la cual generalmente se obtiene el

etanol en la columna pre-concentradora para posteriormente ser alimentada al proceso de deshidratación de bio-etanol. Comparando las cargas térmicas obtenidas en este trabajo con las de la literatura en la cual se empleó el simulador Aspen Plus se muestran diferencias porcentuales entre el 0.43% al 29.29%; cuando el etanol se va purificando este porcentaje se incrementa.

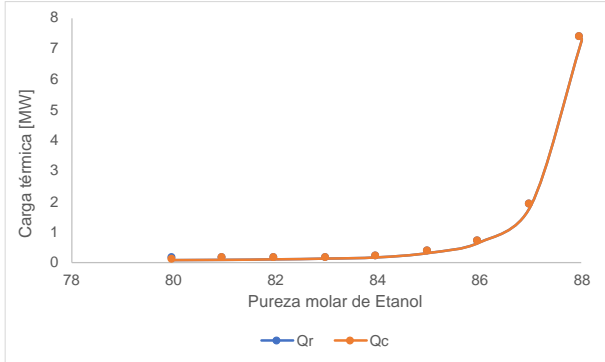


Figura 8.- Impacto de la pureza de etanol sobre la energía de separación.

En este estudio se analizó la pureza hasta el 88% molar, ya que, independientemente del control en la columna de destilación convencional, se pretende realizar un análisis exergoeconómico del sistema. Como puede observarse en la figura anterior, la carga térmica se incrementa considerablemente después del 84% molar. Y tanto el condensador como el re-hervidor consumen energías equivalentes para todos los casos. Es importante mencionar que la pureza del producto de destilado está relacionada directamente con la relación de reflujo, la cual se incrementa considerablemente al acercarse a la composición azeotrópica.

En la Figura 9 se muestra el comportamiento de los perfiles de composición del líquido de Etanol y el Agua para las purzas del 80 al 84% con el conjunto de parámetros del simulador, observándose en un desfaseamiento entre los mismos, así como se observa con las cargas térmicas.

En cuanto a los resultados de variar $\pm 2\%$ y $\pm 10\%$ la relación de reflujo y la carga térmica en el re-hervidor en estado estacionario, no se observaron diferencias significativas, por lo que se procedió a llevar a cabo el análisis del comportamiento de las variables en el estado dinámico.

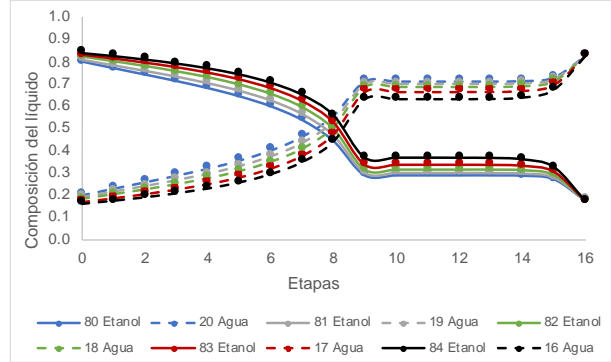


Figura 9.- Perfiles de composición del líquido para cinco casos de 80-84% molar con parámetros del simulador.

Una vez mostrado el análisis de las variables de interés como lo son las purzas y las cargas térmicas de la separación en estado estacionario, a continuación, se muestran los resultados del análisis realizado a las simulaciones dinámicas.

Para el caso de la figura 10, donde se presenta la composición de destilado (x_D), se observa que cuando se varía el reflujo (R) en $\pm 10\%$ el impacto en x_D es diferente: en -10% hay una variación de hasta -0.004 para x_D , mientras que para un 10% se tiene una variación de 0.003 para x_D . Para el caso de la figura 11, en donde se muestra la composición de fondos x_B , cuando se varía el reflujo (R), la variación es similar a la obtenida para el caso de x_D : en -10% hay una variación de casi -0.006 para x_B , mientras que para un 10% se tiene una variación de 0.005 para x_B .

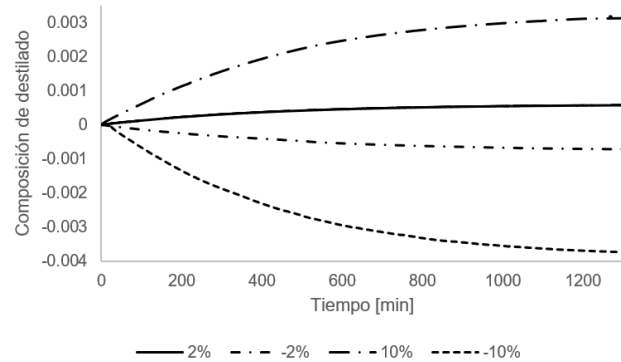


Figura 10.- Composición de destilado para 82% molar afectada por la relación de reflujo R .

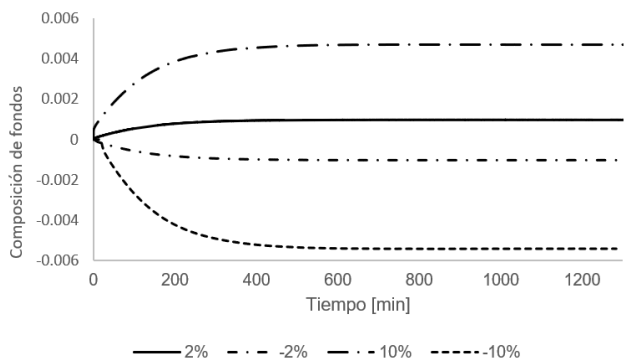


Figura 11.- Composición de fondos para 82% molar afectada por la relación de reflujo R.

Esto representa direccionalidad de bajo impacto o nivel, pues los cambios en la salida de cada variable no se ven afectados de manera proporcional por los cambios que provoca la entrada R de una manera notable. Este mismo análisis puede realizarse para las figuras 12 y 13 que presentan una composición de 84% molar.

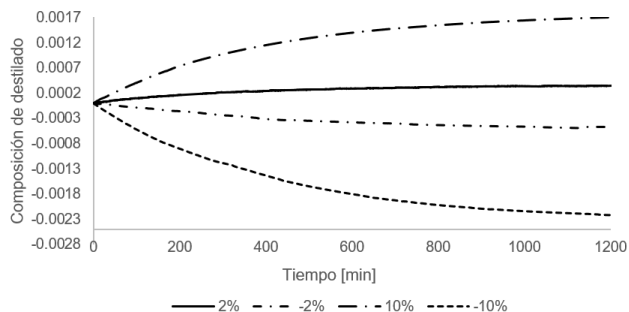


Figura 12.- Composición de destilado para 84% molar afectada por la relación de reflujo R.

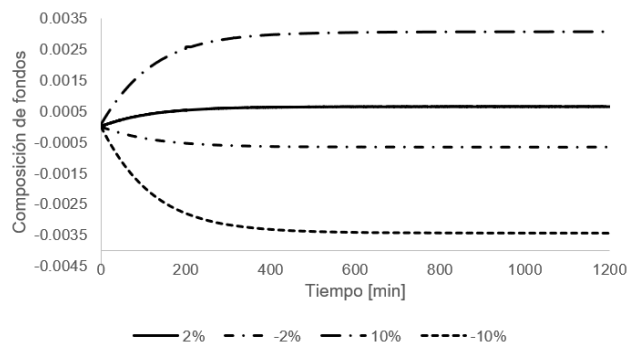


Figura 13.- Composición de destilado para 84% molar afectada por la relación de reflujo R.

En este mismo sentido, si se comparan las proporciones entre el caso 82% y 84% molar de las figuras 10 y 12, se observa que los cambios porcentuales en la composición de destilado x_D

afectan de manera diferente. Por ejemplo, en el caso 82% molar de la figura 10 se tiene una variación de x_D de cerca de 0.003 cuando el cambio de reflujo (R) es del 10%, mientras que en el caso 84% molar de la figura 12 se tiene una variación de cerca de 0.0015 para la misma variación de reflujo. Esto una vez más representa direccionalidad, pues los cambios en la salida de cada variable no se ven afectados de manera proporcional por los cambios que provoca la entrada R. Además, es un reflejo de que se trata de un sistema mal condicionado, pues ocurre de manera similar para la composición de fondos.

De igual manera, puede observarse que la no linealidad está presente al notar que la variación en el reflujo (R), del -10%, afecta de menor manera en la composición de destilado cuando se tienen el caso 84% molar respecto al caso 82% molar de las figuras 10 y 12. Similarmente se observa para las figura 11 y 13, cuando el cambio de 10% en R es menor en el caso 84% molar respecto al caso 82% molar.

Conclusiones

En este trabajo de investigación se llevó a cabo un análisis de las variables más relevantes en la separación de Etanol y Agua mediante una columna de destilación convencional mediante simulaciones en estado estacionario y en estado dinámico. Se observó que la purificación del Etanol cerca de la composición azeotrópica incrementa la energía de separación considerablemente. Asimismo, es importante resaltar que es necesario hacer un análisis de los resultados con los parámetros del modelo termodinámico empleado, ya que se observó que hay variabilidad en los valores de las cargas térmicas al emplear uno y otro conjunto de parámetros termodinámicos.

La conclusión más relevante de este trabajo radica en que la termodinámica del sistema domina claramente en el control de la columna cuando la pureza del etanol en la columna pre-concentradora se aproxima a la composición azeotrópica, lo que genera que las cargas térmicas tanto en el re-hervidor como en el condensador sean elevadas, aunque no haya diferencias entre ambos equipos.

Se demostró que las estrategias de control convencionales como la PID proporcionan una baja controlabilidad en la dinámica de columnas de destilación convencionales que requieren altas purzas y que dependen también de las propiedades termodinámicas como las condiciones en el punto

azeotrópico; por lo que se requieren de estrategias de control avanzado como por ejemplo el Model Predictive Control (MPC)

Se deben sintonizar los controladores de flujo de alimentación y presión con la finalidad de mejorar la estabilidad, la respuesta rápida y la capacidad de mantener las condiciones de operación. Por cual deben modificarse los valores de ganancia proporcional y tiempo integral del controlador mediante una metodología. El objetivo es minimizar los errores y las oscilaciones en el sistema, lo que mejorará la eficiencia de la operación y reducirá el riesgo de problemas operativos.

Referencias

- Abu-Eishah, S. I.; Luyben, W. L. (1985). Design and Control a Two-Column Azeotropic Distillation System. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, 24, 132-140
- Bisgaard, T., Huusom, J. K., & Abildskov, J. (2015). Modeling and analysis of conventional and heat-integrated distillation columns. *AIChE Journal*, 61(12), 4251-4263. <https://doi.org/10.1002/aic.14970>
- Broll, J.; Rix, A.; Gelbe, H. (1995). Nonlinear Model-Based Feedforward Control of Distillation Columns. *Chemical Engineering Technology*, 18, 178-182.
- Dimian, A. C., Bildea, C. S., & Kiss, A. A. (2014). Integrated design and simulation of chemical processes (2nd ed). Elsevier.
- Dimian, A. C.; Bildea, C. S.; Kiss, A. A. (2019). Applications in Design and Simulation of Sustainable Chemical Processes. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63876-2.00008-5>
- Folkrova, A. K.; Raeva, A. M. (2010). Bioethanol Dehydration: State of the Art. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. 44(4), 545-556. <https://doi.org/10.1134/S0040579510040342>
- Gil, I. D., Gómez, J. M., & Rodríguez, G. (2012). Control of an extractive distillation process to dehydrate ethanol using glycerol as entrainer. *Computers & Chemical Engineering*, 39, 129-142. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2012.01.006>
- Giri, P. A., & Mahajan, Y. S. (2023). Optimal sequencing of conventional distillation column train for multicomponent separation system by evolutionary algorithm. *Chemical Product and Process Modeling*, 18(3), 423-434. <https://doi.org/10.1515/cppm-2022-0027>
- Gmehling, J., & Onken, U. (2002). Vapor liquid equilibrium data collection. 1: Aqueous-organic systems: a = (Suppl. 1). (2. ed. with minor changes and corr). DECHEMA.
- Hägglom, K. E., & Böling, J. M. (1998). Multimodel identification for control of an ill-conditioned distillation column. *Journal of Process Control*, 8(3), 209-218. [https://doi.org/10.1016/S0959-1524\(97\)00040-1](https://doi.org/10.1016/S0959-1524(97)00040-1)
- Henley, E. J., & Seader, J. D. (2018). Operaciones de separación por etapas de equilibrio en ingeniería química (Reimp. digital.). Reverté.
- Herbert, T. (2000). Practical distillation control. *IEE Seminar on Practical Experiences with Predictive Control*, 2000, 2-2. <https://doi.org/10.1049/ic:20000114>
- Kaminski, W.; Marszalek, J.; Ciolkowska, A. (2008). Renewable energy source. Dehydrated ethanol. *Chemical Engineering Journal*. 135, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.03.017>
- Kenig, E. Y. & Blagov, S. (2014). Modeling of Distillation Process. En A. Górak & E. Sørensen (ed), *Distillation: Fundamentals and principles* (pp. 384-394) Elsevier Science.
- Kim, Y. (2016). Energy efficiency improvement in a modified ethanol process from acetic acid. *Entropy*, 18(12), 422. <https://doi.org/10.3390/e18120422>
- Kiss, A. A., & Suszwalak, D. J.-. P. C. (2012a). Enhanced bioethanol dehydration by extractive and azeotropic distillation in dividing-wall columns. *Separation and Purification Technology*, (86)4, 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.10.022>
- Kiss, A. A., & Ignat, R. M. (2012b). Innovative single step bioethanol dehydration in an extractive dividing-wall column. *Separation and Purification Technology*, 98, 290-297. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.06.029>
- Kiss, A. A., & Ignat, R. M. (2013). Optimal economic design of an extractive distillation process for

- bioethanol dehydration. *Energy Technology*, 1(2-3), 166-170.
<https://doi.org/10.1002/ente.201200053>
- Kiva, V. N., & Krolkowski, L. J. (2015). Feasibility of separation for distillation of azeotropic ternary mixtures: A survey and analysis. *Chemical Engineering Research and Design*, 95, 195-210.
<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.10.023>
- Lee, E. J., & Kim, Y. H. (2018). Energy saving in acetic acid process using an azeotropic distillation column with a side stripper. *Chemical Engineering Communications*, 205(10), 1311-1322.
<https://doi.org/10.1080/00986445.2018.1446426>
- Lei, Z. (2017). Azeotropic distillation. En Reference Module in Chemistry, *Molecular Sciences and Chemical Engineering* (p. B9780124095472060182). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.06018-2>
- Li, Y., Li, W., Zhong, L., & Xu, C. (2017). Entrainer-assisted pressure-swing distillation for separating the minimum-boiling azeotrope toluene/pyridine: Design and control. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 56(41), 11894-11902.
<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b02961>
- Liu, X.; Wang, C., Cong, L. (2011). Adaptive Robust Generic Model Control of High-Purity Internal Thermally Coupled Distillation Column. *Chemical Engineering Technology*, 1, 111-118.
<https://doi.org/10.1002/ceat.201000343>
- Luyben, W. L.; Chien, I. L. (2010). Design and Control of Distillation Systems for Separating Azeotropes. Wiley.
- Ma, Y., Cui, P., Wang, Y., Zhu, Z., Wang, Y., & Gao, J. (2019). A review of extractive distillation from an azeotropic phenomenon for dynamic control. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 27(7), 1510-1522.
<https://doi.org/10.1016/j.cjche.2018.08.015>
- Mahdi, T., Ahmad, A., Nasef, M. M., & Ripin, A. (2015). State-of-the-art technologies for separation of azeotropic mixtures. *Separation & Purification Reviews*, 44(4), 308-330.
<https://doi.org/10.1080/15422119.2014.963607>
- Ng, Q. H., Sharma, S., & Rangaiah, G. P. (2017). Design and analysis of an ethyl benzene production process using conventional distillation columns and dividing-wall column for multiple objectives. *Chemical Engineering Research and Design*, 118, 142-157.
<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2016.10.046>
- Ravi Srinivas, G., Arkun, Y., Chien, I.-L., & Ogunnaike, B. A. (1995). Nonlinear identification and control of a high-purity distillation column: a case study. *Journal of Process Control*, 5(3), 149-162.
[https://doi.org/10.1016/0959-1524\(95\)97302-9](https://doi.org/10.1016/0959-1524(95)97302-9)
- Sågfors, M. F.; Waller, K. V. (1998). Multivariable control of ill-conditioned distillation columns utilizing process knowledge. *Journal of Process Control*, 8(3), 197-208.
[https://doi.org/10.1016/S0959-1524\(97\)00037-1](https://doi.org/10.1016/S0959-1524(97)00037-1)
- Shen, W. F., Benyounes, H., & Song, J. (2016). A review of ternary azeotropic mixtures advanced separation strategies. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*, 50(1), 28-40.
<https://doi.org/10.1134/S0040579516010140>
- Srygley, J. M., & Holland, C. D. (1965). Optimum design of conventional and complex distillation columns. *AIChE Journal*, 11(4), 695-701.
<https://doi.org/10.1002/aic.690110424>
- Skogestad, S. (1992). Dynamics and control of distillation columns—A critical survey. IFAC Proceedings Volumes, 25(5), 11-35.
[https://doi.org/10.1016/S1474-6670\(17\)50966-0](https://doi.org/10.1016/S1474-6670(17)50966-0)
- Skogestad, S.; Morari, M.; Doyle, J. C. (1988). Robust Control Ill-Conditioned Plants: High Purity Distillation. *IEEE Transactions on Automatic Control*, (33)33, 1092-1105.
<https://doi.org/10.1109/9.14431>
- Taqvi, S. A., Dendana Tufa, L., Zabiri, H., Mahadzir, S., Maulud, A. S., & Uddin, F. (2017). Rigorous dynamic modelling and identification of distillation column using Aspen Plus. 2017 IEEE 8th Control and System Graduate Research Colloquium (ICSGRC), 262-267.
<https://doi.org/10.1109/ICSGRC.2017.8070607>
- Taqvi, S. A., Tufa, L. D., & Muhadzir, S. (2016). Optimization and dynamics of distillation column using aspen plus®. *Procedia Engineering*, 148, 978-984.

<https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.06.484>

- Tavan, Y., & Hosseini, S. H. (2013). A novel integrated process to break the ethanol/water azeotrope using reactive distillation – Part I: Parametric study. *Separation and Purification Technology*, 118, 455-462. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.07.036>
- Uddin, F.; Tufa, L. D.; Maulud, A. S.; Taqvi, S. A. (2018). System Behavior and Predictive Controller Performance near Azeotropic Region. *Chemical Engineering & Technology*, (41)4, 806-818. <https://doi.org/10.1002/ceat.201700282>
- Xu, L., Liu, Y., Bai, W., Tan, Z., & Xue, W. (2022). Design and control of energy-saving double side-stream extractive distillation for the benzene/isopropanol/water separation. *Energy*, 239, 121952. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.121952>
- Yi, C.-C., & Chien, I.-L. (2019). Control study to enhance the controllability of heterogeneous extractive distillation: Cyclohexane/cyclohexene separation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 58(8), 3211-3224. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b00341>
- Zhu, J., Hao, L., Jiang, J., & Wei, H. (2020). Control of a process with no reflux rate in heterogeneous extractive distillation (Hed). *Separation and Purification Technology*, 247, 116973. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116973>
- Zhu, F.; Huang, K.; Wang, S.; Shan, L.; Zhu, (2009). Towards further internal heat integration in design of reactive distillation columns—Part IV: Application to a high-purity ethylene glycol reactive distillation column. *Chemical Engineering Science*, 64 (15), 3498-3509. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2009.04.031>

ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS FÍSICOQUÍMICOS QUE SE PRESENTAN EN UNA INFUSIÓN AL VARIAR LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

ANALYSIS OF THE PHYSICOCHEMICAL CHANGES THAT OCCUR IN AN INFUSION WHEN VARYING STORAGE CONDITIONS

Monica Rivera Rivera*, Marco Antonio Godinez Ruíz, Rebeca Gloria Tejeda, Martha Patricia Valencia Pérez, Betsabe Hernández Santos

Tenológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Tuxtepec, Ingeniería Bioquímica, Tuxtepec, Oaxaca, México. E-Mail: monica_ri_ri@hotmail.com

Received November 02, 2023; Revised: December 15, 2023; Accepted December 19, 2023

Resumen

El propósito de este trabajo fue evaluar los cambios fisicoquímicos de un té a base de nopal y zacate limón en una proporción 70:30 respectivamente en diferentes periodos de tiempo (0, 30,60 y 90 días) utilizando dos tipos de empaque celofán y polietileno. Los valores obtenidos en el análisis químico proximal mostraron que existe una diferencia significativa en el material de empaque utilizado durante el almacenamiento del té. Los valores de humedad en los dos empaques evaluados aumentaron ligeramente al final de la evaluación sin poner en riesgo la conservación del té. En relación con el análisis de antioxidantes realizado en el empaque de celofán, los valores obtenidos de polifenoles totales (0.245 ± 0.11) y % DDPH (51.897 ± 0.133) fueron más altos, a diferencia de los flavonoides (0.693 ± 0.44) cuyos valores fueron mayores para el empaque de polietileno. El análisis aromático demuestra que el empaque de celofán tiene mayor concentración de β -Citral y α -Citral principios activos que se encuentran principalmente en el zacate limón. Otros compuestos presentes en ambas muestras en diferentes concentraciones fueron el ácido n-hexadecanoico, ácido (z,z) 9,12-octadecadienoico y ácido (z,z,z) 9, 12, 15-octadecatrienoico y el geraniol, este último compuesto en el periodo de 90 días ya no es detectado.

Palabras clave: Nopal y Zacate Limón, Químico Proximal Antioxidantes, Perfil Aromático.

Abstract

The purpose of this work was to evaluate the physicochemical changes of a nopal and lemon grass-based tea in a 70:30 ratio, respectively, in different periods of time (0, 30, 60, and 90 days) using two types of cellophane and polyethylene packaging. The values obtained in the proximal chemical analysis showed that there is a significant difference in the packaging material used during the storage of the tea. The moisture values in the two evaluated packages increased slightly at the end of the evaluation without jeopardizing the conservation of the tea. In relation to the antioxidant analysis carried out on the cellophane packaging, the values obtained for total polyphenols (0.245 ± 0.11) and % DDPH (51.897 ± 0.133) were higher, unlike flavonoids (0.693 ± 0.44) whose values were higher for polyethylene packaging. The aromatic analysis shows that the cellophane packaging has a higher concentration of β -Citral and α -Citral active principles that are mainly found in lemongrass. Other compounds present in both samples in different concentrations were n-hexadecanoic acid, (z,z) 9,12-octadecadienoic acid and (z,z,z) 9, 12, 15-octadecatrienoic acid and geraniol, the latter compound in the period of 90 days it is no longer detected.

Keywords: Nopal and Lemongrass, Chemical Proximal Antioxidants, Aromatic Prof

Introducción

México es uno de los países con mayor número de casos de Diabetes Mellitus, se prevé que para el 2030 ocupe el séptimo lugar en el mundo con aproximadamente 12 millones de personas diabéticas. (Escobedo, 2011). La diabetes mellitus es una enfermedad crónico-degenerativa representando para el sector salud un reto en la prevención y el control. Sin embargo, se ha visto que el sedentarismo, obesidad, hipertensión arterial, la alimentación deficiente, el estrés, tabaquismo, consumo de alcohol y la carga genética son determinantes en el desarrollo de esta enfermedad. (Córdova 2009)

A lo largo del tiempo el ser humano ha utilizado la herbolaria como una estrategia terapéutica con el objeto de tratar diferentes enfermedades (Carrillo, 2010). En México, hay una variedad de plantas que ayudan a controlar los niveles de glucosa en la sangre, el nopal es uno de ellos, el cual por su propiedad hipoglucemiante ha resultado ser útil en el tratamiento complementario de la diabetes, además de tener un precio accesible (Torres, 2015). De ahí la importancia de salvaguardar la riqueza biológica que existe en México, con el propósito de potencializar los principios activos que contienen las plantas y benefician al ser humano en sus tratamientos médicos (Lara, et al, 2019).

El Nopal o Cactus es originaria de México, pertenece al género *Opuntia* de la familia de las Cactaceae, se puede encontrar a lo largo de todo el continente americano incluso en Europa, Asia y África esto debido a la adaptación agroclimática que posee. Morfológicamente es un arbusto con tallos suculentos y articulados llamados cladodios (Quishpi, 2021). El género *Opuntia* agrupa aproximadamente a 300 especies diferentes de las cuales 100 se encuentran en México siendo 62 son endémicas. El Nopal posee propiedades nutritivas y nutraceuticas favoreciendo el control de colesterol, disminuye los niveles de glucosa, estimula la circulación y mejora el proceso digestivo. (Celis, 2009). En 2022 la producción de nopal en México fue 872.3 miles de toneladas. (SIAP 2022).

El zacate de limón (*Cymbopogon citratus*), es una planta muy popular en México por su sabor cítrico y aroma, pertenece a la familia de las Poaceae. Contiene aceites esenciales en tallos y hojas, el de mayor importancia es el citral. Actualmente se produce en todo el mundo, se puede encontrar en

traspacios, malezas o parcelas, posee propiedades medicinales, hidratantes y diuréticas. Su capacidad antioxidante se debe a la cantidad de polifenoles que presenta (Laclette, 2018)

Los seres humanos aumentan la generación de sustancias oxidativas cuando se tienen problemas patológicos o procesos que alteran el metabolismo, para evitar la oxidación de las células se ha visto que existen moléculas antioxidantes naturales como las plantas o sintéticos que favorecen los tratamientos terapéuticos. Conocer la capacidad antioxidante es de gran utilidad para la industria y para la sociedad esto debido a los beneficios que brindan a la salud. (Benítez, 2010)

Los alimentos como los tés o cafés durante su almacenamiento pueden perder el aroma y el sabor si los empaques seleccionados no son los adecuados, alterando su vida útil. Por lo que los empaques deben de cumplir con estándares de calidad, precio y seguridad. (Rodríguez, 2014). El celofán es un polímero que se obtiene de la celulosa, es resistente al agua y los olores. Tiene un aspecto brillante y claro es ideal para el embalaje de artículos pequeños. En cambio, el polietileno es un polímero sintético es muy flexible, se pliega fácilmente y puede ser sellado con calor. (Da luz, 2015).

El interés de este trabajo fue analizar los cambios fisicoquímicos que presenta un té a base de nopal (*Opuntia ficus indica*) y zacate limón *Cymbopogon citratus*) al variar las condiciones de almacenamiento.

Sección experimental

Obtención del producto a evaluar

Se selecciono el cladodio del nopal con un grado de maduración medio y las hojas del zacate limón para mejorar el aroma y sabor del producto. Se eliminaron las impurezas presentes y se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) equivalente a 15 ppm de cloro. El nopal se introdujo en un secador por convección marca Yamato a 60°C por 2 horas, para evitar perdida de líquido durante su segmentado. Posteriormente los vegetales seleccionados se cortaron con un juego de cuchillas con una separación de 0.7cm. Los vegetales picados se introdujeron por separado a un secador por convección a 60°C hasta que la

humedad fue del 8%. Se combinaron los productos secos de acuerdo con una proporción 70:30 (Nopazacate limón) respectivamente. Posteriormente se envasaron porciones de 5 g de muestra en bolsas impermeables. Una vez embolsada la muestra se procedió a empacarlas en bolsas de dos materiales diferentes celofán (BC) y polietileno (BP) impermeables a la humedad.

Determinación del químico proximal

La composición química proximal se determinó por triplicado de acuerdo con los métodos de la AOAC (2005): humedad (925.10), cenizas (923.03) y proteínas (920.87). El contenido de fibra cruda se determinó por digestión ácido-alcalina (925.08).

Determinación de la capacidad antioxidante.

1. Preparación del extracto.

La muestra seca (1.0 g) se extrajo con 25 mL de etanol al 80% a 30 °C durante 4 h. La mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min. Después de la centrifugación, se recogió el sobrenadante para los contenidos fenólicos totales (Norajit et al, 2011)

2. Determinación del contenido de polifenoles totales.

El contenido de polifenoles totales se determinó de acuerdo con el método de Norajit et al. 2011. En un tubo de ensayo de 10 mL, se agregaron y se mezclaron 2 mL de Na₂CO₃ al 2%, 0.1 mL de extracto diluido con etanol al 80% y 0.1 mL de reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu con folina al 50% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US.). Después de exactamente 30 minutos, se leyó la absorbancia a 750 nm y se calculó el contenido fenólico a partir de una curva de calibración, que se obtuvo utilizando ácido gálico como estándar (20-200 µg/mL).

3. Determinación de flavonoides totales.

Se realizó una curva con catequina a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm. Se utilizaron 0.25 ml (250 µL) de muestra más 75 µL de NaNO₂ al 5% más 150 µL de AlCl₃ al 10% más 500 µL de NaOH 1M, el volumen se ajustó a 2.5 mL (1525 µL) se agitó y se dejó reposar 5 min en oscuridad. Se midió la absorbancia a 510 nm. El blanco lleva todos los reactivos con excepción de la catequina, en su lugar se ocupó agua destilada, 250 µL.

4. Determinación de la actividad antioxidante DPPH.

La actividad antioxidante, se determinó de acuerdo con lo descrito por Hwang et al. 2014. Se utilizó el extracto de etanol al 80% de la muestra. Se mezclaron alícuotas de 0.8 mL de solución metanólica de DPPH (Sigma-Aldrich) de 0.2 mM con 0.2 mL del extracto. La mezcla se agitó vigorosamente y luego se dejó reposar durante 30 minutos con poca luz. La absorbancia se midió a 520 nm. El porcentaje de inhibición de la actividad se calculó con:

$$A0 - A1 / A0 \times 100$$

Donde: A0 es la absorbancia sin la muestra y A1 es la absorbancia con la muestra.

Determinación del perfil aromático

1.Preparación de estándar.

Se preparó una solución madre de citral a una concentración de 1000 ppm con una mezcla de agua-metanol (75:25, grado HPLC) (especificaciones del citral: 95%, marca Sigma-Aldrich).

Se colocó 1 mL de la solución en un vial y se inyectó en el HPLC-DAD

2.Preparación de la muestra.

Se pesó 1.5 g de polvo de té, se le añadió 20 mL de la mezcla MeOH-agua acidificada H₃PO₄10⁻¹ M. Se realizó el análisis por el equipo HPLC-DAD, los extractos fueron filtrados en un filtro # 4 y un filtro pirinola de 0.45 µm y puestos en un vial de 1.5 mL. Las soluciones fueron sometidas a efectos de sonicación en un baño ultrasónico 37 KHz /10 min.

3.Condiciones cromatográficas.

Se utilizó un equipo HPLC marca Agilent Technologies modelo 1260 infinity II acoplado a un Detector de Arreglo de Diodos (DAD). Una columna Pursuit XRS-C18 marca Agilent (4.6 mm de diámetro, 150 mm de longitud y 3 µm de tamaño de partícula). La fase móvil fue una mezcla de dos solventes: agua (A) (40%) y metanol (B) (60%) con un flujo de 1 mL/min en condiciones isocráticas. La temperatura de la columna fue de 25 °C y el volumen de inyección de 10 µL. La detección del citral se efectuó a 200 nm. El tiempo de corrida fue de 20 min incluyendo el tiempo estabilización de la columna. (Thanh et al, 2020).

Resultados

Tabla 1. Resultados del químico proximal al t=0

Prueba /Muestra	BC	BP
Humedad %	7.55±0.04 ^a	8.74±0.85 ^a
Cenizas %	11.25±0.05 ^a	11.49±0.18 ^a
Proteínas %	8.12±1.08 ^a	7.91±0.06 ^a
Fibra Cruda%	9.64±0.00 ^a	10.15±1.33 ^a

Nota: letras diferentes en columna indican diferencias estadísticamente significativa (p<0.05)

Tabla 2. Resultados del químico proximal al t=90 días

Prueba /Muestra	BC	BP
Humedad %	9.82±0.08 ^a	10.96±0.01 ^b
Cenizas %	9.68±0.08 ^a	10.09±0.08 ^b
Proteínas %	7.28±0.28 ^a	6.40±0.28 ^b
Fibra Cruda %	7.55±0.48 ^a	8.62±0.28 ^b

Nota: letras diferentes en columna indican diferencias estadísticamente significativa (p<0.05)

En la tabla 1 y 2 se observa que los valores de humedad obtenidos tanto para el empaque de celofán como de polietileno se incrementaron ligeramente a lo largo de la evaluación, dicho incremento no afecta la calidad del té.

Los resultados del análisis químico proximal específicamente para la infusión del té de nopal y zacate limón no se encuentra en la bibliografía sin embargo los resultados obtenidos de proteína en el empaque de celofán y polietileno fueron de 7.28±0.28 y 6.40±0.28 respectivamente y del contenido de cenizas fueron de 9.68±0.08 para celofán y 10.09±0.08 para polietileno al término de la evaluación, siendo muy semejantes a los reportados por González et al, 2020, el cual realizó un estudio sobre el químico proximal en el nopal de invernadero indicando valores de 9.09% de proteínas y 9.40% de cenizas. Otro estudio realizado por Guzmán et al, 2014, trabajo con nopal amarillo indicando que entre más joven es el nopal el contenido de proteínas y cenizas se va incrementando y el contenido de fibra aumenta conforme va madurando el nopal debido a que se forma una red de celulosa bastante robusta en su interior. Las diferencias en la composición química encontrados pueden relacionarse a factores como el tipo de suelo donde fue cultivada la planta, el clima, la humedad, la edad de la planta, la geografía así, como el tipo de empaque.

Tabla 3. Valores obtenidos de Polifenoles totales (mgEAG/g) en los diferentes periodos de tiempo

Polifenoles Totales	BC	BP
T=0	0.303±0.11 ^a	0.245±0.11 ^b
T= 90 días	0.206±0.38 ^a	0.162±0.38 ^b

Nota: letras diferentes en columna indican diferencias estadísticamente significativa (p<0.05)

Tabla 4. Valores obtenidos de Flavonoides (mgEAG/g) en los diferentes periodos de tiempo

Flavonoides	BC	BP
T=0	0.672±0.252 ^a	0.747±0.0252 ^b
T= 90 días	0.627±0.44 ^a	0.693±0.44 ^b

Nota: letras diferentes en columna indican diferencias estadísticamente significativa (p<0.05)

Tabla 5. Valores obtenidos de % DPPH del té de nopal y zacate limón en los diferentes periodos de tiempo

% DDPH	BC	BP
T=0	55.123±0.96 ^a	48.770±0.19 ^b
T= 90 días	51.897±0.133 ^a	39.753±0.134 ^b

Nota: letras diferentes en columna indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05)

Los resultados obtenidos demuestran la presencia de antioxidantes en el té, esto debido a la presencia de polifenoles o compuestos fenólicos principalmente. Tanto los polifenoles como los flavonoides tienen la capacidad de atrapar electrones y una acción quelante de metales. (Martin, 2018). El contenido de polifenoles totales para la bolsa de celofán y polietileno a los 90 días fueron 0.206±0.38 mgEAG/g y 0.162±0.38 mgEAG/g respectivamente, observándose que las concentraciones obtenidas son más bajas en el empaque polietileno a diferencia de los resultados obtenidos con respecto a la concentración de flavonoides donde se observa que en el empaque de celofán la concentración fue menor (0.627±0.44 mgEAG/g) al final de la prueba, con respecto al empaque de polietileno cuya concentración fue de 0.693±0.44 mgEAG/g. Manzanares, 2023 evaluó la capacidad antioxidante en el nopal morado en dos etapas de coloración,

obteniendo valores más altos en la actividad antioxidante como en el contenido de fenoles y flavonoides totales en las muestras de color morado, los valores fenoles y flavonoides totales obtenidos en las muestras fueron de 2.31 mg EAG/gps y 3.06 mg EQ/gps, respectivamente. Considerando las propiedades bioactivas (antioxidantes) del nopal Ponce en 2023 menciona que se han reportado concentraciones equivalentes de ácido gálico en un rango de 1040-1638 mg/ kg en muestra fresca, concentraciones de compuestos polifenólicos equivalentes a 2 g/kg en extractos hidroalcohólicos y concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides de 2.48 g equivalentes de ácido gálico/100 g de materia seca y 1.06 g de quercetina equivalente /100 g de materia seca respectivamente. La variación en los resultados pudiera deberse principalmente a las características de la materia prima así, como el método utilizado para determinar la actividad oxidativa.

El método de DPPH utilizado determinó la actividad de atrapamiento de radicales libres mediante la donación de hidrogeno por parte de un agente oxidante, los resultados demostraron que el % de inhibición de DPPH a los 90 días del té fue 51.897 ± 0.133 para la bolsa de celofán y 39.753 ± 0.134 para el empaque de polietileno mostrando que la concentración es mayor en el empaque de celofán. Neveros en 2023 determinó que los métodos de tratamiento térmico incrementan la actividad antioxidante ya que existe una disminución en el número de moléculas que interactúan con los grupos hidroxilo. Por otro lado, Ordoñez en 2018 estableció la capacidad antioxidante de infusiones herbarias y tés frente al radical 2,2-difenil-picrilhidrazil (DPPH) para el zacate limón (*Cymbopogon citratus*) comercial fue de 0.03 ± 0.00 mMtrolox/L, en fresco 0.06 ± 0.01 mMtrolox/L y en seco 0.03 ± 0.01 mMtrolox/L y la concentración de polifenoles totales siendo para el té comercial de 262.38 ± 0.98 mg EAG/L, en fresco 46.92 ± 0.29 mg EAG/L y en seco 86.84 ± 0.40 mg EAG/L. Los valores anteriores son indicativos que los ingredientes que conforman la mezcla de té a base de nopal y zacate limón tienen propiedades antioxidantes.

Tabla 6. Resultados del análisis aromático por GC-MS del té de nopal y zacate limón al inicio de la prueba. (t=0)

Muestras empaçadas en bolsas de polietileno		
Región 1%	β -Citral	17.04
	Geraniol	5.75
	α -Citral	3.67
Región 2%	n-Hexadecanoic acid	10.66
	9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)-	19.34
	9,12,15-octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)-	20.42

En la tabla 6, se pueden observar las concentraciones y compuestos presentes en la muestra al inicio de la prueba. En la Región 1 se tiene 17.04% de β -Citral, 3.37% de geraniol y 26.54% de α -Citral, en la Región 2, se tiene 10.66% de ácido n-hexadecanoico, 12.51% de ácido (z,z) 9,12-octadecadienoico y 20.60% de ácido (z,z,z) 9, 12, 15-octadecatrienoico.

Aguilar (2023) menciona que el aceite esencial del zacate limón contiene compuestos como monoterpenos, carbohidratos, cetonas, ésteres y aldehídos. Su composición química lo conforman 14 componentes entre los que se encuentran 40.80 % α -Citral (Geraniol), 32.00 % β - Citral (Neral), 4.1% Nerol, 3.04% Geraniol, 2.10% Citronelal, 1.23% Terpenoleno, 0.83% Acetato de geraniol, 0.72% Mirceno 0.45% Terpeneol, 0.20% Metilheptona, 0.10-0.40% Borneol, 0.10% Acetato de linalilo, 0.07% α -Pineno, 0.04 β -Pineno, rastros de Limoneno, rastros de Linalool. Se puede observar que al inicio de la prueba se detectaron 3 de los componentes que conforman la composición química del aceite de zacate limón el α -Citral, β -Citral y el geraniol, los cuales contribuyen a darle el aroma parecido al limón al té.

Tabla 7. Resultados del análisis aromático por GC_MS del té de nopal y zacate limón al final de la prueba (t = 90 días)

Muestra empacada en bolsa de celofán		
Región 1%	β-Citral	2.01
	α-Citral	3.33
Región 2%	n-Hexadecanoic acid	15.26
	9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)-	9.36
	9,12,15-octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)-	24.97

Tabla 8. Resultados del análisis aromático por GC_MS del té de nopal y zacate limón al final de la prueba (t = 90 días)

Muestra empacada en bolsa de Polietileno		
Región 1%	β-Citral	0.77
	α-Citral	1.24
Región 2%	n-Hexadecanoic acid	19.30
	9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)-	13.52
	9,12,15-octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)-	31.06

En la tabla 7 y 8 se tienen los datos obtenidos después del almacenamiento para el empaque con bolsa de celofán y polietileno respectivamente, donde se puede apreciar que en la Región 1, no hay presencia del compuesto de geraniol para ambos tipos de empaques, el cual se pudo haber volatilizado por varias razones por el tipo de empaque utilizado, el manejo de la muestra o por el tiempo de almacenamiento.

Osorio et al. 2011 determinó los compuestos responsables del aroma en el nopal fresco utilizando como método de conservación atmósferas modificadas siendo los aldehídos (el hexanal, 2 hexanol y 2 heptenal) los responsables de las notas herbáceas en productos vegetales. El único compuesto que desapareció fue 2 heptenal después de 20 días de almacenamiento.

En el empaque de celofán los resultados fueron 2.01% de β-Citral, 3.33% de α-Citral, 15.26% de ácido n-hexadecanoico, 9.36% de ácido (z,z) 9,12-octadecadienoico y 24.97% de ácido (z,z,z) 9, 12, 15-octadecatrienoico. Para el empaque de polietileno fueron 0.77% de β-Citral, 1.24% de α-Citral, 19.30% ácido n-hexadecanoico, 13.52% ácido (z,z) 9,12-octadecadienoico y 31.06% ácido (z,z,z) 9, 12, 15-octadecatrienoico. Demostrando así que el empaque de celofán tiene mayor concentración en cuanto a los compuestos de β-Citral y α-Citral principios activos que se encuentran principalmente en el zacate limón. Bermudez, (2019) realizó un estudio sobre la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de Psidium guajava y Cymbopogon citratus donde menciona que el α y β citral corresponden al 80,28% de los compuestos del aceite esencial de zacate de limón razón por la cual en el análisis aromático realizado se pudieron detectar dichos compuestos.

Por otra parte, se observa que en el empaque de polietileno las concentraciones de los compuestos presentes en la región 2 como el ácido n-hexadecanoico, ácido (z,z) 9,12-octadecadienoico y ácido (z,z,z) 9, 12, 15-octadecatrienoico son mayores con respecto al empaque de celofán.

Conclusiones

El análisis de composición química de la infusión a base de nopal y zacate limón reveló que existe una diferencia significativa en el material de empaque utilizado (celofán y polietileno) durante el almacenamiento del té. Los valores de humedad en los dos empaques evaluados aumentaron ligeramente al finalizar la evaluación sin poner en riesgo la conservación del té.

Al finalizar el periodo de almacenamiento establecido, las concentraciones de polifenoles totales y el % de DDPH fueron más altas en las muestras empaquetadas en bolsas de celofán a diferencia de los flavonoides cuya concentración fue mayor para la muestra empaquetada en bolsa de polietileno demostrando que el té posee antioxidantes.

El análisis aromático demostró que el empaque de celofán tiene mayor concentración de β-Citral y α-Citral principales componentes del aceite esencial del zacate limón.

El té a base de nopal y zacate limón muestra que el almacenamiento por 90 días conserva el aroma y las propiedades antioxidantes y químicas en ambos empaques.

Referencias

- Aguilar Tello J. D. y Torres Pérez L. G. 2023. Efecto del metodo de secado en las características fisicoquímicas, rendimiento y composición volátil del aceite esencial de hierbaluisa (*Cymbopogon citratus*). Universidad Nacional del Santa. Facultad de Ingeniería. Nuevo Chimbote, Perú.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists.
- Benítez Estrada A, Villanueva Sánchez J, et al. (2010). Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fitoquimioluminiscencia: correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP). Vol 23 pp.1-9.
- Aguilar Tello J. D. y Torres Pérez L. G. 2023. Efecto del metodo de secado en las características fisicoquímicas, rendimiento y composición volátil del aceite esencial de hierbaluisa (*Cymbopogon citratus*)
- Bermúdez Vásquez, M. J., Granados Chinchilla, F., & Molina, A. (2019). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Psidium guajava* y *Cymbopogon citratus*. *Agronomía Mesoamericana*, 147-163.
- Córdova Villalobos cardiovascular J.A. et al (2009). Plan de Prevención Clínica de las enfermedades crónicas: sobrepeso, riesgo diabetes mellitus 2007-2012 y sistemas indicadores de diabetes en México. *Revista Mexicana de Cardiología*. Vol.20. No. pp.42-45.
- Carrillo Esper R, Lara Caldera B., Ruiz Morales J. M. (2010). Hierbas, medicina herbolaria y su impacto en la práctica clínica. *Revista. Investigación Med Sur Mex*; Vol.17. No. 3. pp. 124-130.
- Celis Fabian, E. F. (2009). Potencial nutraceutico de cladodios de nopal (*Opuntia spp.*). Tesis de Posgrado. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- Da Luz Castro J.(2015). Análisis de los requerimientos y características de materiales polimericos de empaque en el sector de la industria de alimentos en Costa Rica. Tesis. Universidad de Costa Rica.
- Gonzalez Rodriguez F., et al. (2020). Determinación del valor bromatológico y contenido de cladiodo de mucilago en el nopal (*Opuntia spp.*) de cerro y de invernadero del estado de Michoacán. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Vol.5. pp. 184-188.
- Guzmán Loayza D. & Chávez J. (2007). Estudio bromatológico del cladodio del nopal (*Opuntia ficus-indica*) para el consumo humano. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. Vol.73. No.1. pp. 41-45.
- Hwang R. y col. (2014). Changes in ginsenoside compositions and antioxidant activities of hydroponic-cultured ginseng roots and leaves with heating temperature. *Journal of ginseng research*, Vol.38 No. 3, pp.180-186.
- Laclette H.W (2018). Zacate limon, planta Antigua con grandes beneficios para la salud. México
- Lara E.Fernández J.M, Zepeda del Valle, et al. (2019). Etnomedicina de los altos de Chiapas, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*. Vol 18. No.1 pp.42-57.
- Manzanarez-Tenorio, L. E., Ruiz-Cruz, S., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Márquez-Ríos, E., Del Toro-Sánchez, C. L., & Suárez-Jiménez, G. M. (2022). Caracterización fisicoquímica, actividad antioxidante y contenido de fenoles y flavonoides totales de nopal morado (*Opuntia gosseliniana*) en dos etapas de coloración. *Biotecnia*. Vol.24. No.3. pp.101-106.
- Martin G.D.A. 2018. Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. Vol.9. No. 1.
- Neveros Alaniz A. (2023). Comparación de la aportación antioxidante del nopal *Opuntia ficus indica* en fresco vs deshidratado

cultivado en Tepoztlán, Morelos principal productor del país. Tesis. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería.

Norajit B. J. Gu & Ryu G. H. (2011). Effects of the addition of hemp powder on the physicochemical properties and energy bar qualities of extruded rice. *Food chemistry*, Vol.129. No. 4, pp.1919-1925.

Ordoñez Gómez E.S., Villanueva T. J y Reátegui Díaz D. (2018). Actividad antioxidante y polifenoles de infusiones herbarias fresca, seca y comerciales. *Investigación y Amazonía*, Tingo María. Perú. Vol. 8 No. 5. pp.26-35.

Osorio Cordoba J. et al. 2011. Volátiles responsables del aroma identificados en nopal verdura variedad Milpa Alta. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

Patiño, N. M., De León Rodríguez J., & Figueroa Hernández J. L. (2005). *Herbolaria*. Revista de la Facultad de Medicina UNAM, Vol.48. No.6, pp.248-250.

Ponce Luna A., Pérez Flores J. G. et al. 2023. Potencial del Nopal para su incursión en la industria de la confitería. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*. Vol 0.No.0.pp1-6.

Quishpi Guachalá, J. F. (2021). Utilización del nopal en la industria alimentaria para la elaboración de alimentos funcionales. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Riobamba.

Rodríguez Saucedo R., Cong Hermida M. D. L. C., Martínez Ruiz R., Ramírez Valverde B., Piña-Ruiz H. H., Rojo Martínez G. E., & Vaquera-Huerta H. (2014). Envases inteligentes para la conservación de alimentos. *Ra Ximhai*, 10(6), 151-173.

SIAP Servicio de información agroalimentaria y pesquera, Gobierno de México. 2022.

Thanh Binh N.T., Thanh Tung B, Thi Mai N., Thi Hue. N. (2020). Validation of a High-Performance Liquid Chromatographic Method with Diode Array Detection for the Quantification of Citral and Formulation of Insect Repellent Cream from Lemongrass Oil. *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 36, No. 1. pp.20-29.

Torres-Ponce R. L., Morales-Corral D, Ballinas-Casarrubias M. D. L. & Nevárez-Moorillón G. V. 2015. Nopal: semi-desert plant with applications in pharmaceuticals, food and animal nutrition. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, Vol.6. No. 5, 1129-1142.

Revista SNIQBA

IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIABLES FISICOQUÍMICAS QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE PHB POR *Bacillus megaterium* MNSH1-9K-1

IDENTIFICATION OF THE PHYSICOCHEMICAL VARIABLES INVOLVED IN THE PRODUCTION OF PHB BY *Bacillus megaterium* MNSH1-9K-1

Andrea Margarita Rivas-Castillo^{a,b}, Brandon Daniel Pérez-García^{a,b}, María del Carmen Escutia-León^a, Norma Gabriela Rojas-Avelizapa^{a*}

^a Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Unidad Querétaro, Qro., México.

^b Universidad Tecnológica de la Zona Metropolitana del Valle de México, Tizayuca, Hgo., México.

E-mail: nrojasa@ipn.mx

Received: September 06, 2023; Revised: November 08, 2023; Accepted: November 29, 2023

Resumen

El presente estudio se enfocó en la identificación de las variables fisicoquímicas que influyen en la producción de polihidroxibutirato (PHB) por la cepa *Bacillus megaterium* MNSH1-9K-1, utilizando un medio de cultivo elaborado a partir de desechos agroindustriales, específicamente residuos de cáscara de naranja. Estudios previos demostraron que la cepa mencionada tiene la capacidad de producir este biopolímero (BP) en medios de bajo costo, lo cual pudiera ser un componente importante para disminuir los costos de producción. El presente estudio evaluó el efecto de algunos factores fisicoquímicos de crecimiento que han sido reportados anteriormente como relevantes para mejorar la producción bacteriana de PHB, utilizando para ello un diseño estadístico de Plackett-Burman; además, los datos fueron analizados a través de un modelo de regresión de superficie de respuesta. Los resultados obtenidos serán de utilidad para buscar la optimización de este proceso biotecnológico, con el enfoque de establecer una alternativa viable para la sustitución del uso de BP convencionales y, de esta manera, promover la disminución del impacto ambiental ocasionado por los residuos plásticos.

Palabras clave: Biopolímeros, PHB, *Bacillus megaterium*, medios de cultivo de bajo costo, residuos de cáscara de naranja.

Abstract

The present study focused on the identification of the physicochemical variables that influence the production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus megaterium* strain MNSH1-9K-1, using a culture medium elaborated from agro-industrial waste, specifically orange-peel residues. Previous studies demonstrated that the strain can produce this biopolymer (BP) in low-cost media, which could be an important component to reduce production costs. The present study evaluated the effect of some physicochemical growth factors that have been previously reported as relevant to improve the bacterial production of PHB, using a Plackett-Burman statistical design; in addition, the data was analyzed through a response surface regression model. The results obtained will be useful to seek the optimization of this biotechnological process, with the focus of establishing a viable alternative to replace the use of conventional BP and, in this way, promote the reduction of the environmental impact caused by plastic waste.

Introduction

The production of plastics and the use of synthetic polymers is still growing exponentially nowadays. Due to their low degradability, most discarded plastics persist in the environment, negatively impacting ecosystems and threatening biodiversity and habitats (Buteler, 2020).

Because of this severe problem, there is a continuous search for feasible alternatives to diminish the impact produced by conventional plastics, like the generation of biopolymers (BP). Polyhydroxyalkanoates (PHA), and specifically polyhydroxybutyrates (PHB), present similar characteristics to polypropylene, with the advantages of biodegradability and barrier properties (water insolubility and low permeability to O₂, H₂, and CO₂) (Leja & Lewandowicz, 2010).

Among the wide variety of bacteria capable of producing PHA, it has been previously reported that *Bacillus megaterium* strain MNSH1-9K-1 presents relevant characteristics for biotechnological purposes (Rivas-Castillo et al., 2017, 2018, 2019a); more precisely, strain MNSH1-9K-1 possesses an enhanced capability for PHB production compared to other bacterial producers reported to date (Angeles-Padilla, 2019; Rivas-Castillo et al., 2019b, 2022). In addition, it has been observed that this high BP production can be sustained in a low-cost culture medium produced from orange peel residues (Angeles-Padilla, 2019; Figueroa-Ocampo, 2019).

Thus, the present study aimed to identify the main physicochemical variables that may influence PHB production by *B. megaterium* MNSH1-9K-1 using a Plackett-Burman experimental design, with the objective of potentiating this biotechnological production process.

Experimental section

Microorganism and growth conditions

B. megaterium MNSH1-9K-1 was isolated from a mining site in Guanajuato, Mexico (Rivas-Castillo et al., 2019a). Pre-inoculums were grown for 12-24 h in 125-mL flasks containing 50 mL of Nutrient Broth (NB), at 30°C and 120 rpm. Afterward, total cell counts were performed using a Neubauer chamber to inoculate experimental sets with 1x10⁶ total cells, which were grown for 48 h (Gouda et al., 2001; Angeles-Padilla, 2019). The control condition (C) was evaluated in 50 mL of NB at 30°C and 150 rpm (Angeles-Padilla, 2019); for other growth conditions,

factors were varied according to the experimental design proposed (Table 1).

Preparation of culture medium from orange-peel residues

Oranges were bought from a supermarket. Peels were removed from the fruits and the culture medium was prepared following the protocol previously described (Rivas-Castillo et al., 2019b), refrigerating it until further use. Subsequently, the medium was supplemented as specified for the different conditions assessed and sterilized by tyndallization to avoid the caramelization of the included components (Brown, 1979; Fürch et al., 2007). In the case of the soluble starch, dry sterilization was applied to prevent its gelatinization, performing it in a drying oven for 20 min at 200°C (Nagy et al., 2021); letting it cool at environmental temperature, and adding it to the culture medium after sterilization (Pérez-Uz et al., 2010).

PHB extraction

The sodium hypochlorite-chloroform method was used (Rivas-Castillo et al., 2019b; Valdez-Calderón et al., 2022), as follows: The samples were centrifuged at 4000 rpm for 20 min to obtain the biomass. Then, the liquid phase was discarded, and sodium hypochlorite and chloroform were added to the pellet in a 1:10 (w/v) proportion each, mixing thoroughly until the bacterial cells were completely resuspended. The samples were incubated at 30°C and 120 rpm for 90 min, and the upper phase was removed using a Pasteur pipette. To precipitate the BP, cold methanol was added to the lower phase in a 1:10 proportion (w/v), mixed, and let stand for 24 h at 4°C. Afterward, the samples were heated in a water bath at 65°C until the liquid was reduced to 5-10%, and subsequently transferred to dry heat (oven at 65°C) until dryness. Once completely dried, the samples were cooled at environmental temperature and the PHB obtention was determined gravimetrically.

Experimental design

The physicochemical variables to assess were determined based on the factors previously reported to have a significant impact on PHA production (Omar et al., 2001; Yanti et al., 2009; Johnson et al., 2010; Younis et al., 2010; Shah., 2014; Peña-Jurado et

al., 2019; Soruba et al., 2019; Suryawanshi et al., 2020; El-Kadi et al., 2021; Khatami et al., 2021; Drusilla et al., 2022; Samal et al., 2023). A complete Plackett-Burman factorial design was used, to evaluate the effect of (Table 1): pH, rpm, temperature, inoculum (total cells), the volume of the medium in the flask, ammonium sulfate, cane molasses, casein peptone, ethanol, fructose, glucose, glycerol, lactic casein, sodium acetate, sodium nitrate, soluble starch, sucrose, and whey in two different conditions (B, untreated; and B_1, treated by centrifugation at 3000 rpm for 20 min to remove solids). In the case of the growth factors, a lower and an upper limit were established; for nutritional variables, presence/absence conditions were used ($n=2$).

Statistical analyses

The basic statistical analyses were performed using the commercial software Origin Pro 9.0, and the lower-case letters indicate groups of data that are significantly different ($P \leq 0.05$). To evaluate the influence of physicochemical variables in PHB production, Minitab® 19 software was used to both elaborate and analyze the Plackett-Burman experimental design.

Results and Discussion

Production of PHB under different growth conditions.

As can be observed in Figure 1, from the 44 different growth conditions evaluated (Table 1), the BP production changed differentially depending on the growth factors and the type and quantity of carbon and nitrogen sources used to enrich the medium. The highest PHB production yields were obtained from conditions 30 (112.62 g/L); followed by condition 21 (91.14 g/L), and condition 8 (68.25 g/L). Thus, up to a 9-fold increment in PHB production was achieved in condition 30, whose growth conditions were: pH 6, 30°C, 150 mL, 150 rpm, and an inoculum of 1×10^8 total cells; and supplemented with (g/L): soluble starch, 100; sucrose, 100; cane molasses, 100; sodium nitrate, 10; lactic casein, 10; sodium acetate, 30; untreated whey (B), 150; and, treated whey (B_1), 150. These results could be attributed to the cellular stress produced by the specific growth conditions which, in some cases like in condition 30, favored PHB production, such as anoxic conditions, the saturation of carbon content, and the lack of nitrogen. It is important to mention that the carbon:nitrogen relationship found in condition 30 is 8:1.

Statistical analysis to determine significant factors for PHB production.

Results were analyzed by a response surface regression model in order to determine which variables have an impact on the production process (Table 2). For this purpose, all the variables were considered as continuous, and factors with $P \leq 0.05$ were determined as significant. In addition, P positive and negative values were examined.

The second column (Effect) in Table 2 specifies the influence of each variable on the PHB production process, being the soluble starch and the sodium nitrate the factors with the highest effect, both presenting a positive influence on the process.

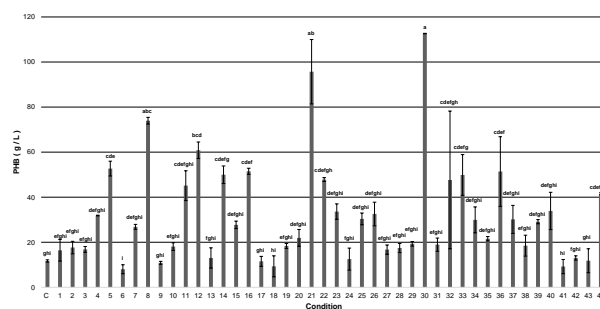


Figure 1. PHB production under the diverse growth conditions evaluated. C, control.

Additionally, to these two factors with high positive values, there were observed other variables with positive effects, like rpm, volume of medium, glucose, sucrose, cane molasses, casein peptone, yeast extract, ammonium sulfate, glycerol, sodium acetate, treated whey (B_1), and the number of total cells in the inoculum; all these variables show a favorable impact on production yield, however, they cannot be considered as significant due to their P value (> 0.05).

There are also factors showing negative values on the effect, which can be classified as detrimental for the response sought; that means that their presence, in high values or concentrations, affects PHB production, like pH, temperature, fructose, ammonium nitrate, ethanol, and untreated whey (B).

Like P , T values help to determine the significance of the variables, the higher the T value, the higher the significance. Complementing P interpretation (≤ 0.05), the highest T -significant values are observed in soluble starch and sodium nitrate. The third column in Table 2 (Coef) describes the degree and direction of

the relationship between each term evaluated and the response variable, considering the mean value of the effect. Then, the factors with positive Coef values may have a significant direct effect on PHB production, while terms with negative values affect the response.

Table 2. Codified coefficients.

Term	Effect	Coef ^a	Coef EE ^b	T value	P value	VIF ^c
Constant		31.66	2.73	11.59	0.000	
pH	-5.91	-2.96	2.83	-1.04	0.308	1.08
Temperature	-9.51	-4.75	2.93	-1.62	0.119	1.15
Glucose	1.95	0.98	2.86	0.34	0.736	1.10
Soluble starch	22.42	11.21	2.92	3.84	0.001	1.14
Sucrose	8.95	4.48	2.85	1.57	0.130	1.09
Fructose	-6.41	-3.20	2.82	-1.14	0.267	1.06
Cane molasses	1.28	0.64	2.94	0.22	0.830	1.16
Casein peptone	2.16	1.08	2.88	0.37	0.712	1.11
Ammonium nitrate	-9.16	-4.58	2.94	-1.56	0.133	1.16
Yeast extract	3.23	1.62	2.99	0.54	0.595	1.20
Sodium nitrate	12.07	6.03	2.88	2.09	0.048	1.11
Lactic casein	5.61	2.80	2.81	1.00	0.330	1.06
Ammonium sulfate	3.18	1.59	2.87	0.55	0.586	1.10
Glycerol	0.16	0.08	2.92	0.03	0.979	1.14
Absolute ethanol	-4.21	-2.10	2.86	-0.73	0.471	1.10
Sodium acetate	1.83	0.92	2.87	0.32	0.752	1.10
Whey B	-10.77	-5.39	2.83	-1.90	0.071	1.08
Whey B_1	2.78	1.39	2.82	0.49	0.626	1.06
Total cells	4.22	2.11	2.86	0.74	0.468	1.10
Volume of the medium	10.31	5.16	2.88	1.79	0.087	1.11
RPM	11.60	5.80	2.86	2.03	0.054	1.09

^aCoef, Coefficient

^bCoef EE, Standard error of the coefficient

^cVIF, Variance Influence Factor

In the case of the subsequent column, corresponding to the standard error of the Coef value (Coef EE), it shows the variability of the Coef values to evaluate if the effect of each factor is reliable. As can be observed, Coef EE is similar for all the variables assessed. Finally, the Variance Influence Factor (FIV) allows the identification of multicollinearity; that is, the correlation between the variables included in the analysis. Because all FIV are around 1, and then all

are < 5, there is no correlation between the factors, establishing that the effects obtained are statistically significant.

Then, to graphically observe the effect that the variables have on PHB production, the standardized effects were assessed (Figure 2), for which the diagonal line in the middle indicates the separation between positive and negative values; the values on the left side have a negative impact on the process, whereas the ones on the right represent a positive effect. Even more, the factors that can be considered highly significant are the ones that appear farther from the 0 (cero) value on the X-axis and are presented in red: D, soluble starch, and L, sodium nitrate.

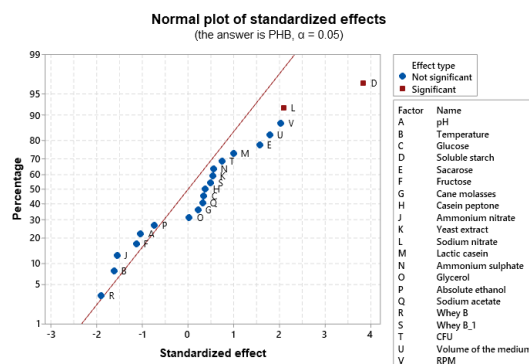


Figure 2. The normal plot of standardized effects.

Finally, Figure 3 corresponds to the Pareto diagram of the data, to visualize the most significant factors for the PHB production process in terms of the P value, showing influencing variables regardless of whether they are beneficial or counterproductive for the response analyzed. Again, it can be observed the high impact of starch and sodium nitrate for PHB production.

The growth conditions used in condition 30 exert the most suitable scenario for PHB production through the study, considering that BP are generated under stressful circumstances of bacterial growth. The analysis of the experimental design showed that soluble starch and sodium nitrate are the two variables with the highest influence on the production, reflecting that the microorganism prefers a complex carbohydrate source to simple ones to enhance the production process.

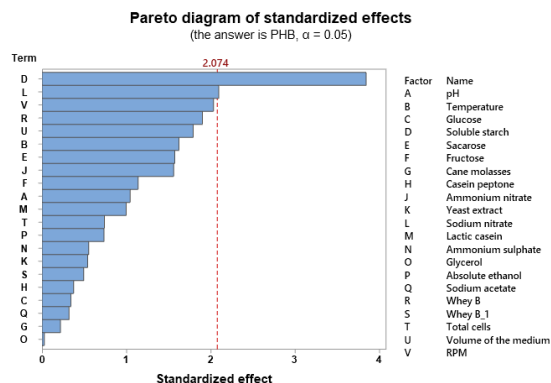


Figure 3. Pareto diagram of the variables assessed.

Although starch preference by MNSH1-9K-1 under the conditions assessed is uncertain, the use of renewable carbon sources for PHB biosynthesis may support the diminishing of production costs, and bacterial species like *Escherichia coli* and *Vibrio alginolyticus* have been engineered to use starch as carbon source for BP production (Bhatia et al., 2015; Li et al., 2023); *B. megaterium* MNSH1-9K-1 has this intrinsic capability. Regarding sodium nitrate, there has been previously reported that the presence of this compound may enhance the metabolic pathway of PHB synthesis by increasing pyruvate production, as was observed in *Halomonas* sp. strain KM-1 (Kawata et al., 2016).

Additionally, it seems possible that the diminishing of available oxygen favored the production of BP (caused by a decrease in the available air in the free space of the flask and the aeration by orbital agitation), as observed for other bacterial species (Saharan et al., 2014; Madhusoodanan et al., 2022). However, considering that the experimental design used in the study is based on two levels (maximum and minimum), it will be strongly recommended to further evaluate some factors (in addition to soluble starch and sodium nitrate) with different central points to corroborate their influence, like in the case of those whose *P* values are close to the significance limit: rpm, temperature, volume of the medium, ammonium nitrate, sucrose, and untreated whey (B); considering that these latter factors have been identified as significant for other PHA production processes.

Conclusions

There was achieved a 9-fold increase in the PHB production by *B. megaterium* MNSH1-9K-1,

observing that the three growth conditions (30, 28, and 32) with the highest production yields have similar characteristics, as pH 6 and the addition of soluble starch and sodium nitrate. In addition, condition 30 seems to possess other key attributes, like lower aeration and lower temperature.

Overall, the obtained results set the precedents in the path for the optimization of the process, which will encompass microbiological, molecular, and statistical approaches. The response surface regression analysis performed may serve as a guide for the gradual variation of the factors that affect the production process.

References

- Angeles-Padilla, A. F. (2019). Identification of the nutritional sources that influence PHB production by *Bacillus megaterium* MNSH1-9K-1 in a low-cost culture medium (In Spanish). Thesis to obtain the Associate Degree in Chemistry, Environmental Technology Area at the Universidad Tecnológica de la Zona Metropolitana del Valle de México.
- Bhatia, S. A., Shim, Y. H., Jeon J. M., Brigham, C. J., Kim, Y. H., Kim, H. J., et al. (2015). Starch based polyhydroxybutyrate production in engineered *Escherichia coli*. *Bioprocesses and Biosystems Engineering*, 38, 1479-1484. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1390-y>
- Buteler, M. (2020). What is plastic pollution and why does it affect us all? (In Spanish). *Difundiendo Saberes*, 16(28), 56-60. Retrieved from https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/109678/CONICET_Digital_Nro.9fbc68cb0eb2400b7f6ac241af6e3f0_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Brown, J. V., Wiles, R., & Prentice, G. A. (1979). The effect of a modified tyndallization process upon the sporeforming bacteria of milk and cream. *International Journal of Dairy Technology*, 32(2), 109-112. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1979.tb01907.x>
- Drusilla, Y. B., Fauziah, M. Z., Siti Baidurah, Y., Tong, W.Y., & Lee, C. K. (2022). Production and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Burkholderia cepacia* BPT1213 using waste glycerol as carbon source. *Biocatalysis and*

- Agricultural Biotechnology*, 41, 102310. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102310>
- El-Kadi, S. M., Elbagory, M., Zawawy, A. H., El-Shaer, F.A., Shoukry, A. A., El-Nahrawy, S., Omara, A.D., & Ali, F. I. (2021). Biosynthesis of Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) from different bacterial strains grown on alternative cheap carbon sources. *Polymers*, 13(21), 3801. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/polym13213801>
- Figuroa-Ocampo, C. B. (2019). Analysis of the growth and polyhydroxyalkanoate production by *Bacillus megaterium* using organic residues as substitutes for culture medium (In Spanish). Thesis to obtain the Associate Degree in Chemistry, Environmental Technology Area at the Universidad Tecnológica de la Zona Metropolitana del Valle de México.
- Fürch, T., Hollmann R., Wittmann C., Wang, W., & Deckwer W. D. (2007). Comparative study on central metabolic fluxes of *Bacillus megaterium* strains in continuous culture using ^{13}C labelled substrates. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30, 47–59. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00449-006-0095-7>
- Gouda, M. K., Swellam, A. E., & Omar, S. H. (2001). Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, 156, 201-207. Retrieved from <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00104>
- Johnson, K., van Geest, J., Kleerebezem, R., & van Loosdrecht, C. M. M. (2010). Short- and long-term temperature effects on aerobic polyhydroxybutyrate producing mixed cultures. *Water Research*, 44(6), 1689-1700. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.11.022>
- Kawata, Y., Nishimura, T., Matsushita, I., & Tsubota, J. (2016). Efficient production and secretion of pyruvate from *Halomonas* sp. KM-1 under aerobic conditions. *AMB Express*, 6, 22. Retrieved from <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0195-y>
- Khatami, K., Pérez-Zabaleta, M., & Owusu-Agyeman, I., & Cetecioglu, Z. (2021). Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production? *Waste Management*, 119, 374–388. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.10.008>
- Leja, K. & Lewandowicz, G. (2010). Polymer Biodegradation and Biodegradable Polymers – a Review. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19(2), 255–266. Retrieved from <http://www.pjoes.com/Polymer-Biodegradation-and-Biodegradable-Polymers-aReview,88379,0,2.html>
- Li, H. F., Tian, L., Lian, G., Fan, L. H., & Li, Z. J. (2023). Engineering *Vibrio alginolyticus* as a novel chassis for PHB production from starch. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1130368. Retrieved from <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1130368>
- Madhusoodanan, G., Hariharapura, R. C., & Somashekara, D. (2022). Dissolved oxygen as a propulsive parameter for polyhydroxyalkanoate production using *Bacillus endophyticus* cultures. *Environment, Development and Sustainability*, 24, 4641-4658. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s10668-021-01626-3>
- Nagy, R., Máthé, E., Csapó, J., & Sipos P. (2021). Modifying effects of physical processes on starch and dietary fiber content of foodstuffs. *Processes*, 9(1), 17. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/pr9010017>
- Omar, S., Rayes, A., Eqaab, A., & Steinbüchel, A. (2001). Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. *Biotechnology Letters* 23(14),1119–1123. Retrieved from <https://doi.org/10.1023/A:1010559800535>
- Peña-Jurado, E., Pérez-Vega, S., Zavala-Díaz, F. J., Pérez-Reyes, I., Gutierrez-Mendez, N., Vazquez-Castillo, J., & Salmeron, I. (2019). Production of poly (3-hydroxybutyrate) from a dairy industry wastewater using *Bacillus subtilis* EPAH18: Bioprocess development and simulation. *Biochemical Engineering Journal*, 151, 107324. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107324>
- Pérez-Uz, B., de Silóniz, M. I., Torralba, B., & Vázquez, C. (2010). Sterilization methodology in the microbiological laboratory (In Spanish). *Reduca (Biología)*, 3(5), 1-14. Retrieved from <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/818>
- Rivas-Castillo, A. M., Guatemala-Cisneros, M. E., Gómez-Ramírez, M., & Rojas-Avelizapa, N. G. (2019a). Metal removal and morphological changes of *B. megaterium* in the presence of a

- spent catalyst. *Journal of Environmental Science and Health Part A. Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 54(6), 533-540. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/10934529.2019.1571307>
- Rivas- Castillo, A. M., Mejía-Escobedo, Y., & Rojas-Avelizapa, N. G. (2018). Study of *Bacillus megaterium* potential application for high metal content residues biotreatment. *Open Journal of Bacteriology*, 2(1), 4-8. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.17352/ojb.000007>
- Rivas-Castillo, A. M., Pérez-García, B. D, Hernández-Duarte, C. A., & Rojas-Avelizapa, N. G. (2022). Study of bacterial biopolymer production as a pathway for the replacement of conventional plastics (In Spanish). *Exploratoris: Revista de la Realidad Global*, 11(1), 1-7. Retrieved from <https://static1.squarespace.com/static/55564587e4b0d1d3fb1eda6b/t/623e49262e53ae737c15b9dd/1648249127103/HID318RivasCastillo+---+1-7.pdf>
- Rivas-Castillo, A. M., Orona-Tamayo, D., Gómez-Ramírez, M., & Rojas-Avelizapa, N. G. (2017). Diverse molecular resistance mechanisms of *Bacillus megaterium* during metal removal present in a spent catalyst. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 22, 296-307. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s12257-016-0019-6>
- Rivas-Castillo, A. M., Valdez-Calderón, A., & Rojas Avelizapa, N. G. (2019b). Culture medium for enhancing biopolymer production (In Spanish). Patent Application No. MX/a/2019/014627 by the Mexican Institute of Intellectual Property (IMPI).
- Saharan, B. S., Grewal, A., & Kumar, P. (2014). Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates: A review on trends and latest developments. *Chinese Journal of Biology*, 2014, 802984. Retrieved from <https://doi.org/10.1155/2014/802984>
- Samal, S., Pati, S., & Mohapatra, S. (2023). PHAs production by facultative anaerobic bacteria *Bacillus cereus* FM5 through submerged and solid-state fermentation under anoxic condition. *Antonie van Leeuwenhoek*, 116(6), 521–529. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s10482-023-01825-0>
- Shah, K. (2014). Optimization and production of Polyhydroxybutarate (PHB) by *Bacillus subtilis* G1S1 from soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(5), 377-387. Retrieved from <http://www.ijcmas.com>
- Suryawanshi, S. S., Sarje, S. S, Loni, P. C., Bhujbal, S., & Kamble, P. P. (2020). Bioconversion of sugarcane molasses into bioplastic (Polyhydroxybutyrate) using *Bacillus cereus* 2156 under statistically optimized culture conditions. *Analytical Chemistry Letters*, 10(1), 80-92. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/22297928.2020.1746197>
- Soruba, E. & Sridharan, T. Biosynthesis and statistical optimization of polyhydroxyalkanoate (PHA) produced by *Bacillus cereus* VIT-SSR1 and fabrication of biopolymer films for sustained drug release. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 945-958. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.163>
- Valdez-Calderón, A., Barraza-Salas, M., Quezada-Cruz, M., Islas-Ponce, M. A., Angeles-Padilla, A. F., Carrillo-Ibarra, S., Rodríguez, M., Rojas-Avelizapa, N. G., Garrido-Hernández, A., & Rivas-Castillo, A. M. (2022). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by a novel *Klebsiella pneumoniae* strain using low-cost media from fruit peel residues. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12(11), 4925-4938. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01147-5>
- Yanti, N. A., Sembiring, L., & Margino, S. (2009). Production of Poly- α -hydroxybutyrate (PHB) from sago starch by the native isolate *Bacillus megaterium* PSA10. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 14(1), 1111-1116. Retrieved from <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.7804>
- Younis, M. A., Hezayen, F. F., Nour-Eldein, M. A., & Shabeb, M. S. (2010). Optimization of cultivation medium and growth conditions for *Bacillus subtilis* KO strain isolated from sugar cane molasses. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science*, 7(1), 31-37. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/310772713_Optimization_of_cultivation_medium_and_growth_conditions_for_Bacillus_subtilis_KO_strain_isolated_from_sugar_cane_molasses

Table 1. Different growth conditions evaluated.

No	pH	Temp (°C)	Glucose (g/L)	Starch (g/L)	Sucrose (g/L)	Fructose (g/L)	Cane molasses (g/L)	Casein peptone (g/L)	Ammonium nitrate (g/L)	Yeast extract (g/L)	Sodium nitrate (g/L)	Lactic casein (g/L)	Ammonium sulfate (g/L)	Glycerol (g/L)	Ethanol (g/L)	Sodium acetate (g/L)	Whey B (g/L)	Whey B_1 (g/L)	Inoculum (Total cells)	Medium in flask (mL)	Agitation (rpm)
1	8	40	0	0	10	0	0	0	0	1	1	0	1	0	3	3	15	0	1x10 ⁸	50	150
2	6	40	0	0	0	0	10	0	1	1	1	1	0	3	0	0	0	0	1x10 ⁸	50	150
3	6	30	10	0	0	10	10	1	0	1	1	0	0	0	3	0	15	15	1x10 ⁸	50	25
4	8	30	0	0	0	10	10	0	1	0	0	0	1	0	0	3	15	15	1x10 ³	50	150
5	8	30	0	10	0	0	10	1	0	1	0	0	1	3	0	0	15	15	1x10 ⁸	150	150
6	6	40	0	0	0	10	0	0	0	0	1	1	1	3	3	0	15	15	1x10 ³	150	25
7	8	40	0	10	10	0	10	1	0	0	0	1	1	0	3	0	0	15	1x10 ³	50	25
8	6	40	10	10	0	10	0	0	0	1	0	1	1	0	0	3	0	15	1x10 ⁸	50	150
9	6	40	0	0	10	0	0	1	0	1	0	0	0	3	0	3	15	15	1x10 ³	50	25
10	8	30	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	3	3	0	15	1x10 ⁸	150	25
11	6	30	0	10	10	10	10	0	1	1	1	0	1	3	3	3	0	15	1x10 ⁸	50	25
12	8	30	10	10	0	10	10	0	1	0	1	1	1	0	3	0	0	0	1x10 ⁸	150	150
13	8	40	10	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	15	0	1x10 ³	150	150
14	8	30	10	10	0	0	10	0	0	1	1	1	0	3	3	3	15	15	1x10 ³	50	150
15	8	30	0	0	10	0	10	1	1	0	1	0	0	3	3	0	15	0	1x10 ³	150	25
16	6	40	10	10	10	10	10	1	0	0	1	0	1	3	0	0	15	0	1x10 ³	50	150
17	6	30	10	0	10	0	10	0	1	1	0	1	1	0	0	0	15	0	1x10 ³	150	25
18	6	40	0	10	10	10	0	0	1	1	0	0	0	0	3	0	15	15	1x10 ³	150	150
19	6	30	10	0	0	10	0	0	1	1	1	0	0	3	0	3	15	0	1x10 ⁸	150	150
20	8	40	10	0	10	10	10	1	1	1	1	1	1	3	0	3	15	15	1x10 ⁸	150	25
21	6	40	10	10	10	0	0	1	0	1	1	1	0	3	3	0	0	0	1x10 ³	150	25
22	8	40	0	10	10	0	0	0	1	0	0	1	1	3	0	3	0	0	1x10 ³	150	150
23	6	30	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	1x10 ³	50	150
24	6	40	0	0	10	10	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1x10 ⁸	150	25
25	8	40	0	10	0	10	10	0	0	1	1	0	0	0	0	3	0	0	1x10 ³	150	25
26	8	40	0	10	0	10	0	1	0	0	1	0	0	3	3	3	0	15	1x10 ⁸	50	150
27	8	40	10	0	0	10	0	1	1	1	0	0	1	3	3	0	0	0	1x10 ³	50	25
28	8	30	0	10	10	10	0	0	0	1	0	1	0	3	0	0	15	0	1x10 ⁸	50	25
29	8	40	10	10	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	15	15	1x10 ⁸	50	25
30	6	30	0	10	10	0	10	0	0	0	1	1	0	0	0	3	15	15	1x10 ⁸	150	150
31	6	30	10	0	10	0	0	1	1	0	0	1	1	3	3	0	15	15	1x10 ⁸	50	150
32	6	30	0	10	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	3	15	0	1x10 ³	50	25
33	8	30	10	10	10	0	10	1	1	1	0	0	0	0	0	3	0	0	1x10 ³	50	150
34	8	30	0	0	10	10	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	15	1x10 ³	50	150
35	8	30	10	10	10	10	0	1	0	0	0	0	1	0	3	3	15	15	1x10 ³	150	25
36	6	30	0	0	10	10	10	1	0	1	0	1	1	3	3	3	0	0	1x10 ³	150	150
37	6	40	10	10	0	0	10	0	0	0	0	0	1	3	3	3	15	0	1x10 ⁸	150	25
38	6	40	10	0	0	0	10	1	1	0	1	0	1	0	3	3	0	15	1x10 ³	150	150
39	8	40	10	0	10	10	10	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	15	1x10 ⁸	150	150
40	6	30	10	10	0	10	10	1	1	0	0	1	0	3	0	0	0	15	1x10 ³	150	25
41	6	40	0	10	0	10	10	1	1	0	0	1	0	0	3	3	15	0	1x10 ⁸	50	150
42	8	20	10	0	0	0	10	1	0	0	1	1	1	3	0	3	0	0	1x10 ⁸	50	25
43	6	40	10	0	10	10	0	0	1	0	1	1	0	0	3	3	0	0	1x10 ³	50	25
44	8	30	10	0	10	0	0	0	0	1	1	0	1	3	0	0	0	15	1x10 ³	150	25