

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Extracción y Cuantificación de Colorantes Naturales con Aplicación Agroindustrial y Evaluación de su Actividad Antioxidante en Rizoma de *Smilax domingensis* (Zarzaparrilla), Cálices de *Hibiscus sabdariffa* (Rosa de Jamaica) y Corteza de *Rhizophora mangle* (Mangle)

Rudy Daniel Toc Noriega
Elmer Geovany Oliva Palencia

Químicos Farmacéuticos

Guatemala, Octubre de 2013

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Extracción y Cuantificación de Colorantes Naturales con Aplicación Agroindustrial y Evaluación de su Actividad Antioxidante en Rizoma de *Smilax domingensis* (Zarzaparrilla), Cálices de *Hibiscus sabdariffa* (Rosa de Jamaica) y Corteza de *Rhizophora mangle* (Mangle)

Seminario de Investigación

Presentado por:

**Rudy Daniel Toc Noriega
Elmer Geovany Oliva Palencia**

Para optar al título de:

Químicos Farmacéuticos

Guatemala, Octubre de 2013

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. José Rodrigo Vargas Rosales	Vocal III
Br. Fayver Manuel de León Mayorga	Vocal IV
Br. Maily Graciela Córdova Audón	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A la gloriosa y tricentenaria Universidad de San Carlos de Guatemala, nuestra alma mater.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

A la asesora del seminario de Investigación: Licda. Sully Cruz, por su amistad, asesoría y apoyo a lo largo del seminario.

A la Revisora del Seminario de Investigación: Licda. Aylin Santizo, por su amistad, asesoría y apoyo a lo largo del seminario.

A la Licda. Nereida Marroquín por su apoyo y asesoramiento.

Al equipo de investigadores del Laboratorio de Productos Naturales –LIPRONAT- por su interés, colaboración y amabilidad brindada a lo largo del trabajo.

DEDICATORIA

A Dios:

Por ser el diseñador, luz, guía, esperanza y amor en nuestro camino; y por darnos la oportunidad de concluir esta etapa con éxito.

A nuestros padres:

Como una recompensa a sus constantes esfuerzos, sacrificios e incondicional apoyo. Por habernos dado la oportunidad de gozar de todos los privilegios de su amor, protección, guía y educación.

A nuestros hermanos:

Por el apoyo incondicional brindado en todas las etapas de este proceso.

A nuestros abuelitos:

Por las constantes oraciones y habernos dado la dicha de compartir a su lado este triunfo.

A nuestros tíos y primos:

Por ser ejemplo de superación y el motor que impulsa fuerza a nuestras vidas.

A nuestros maestros:

Por creer en nuestras capacidades y habernos dado la oportunidad de crecer en conocimiento por sus enseñanzas.

A nuestros compañeros:

Por los momentos compartidos, apoyo, aventuras, desavenencias y triunfos en esta etapa de nuestras vidas.

INDICE

	Pág.
1. Ámbito de la Investigación	1
2. Resumen	2
3. Antecedentes	3
4. Justificación	30
5. Objetivos	31
6. Hipótesis	32
7. Materiales y métodos	33
8. Resultados	56
9. Discusión de resultados	81
10. Conclusiones	94
11. Recomendaciones	97
12 Referencias bibliográficas	98
13. Anexos	103

1. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

(Ubicación Dentro del Proyecto Macro)

Esta investigación evaluó la capacidad colorante y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos de las tres especies vegetales en estudio. La misma tiene su aplicación dentro del área agroindustrial debido a que permitió conocer si las mismas pueden ser destinadas a la obtención industrial de estos extractos, contribuyendo a fortalecer este sector.

El proyecto se realizó en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, específicamente en:

- Laboratorio del Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica, Escuela de Química Farmacéutica, edificio T-10.
- Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), edificio T-10.

En donde se llevaron a cabo las extracciones, cuantificaciones y evaluaciones de la actividad antioxidante.

2. RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad colorante y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos del rizoma de Zarzaparrilla (*Smilax domingensis*), cálices de Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y corteza de *mangle* (*Rhizophora mangle*) para determinar su aplicación agroindustrial. La metodología incluyó colecta, extracción, caracterización, cuantificación y evaluación de los metabolitos responsables de la actividad colorante comparando con aquellos utilizados por la industria como colorantes en cosméticos y tintes en fibras; para la evaluación de la actividad antioxidante se compararon los extractos con diferentes estándares antioxidantes.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el extracto de *R. mangle*, corteza presentó el mayor rendimiento de extracción (44%), en este extracto se evaluó la presencia de taninos presentando un porcentaje de 39.61. El extracto de *H. sabdariffa*, cálices presentó el menor rendimiento (11%), en este extracto se evaluó la presencia de antocianinas presentando una concentración de 33.93 mg/g.

Se demostró a través de los resultados de los ensayos de tinción en fibras y de coloración en cosméticos, que los extractos de las tres especies de estudio, son efectivas para ser utilizadas para tales fines, además pueden proveer otras propiedades agregadas como antioxidante y/o preservantes a los preparados cosméticos.

Se logro establecer mediante el análisis de coste de producción de los colorantes naturales de estudio en función del precio de venta de los colorantes sintéticos, una marcada diferencia, siendo más baratos estos últimos; sin embargo la tendencia de la sociedad a el uso de lo natural y las restricciones cada vez más frecuentes del uso de colorantes sintéticos, justifican el uso de este tipo de colorantes.

De acuerdo a los resultados de estabilidad los tres extractos podrían usarse para colorear sistemas alimentarios, cosméticos y/o farmacéuticos a pH 3, 4, 5 y 7, el extracto más prometedor fue el de *H. sabdariffa*, para ser usado como sustituto del rojo No. 40.

Por último, se demostró la capacidad antioxidante de los tres extractos, siendo el extracto de Zarzaparrilla y Mangle los que presentaron mayor actividad (IC_{50} 0.20 y 0.26 mg/ml por el método DPPH y 0.24 y 0.41 mg/ml por el método ABTS respectivamente), la Rosa de Jamaica presentó la menor actividad (4.09 mg/ml por el método DPPH y 7.92 por el método ABTS), pero los tres podrían ser utilizados como antioxidantes naturales en preparados cosméticos, farmacéuticos o alimenticios.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades

3.1.1 Color:

Es la sensación visual causada por la luz, compuesta por una longitud de onda definida o grupo de longitudes de onda, emitidas, reflejadas, refractadas o transmitidas por un objeto.

3.1.2 Colorantes:

Se entiende por el nombre de colorante cualquier sustancia que imparta color a otro material o mezcla. Colorantes son tanto pigmentos como tintes (Moral, C., 1995, p. 5).

3.1.3 Pigmentos:

Se entiende por el nombre de pigmento aquellas sustancias, siempre insolubles, que se aplican para conferir color mediante materias adhesivas. Pueden ser de origen mineral (óxidos o minerales), o de origen orgánico; existen además, una gran cantidad de pigmentos que se obtienen sintéticamente (Moral, C., 1995, p. 3).

Las cualidades requeridas para un buen pigmento son: poder colorante elevado, finura de los granos para asegurar una correcta suspensión y homogeneidad de la pintura, estabilidad de los colores y opacidad suficiente para cubrir la superficie pintada (Moral, C., 1995, p. 3).

3.1.4 Tintes:

Se entiende por el nombre de tinte aquellas sustancias, siempre solubles, que se aplican para conferir color a un material o mezcla. Tiñen de tal modo que los productos primitivos no se pueden separar por un simple entresacado (están químicamente unidos a la materia a la que se aplican). Pueden ser de origen natural o sintético, los tintes orgánicos son, generalmente, brillantes y más variados que los pigmentos, pero tienden a ser menos estables al calor, luz del sol y efectos químicos (Moral, C., 1995, p. 5-6). Son usados para dar color a fibras, cueros, etc.

3.2 Colorantes naturales de origen vegetal

Desde la prehistoria, el hombre ha sentido la necesidad de adornar y embellecer multitud de objetos de uso corriente, comunicándoles colores más o menos vivos, para lo que se valió de materias colorantes naturales procedentes tanto del reino animal, como vegetal o mineral. Para desempeñar esta actividad decorativa, había de tener primero cubiertas sus necesidades básicas, por lo que, cuando los alimentos imprescindibles estaban asegurados, surgió la necesidad de presentarlos de la forma más atractiva posible (Moral, C., 1995, p. 25).

Esta práctica se ha empleado desde la época antigua; los egipcios utilizaban estos colorantes desde hace 3,500 años, un ejemplo de ello fue el uso del azafrán, colorante vegetal usado para darle color amarillo a los alimentos. El "candy" (colorante rojo dulce) fue introducido en Europa por Alejandro Magno, a su regreso de la India y el vino era coloreado con bayas de arándano (Moral, C., 1995, p. 25-26).

Hasta mediados del siglo XIX se usaban exclusivamente materias colorantes de origen natural, pero, a partir de este momento, se comenzaron a modificar artificialmente, cambiando por completo la industria y la economía de estos productos. Fue cuando se descubrieron las moléculas colorantes sintéticas: la primera fue la anilina, hallada en 1,826 por el químico alemán Unverdorben entre los productos de descomposición del índigo (Moral, C., 1995, p. 26). Esta molécula serviría como base para la creación de toda una serie de colorantes artificiales. El primero en explotar comercialmente estos colorantes fue William Perkin hacia 1,856, al descubrir la mauveína, obtenida por oxidación de la anilina impura (Lock, O., 1997, p. 1). Poco más tarde P. Griess descubrió la reacción de diazotización y de copulación, produciendo los colorantes azoicos, que marcaron una nueva era con los colorantes sintéticos. Esto ocasionó que para finales del siglo XIX, se produjera una depresión económica en la India y Japón, que eran los países que suministraban al mundo estos colorantes (Moral, C., 1995, p. 27).

En años recientes se ha renovado el interés en los colorantes naturales, debido a recientes limitaciones en el uso de algunos sintéticos en alimentos, medicamentos y en productos cosméticos (Lock, O., 1997, p. 2). Varios países han iniciado investigaciones que permitan brindar alternativas que sustituyan el uso de este tipo de colorantes, la fuente más explotada es el reino vegetal, debido a su fácil obtención y diversidad. Los compuestos que más se estudian son los

derivados de los flavonoides, carotenoides y taninos, ya que son los responsables de una amplia gama de coloraciones.

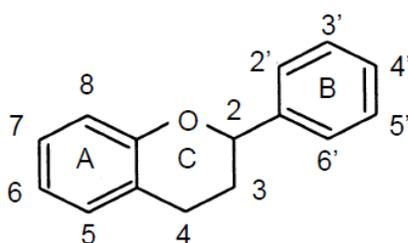
3.2.1 Flavonoides

Son un grupo de sustancias vegetales descubiertas en 1930 por el premio Nobel en Bioquímica Dr. Albert Szent-Gyorgi, quien las denominó como “Vitamina P”. Los flavonoides comprenden varias clases de sustancias naturales, entre las que están muchas de las que les confieren colores amarillo, naranja, rojo, violeta y azul, a muchas flores, hojas y frutos (Martínez, A., 2005, p. 5).

3.2.1.1 Estructura y color:

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpirano (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) y ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Martínez, F., et. al., 2002, p. 272).

Figura No. 1: Esqueleto común de los flavonoides.



Variaciones en el anillo C originan diferentes clases de flavonoides clasificados como: Chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, etc., (Martínez, A., 2005, p. 9). Sin embargo los de mayor interés son: flavanos, flavonoles, flavonas y antocianidinas.

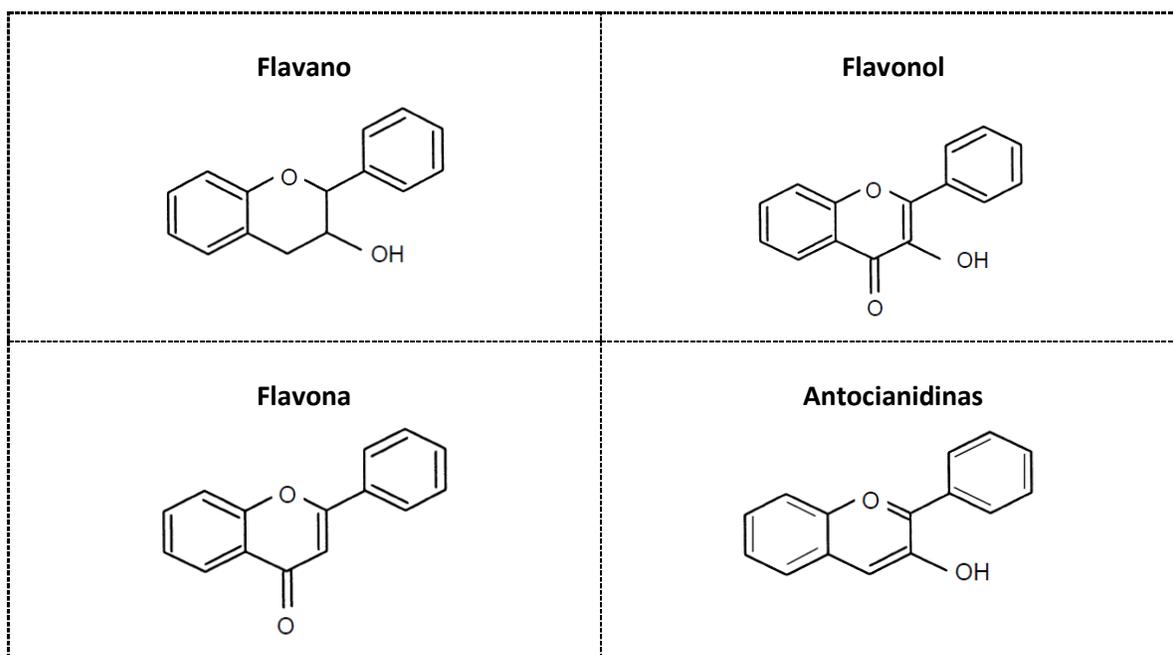
Flavanos: Con un grupo –OH en la posición 3 del anillo C.

Flavonoles: Con un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo –OH en la posición 3 del anillo C.

Flavonas: Con un grupo carbonilo en la posición 4 y carencia del grupo –OH en la posición 3 del anillo C.

Antocianidinas: Con un grupo –OH en la posición 3 y un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

Figura No. 2: Esqueletos de algunos flavonoides.



Tres características estructurales son importantes para su función: a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi; b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3; c) la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 (Martínez, F., et. al., 2002, p. 272).

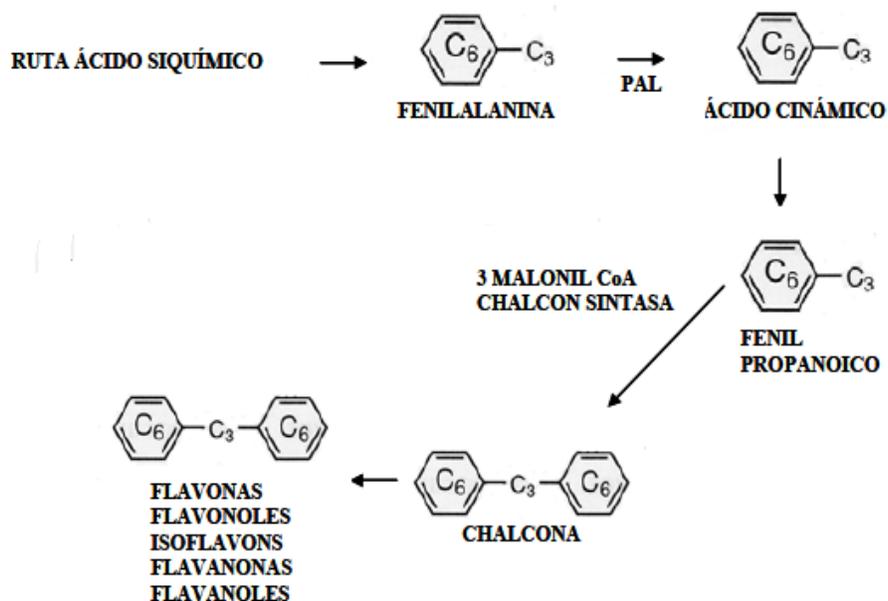
Dentro de las plantas, estas moléculas se encuentran la mayoría de las veces enlazadas a carbohidratos. A este tipo de combinación núcleo flavonoide básico + molécula o moléculas de carbohidratos, se les denomina glucósidos, y cuando no tienen ligadas moléculas de carbohidratos se le denomina agliconas flavonoides (Martínez, A., 2005, p. 11). El azúcar más común es la D-glucosa, pero también se han encontrado residuos de azúcares como D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico (Martínez, F., et. al., 2002, p. 272).

Las coloraciones que proporcionan dependen del tipo de flavonoide presente y su forma (libre, glicósido o sulfato), a manera general las flavonas, flavonoles y auronas, debido al sistema altamente conjugado en su estructura presentan coloraciones desde el color blanco al amarillo muy tenue, las antocianinas son compuestos que presentan un color rojo intenso, morado, violeta y azul, los citroflavonoides presentan un color amarillo verdoso (Martínez, A., 2005, p. 16).

3.2.1.2 Biosíntesis:

Los precursores de los flavonoides son bien conocidos. Se ha establecido experimentalmente que al anillo A de los flavonoides se sintetiza por la ruta del ácido malónico con la condensación de tres moléculas de malonil-CoA, mientras que el anillo B y la cadena C₃ se sintetiza por la ruta del ácido shikímico. El ácido shikímico da paso a la fenilalanina que por acción de una fenilalanina amonialiasa (PAL), y después de una pérdida de NH₃ se convierte en ácido p-coumárico. El p-coumaril-CoA luego participa en una reacción de condensación con las tres moléculas de malonil-CoA para formar una chalcona de 15 C, reacción propiciada por una chalcona sintetasa. Este compuesto intermedio de 15 C es transformado en una flavanona por una reacción catalizada por una chalcona isomerasa. Las chalconas y las flavanonas son los precursores de los demás tipos de flavonoides (Garzón, G., 2008, P. 29).

Figura No. 3: Ruta general de biosíntesis de los flavonoides.



3.2.1.3 Distribución, estado natural y función:

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas verdes (especialmente en las angiospermas), y sólo algunos pocos se han detectado en hongos y algas. Se han encontrado en las diferentes partes de las plantas, especialmente en las aéreas; se les encuentra en su forma libre (agliconas), como glicósidos (la mayoría de las veces), como sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros. De todas las formas de glicósidos los O-glicósidos son los más comunes de encontrar (Martínez, A., 2005, p. 15).

Los flavonoides poseen diferentes funciones en las plantas como son la atracción de polinizadores para la posterior dispersión de semillas y la protección de la planta contra los efectos de la radiación ultravioleta y contra la contaminación viral y microbiana (Martínez, A., 2005, p. 48).

3.2.1.4 Extracción y aislamiento:

Los flavonoides en general se extraen de muestras secas y molidas. La muestra se desengrasa inicialmente con éter de petróleo ó n-hexano, y el marco se extrae con

etanol puro o al 70%. Este último es el recomendado para garantizar la extracción de los más polares. El extracto obtenido se evapora con calentamiento no superior a los 50°C y se le hacen particiones sucesivas con éter etílico, acetato de etilo y n-butanol. Los flavonoides apolares quedan en la fase etérea. Los medianamente polares en la fase acetato de etilo y los más polares en el n-butanol. Cada una de estas tres fases se puede analizar por Cromatografía en Capa Fina (CCF) y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase reversa. Para el análisis por CCF de las agliconas se pueden utilizar mezclas n-hexano/acetato de etilo y cloroformo/acetato de etilo en diferentes proporciones, por ejemplo la mezcla cloroformo/acetato de etilo (60:40). Para el análisis de glicósidos flavonoides se puede usar una mezcla acetato de etilo/ácido fórmico/ácido acético/agua (100:11:11:27) (Martínez, A., 2005, p. 19).

Para el análisis por HPLC de los glicósidos pueden utilizarse columnas RP-18, detectando a 254 nm y eluyendo con mezclas ácido acético al 2% acuoso/acetonitrilo en diferentes proporciones. El ácido acético previene la formación de picos asimétricos en el cromatograma. Para el análisis cuantitativo por HPLC de las agliconas también se usan columnas RP-18, detección a 254 nm y elución con mezclas de acetonitrilo/agua con ácido acético al 1% (Martínez, A., 2005, p. 19).

3.2.1.5 Absorción y metabolismo:

Los compuestos flavonoides son absorbidos a nivel intestinal, antes de su absorción son escindidos, dando por resultado agliconas y azúcares. Las azúcares son absorbidas rápidamente por su alta solubilidad en agua, las agliconas por su baja solubilidad pueden tardar hasta 3 horas. En promedio la concentración pico de los flavonoides se alcanza a 1.75 horas después de su ingesta (Escamilla Ch., et. al., p. 74).

Después de su absorción se distribuyen homogéneamente en todos los tejidos corporales. Incluso logran atravesar la barrera hematoencefálica, permitiendo mayor paso a los flavonoides más lipofílicos (Escamilla Ch., et. al., p. 74).

Los flavonoides sufren metabolismo de primer paso y sus metabolitos son excretados por la bilis al duodeno, aunque se reabsorban, ya no tienen funcionalidad. La transformación de estos compuestos es intensa y tiene lugar en dos localizaciones:

En primer lugar en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o exponen grupos polares; en segundo lugar en el colon mediante reacciones de biotransformación de fase II, en la que los microorganismos degradan los flavonoides no absorbidas. Los conjugados, solubles en agua, pueden excretarse por la orina (Escamilla Ch., et. al., p. 74).

3.2.1.6 Actividad biológica de los flavonoides:

El interés de los flavonoides se ha intensificado en los últimos años debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos, los flavonoides permanecen intactos y ejercen efectos conocidos que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo. Los efectos terapéuticos de los flavonoides están relacionados con su actividad antioxidante. Recientemente se ha demostrado que los frutos ricos en estos compuestos evidencian una alta actividad antioxidante contra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y contra radicales peróxido ($ROO\cdot$), superóxido (O_2^-), hidroxilo ($\cdot OH$) y oxígeno singlete (1O_2) (Martínez, A., 2005, p. 38).

3.2.1.7 Toxicidad:

En la actualidad no se han descrito efectos tóxicos relacionados al consumo de grandes cantidades de flavonoides (Martínez, A., 2005, p. 41).

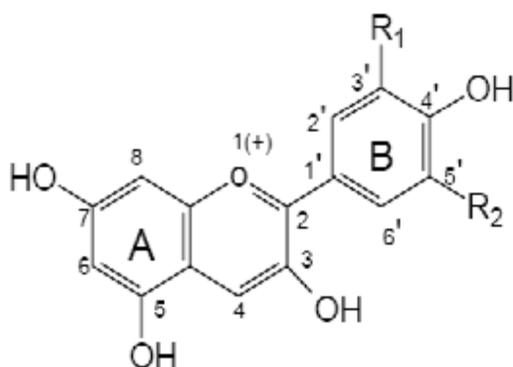
3.2.2 Antocianinas

El nombre de antocianina deriva del griego antho que significa flor y kyanos, que significa azul. Dicho término fue utilizado por Marquat en 1,835 para designar a los pigmentos azules de las flores. Más tarde se descubrió que no sólo el color azul, sino que también el púrpura, violeta, magenta, y que todos los tonos de rojo, rosado, escarlata, que aparecen en muchas flores, frutos y algunas hojas y raíces de plantas, se deben a pigmentos químicamente similares a las antocianinas de Marquat (Ugaz, O., 1997).

3.2.2.1 Estructura y color:

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 C. Variaciones estructurales del anillo B da por resultado a los diferentes tipos de antocianinas. En general existen más de 20 moléculas diferentes de estos compuestos y ayudan a determinar la taxonomía de los vegetales, siendo solo seis los de mayor interés (Garzón, G., 2008, p. 29).

Cuadro No 1: Estructura y Sustituyentes de las antocianinas.



Agliconas	Sustitución		$\lambda_{\text{máx}}$ Espectro Visible (nm)
	R ₁	R ₂	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH ₃	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH ₃	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	510 (azul-rojo)

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas (Garzón, G., 2008, p. 29).

En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, sofrorosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o p-hidroxibenzóico. Sustituciones glicosídicas en la posición 5 al igual que acilaciones aromáticas, producen un desplazamiento hacia las tonalidades púrpura (Garzón, G., 2008, p. 29).

3.2.2.2 Biosíntesis:

Proceden de la ruta general de biosíntesis de los flavonoides, se producen a partir de la flavanona producida por tal ruta, esta flavanona es transformada en la correspondiente antocianidina por una reacción de hidroxilación en el carbono 3 seguida por una deshidratación. La molécula de antocianidina se estabiliza por glicosilación del heterociclo; reacción en la que interviene una glicosil transferasa y posteriores posibles reacciones de metilación de los hidroxilos seguidas de acilaciones (Garzón, G., 2008, p. 30).

3.2.2.3 Distribución, estado natural y función:

Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano. Se encuentran distribuidas en las plantas verdes (especialmente en las angiospermas) como sales, principalmente en flores, frutos y tejidos (Martínez, A., 2005, p. 15).

Las antocianinas poseen diferentes funciones en las plantas como son la atracción de polinizadores para la posterior dispersión de semillas y la protección de la planta contra los efectos de la radiación ultravioleta y contra la contaminación viral y microbiana (Garzón, G., 2008, p. 28).

3.2.2.4 Extracción y aislamiento:

Las antocianinas son solubles en agua y alcoholes, insolubles en disolventes orgánicos apolares, inestables en medio neutro o alcalino. Clásicamente, la extracción se realiza con un alcohol (metanol; se prefiere etanol si el producto se destina a empleos alimenticios), al que se adiciona una pequeña cantidad (0.1-1%) de ácido clorhídrico. Para evitar la esterificación del carboxilo libre de los antocianósidos acilados por un diácido, y sobre todo, para impedir su desacilación, conviene utilizar preferentemente otros ácidos débiles (acético, tartárico, cítrico) o volátiles (trifluoroacético) o trabajar en medio neutro (mezcla de alcoholes) y operar a baja temperatura (<30°C). Las disoluciones de antocianósidos son muy inestables y no pueden ser conservadas más que en atmósfera inerte, en frío y al abrigo de la luz (Bruneton, J., 2001, p. 355).

Industrialmente, se pueden preparar extractos antociánicos por diversos procedimientos. El más antiguo consiste en una extracción en medio acuoso en presencia de dióxido de azufre seguida de la regeneración de los antocianósidos por acidificación. Entre los procedimientos más recientes se puede citar la ultrafiltración sobre membrana de celulosa y la fijación/elución sobre resinas cambiadoras de iones (Bruneton, J., 2001, p. 356).

Para separar los antocianósidos se recurre a las técnicas cromatográficas: columnas de poliamida y polivinilpirrolidona, resinas cambiadoras de iones, CCF preparativa sobre celulosa, CLAR semipreparativa (Bruneton, J., 2001, p. 356).

Por regla general, los antocianósidos se valoran por espectrofotometría. En las longitudes de onda de los máximos de absorción de estas moléculas, las interferencias son excepcionales: la valoración se puede realizar directamente sobre una disolución alcohólica ácida (forma catiónica) -o sobre un zumo acidificado-. Para evitar la autoasociación de las moléculas de antocianósidos (lo que tendría como consecuencia una desviación positiva de la ley de Lambert-Beer) conviene operar en medio muy diluido (Bruneton, J., 2001, p. 356).

3.2.2.5 Factores que influyen en el color y estabilidad de las antocianinas:

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen como posibles sustitutos de los colorantes artificiales, su incorporación a matrices alimenticias o productos farmacéuticos y cosméticos son limitadas debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento. Factores como su misma estructura química, pH, temperatura, presencia de oxígeno y ácido ascórbico, concentración y actividad de agua de la matriz determinan la estabilidad del pigmento (Garzón, G., 2008, p. 30).

Efecto del pH: El pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas. La acidez tiene un efecto protector sobre la molécula. En soluciones acuosas a valores de pH inferiores a dos, básicamente 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable o de ión oxonio o catión flavilio (AH^+) de color rojo intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2, dando

lugar a un equilibrio entre la pseudo base carbinol o hemicetal (B) y la forma chalcona (C), o de cadena abierta. Tanto el hemicetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a 7 se presentan las formas quinoidales (A , A^-) de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire (Hutchings, 1999).

Efecto de la temperatura: Incrementos de temperatura resultan en pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura del anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras (Garzón, G., 2008, p. 31).

Efecto del oxígeno y el ácido ascórbico: El efecto degradativo del oxígeno y el ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas está relacionado. En 1,953 se reportó que las condiciones que favorecen la oxidación aeróbica del ácido ascórbico en jugo de fresa y en sistemas modelo que contenían pelargo-nidina-3-glucósido proveniente de la fresa causaban grandes pérdidas de antocianinas, pero cuando el oxígeno era excluido del sistema no se observaba deterioro del color. De igual manera, se reportó un efecto sinérgico entre el ácido ascórbico y el oxígeno sobre la degradación de la pelargonidina-3-glucósido en solución. En investigaciones más recientes, se reportan la aceleración de la destrucción de antocianinas de fresa cuando el ácido ascórbico está presente tanto en sistemas naturales como en sistemas modelo. El efecto del ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas ha sido explicado, como una posible reacción de condensación entre el ácido y los pigmentos (Garzón, G., 2008, p. 31).

Otros factores: La concentración del pigmento y la actividad de agua de la matriz afectan la estabilidad del color. En 1,992 y 1,994, se demostró que cuando la concentración de antocianinas alcanza valores altos, se presentan fenómenos de autoasociación entre dos cationes flavilio, dos formas hemicetal, dos bases quinoidales, e inclusive, entre una base quinoidal y un catión flavilio y protegiendo la molécula de antocianina. Por otro lado, incrementos en la actividad de agua del medio causa degradación de las antocianinas probablemente debido a una mayor interacción entre el agua y el catión flavilio para formar la pseudobase inestable (Garzón, G., 2008, p. 31).

3.2.2.6 Absorción y metabolismo:

Los compuestos antocianicos son absorbidos fácilmente a nivel intestinal, su metabolismo es intenso y una parte importante se excreta por la orina. La transformación tiene lugar en dos localizaciones: En primer lugar en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o exponen grupos polares; en segundo lugar en el colon mediante reacciones de biotransformación de fase II, en las que los microorganismos degradan las antocianinas no absorbidas. La conjugación con el ácido glucurónico, sulfatos o glicina, parecen tener lugar tanto para las antocianinas como para sus metabolitos procedentes del colon. Los conjugados, solubles en agua, pueden excretarse por la orina (Martínez, F., et. al., 2002, p. 274).

3.2.2.7 Actividad biológica:

Es la misma que la de los flavonoides.

3.2.3 Taninos

Los taninos son polímeros polifenólicos producidos en las plantas como compuestos secundarios y que tienen la habilidad de formar complejos con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, alcaloides y saponinas, desempeñando en las plantas una acción defensiva frente a los insectos. Son astringentes (precipitan las proteínas) y curten la piel (Marroquín, A., 2008, p. 15).

3.2.3.1 Estructura y características:

Dado que estos compuestos se han investigado durante más de 100 años, se diseñaron diferentes clasificaciones de acuerdo con el nivel del conocimiento que de éstos se tenía en los diferentes periodos de tiempo. La clasificación de Freudenberg, que actualmente es empleada, tiene su fundamento en el tipo de estructura base del tanino, es así que los agrupa en dos grandes clases: taninos hidrolizables y taninos condensados (Marroquín, A., 2008, p. 23).

3.2.3.1.1 Taninos hidrolizables o pirogálicos:

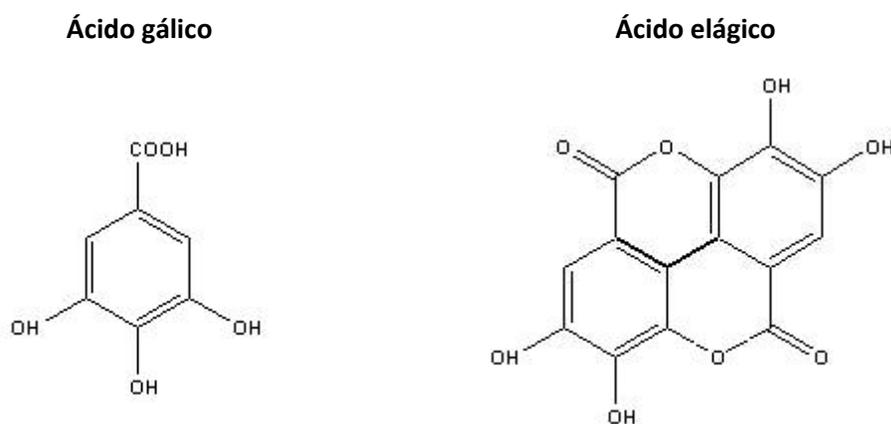
Los extractos tánicos hidrolizables o pirogálicos son aquellos que por hidrólisis en medio ácido y a ebullición forman productos solubles en agua. Su constitución está caracterizada por el hecho de que el núcleo bencénico está unido al segundo compuesto por intermedio de átomos de oxígeno (Marroquín, A., 2008, p. 23).

Depositán habitualmente ácido elágico (compuesto amarillento, cristalizado y poco soluble en agua) finamente dividido que forma eflorescencias en el cuero. Con sales de hierro dan coloración negro-azulada (Marroquín, A., 2008, p. 24).

Los extractos tánicos hidrolizables se pueden clasificar a su vez en dos grandes grupos:

- Aquellos que forman ácido gálico y glucosa a través de hidrólisis, llamados extractos gálicos.
- Aquellos que dan ácido elágico y glucosa, llamados extractos elágicos.

Figura No. 4: Estructura del ácido gálico y ácido elágico.



Características (Marroquín, A., 2008, p. 24):

- Se hidrolizan con facilidad por la acción de ácidos, bases o enzimas, en un azúcar, un polialcohol y un ácido fenolcarboxílico. Dependiendo del tipo de

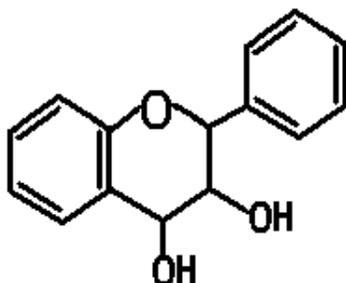
ácido que produce por la reacción se subdividen en: galotaninos (ácido gálico) y elagitaninos (ácido elágico o dilactona estable del ácido hexahidroxidifénico).

- Son generalmente de origen patológico.
- Los núcleos bencénicos están unidos por medio de átomos de oxígeno.
- Dan coloración azul con FeCl_3 .
- No precipitan con soluciones de Bromo.

3.2.3.1.2 Taninos no hidrosolubles o condensados:

Los extractos condensados o catequínicos son aquellos que en medio ácido y a ebullición forman precipitados. Sus núcleos constituyentes están reunidos entre sí con intervención de átomos de carbono. Se les llama catequínicos porque sometidos a destilación seca, casi todos dan pirocatequina. Los taninos condensados son polímeros del flavan-3,4-diol (Marroquín, A., 2008, p. 26).

Figura No. 5: Estructura del flavan-3,4-diol.



Características (Marroquín, A., 2008, p. 27):

- Son derivados de unidades de flavan-3,4-diol (leucoantocianidinas o proantocianidinas monómeras), conocidos actualmente también como proantocianidinas condensadas.
- Al ser tratados con ácidos en caliente, se origina una polimerización progresiva hasta dar taninos amorfos, llamados flobafenos o taninos rojos.
- En ellos, los núcleos bencénicos están unidos por átomos de carbono (por ejemplo C-4 a C-8, C-4 a C-6).
- Dan coloración verde con FeCl_3 .
- Precipitan con soluciones de bromo.

3.2.3.2 Biosíntesis:

La formación del tanino en el vegetal estaría ligada a la función clorofiliana (fenómenos de fotosíntesis dependientes de la luz solar, la clorofila y el dióxido de carbono). Se constata en efecto que las partes del vegetal expuestas al sol son las más ricas en taninos. Se admite que los taninos se formarían por una transformación de los sacáridos que producirían derivados cíclicos, los que sufrirían enseguida condensaciones y oxidaciones variables, pero cuyos detalles no son aún bien conocidos (Marroquín, A., 2008, p. 16).

3.2.3.3 Distribución y función:

Son un grupo de sustancias complejas que están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, se encuentran en casi todas las familias, las principales son Leguminosae, Rosaceae, Polygonaceae, Fagaceae, Rhyzophoraceae y Myrtaceae. Pueden encontrarse en todos los órganos o partes de las plantas, tallos, madera, hojas, semillas y cúpulas, pero con particular abundancia en las excreciones patológicas provocadas por ciertos insectos, conocidas comúnmente con el nombre de agallas; cuando se presentan en cantidades considerables. Es común que en las plantas herbáceas se presenten localizados en cantidad considerable en las raíces, disminuyendo mucho la concentración cuando se trata de plantas anuales. En las plantas leñosas, tanto la localización como la abundancia son variadas (Marroquín, A., 2008, p. 1).

Dentro de las funciones que desempeñan en la planta, se les atribuye: protector contra el ataque de insectos, bacterias y hongos; moderador de los procesos de oxidación y de acciones antifermentos; se les considera sustancias de reserva, y por otro lado, materiales de desecho (en el caso del suber externo, el leño y las agallas); otorga a algunas partes de las plantas resistencia a los fenómenos de putrefacción; son imprescindibles en la formación de sustancias vegetales, como aceites esenciales, resinas, lignina, etc. (Marroquín, A., 2008, p. 17).

3.2.3.4 Extracción y aislamiento:

Los taninos se extraen con solventes orgánicos como metanol, etanol y acetona; el solvente que ofrece mejores resultados de extracción es la mezcla de 70% de acetona y 30% de agua. Sin embargo, la acetona inhibe la interacción tanino-proteína, esto puede ser una limitación si se realizan ensayos de precipitación de proteínas. En muchas plantas, más del 50% de los taninos condensados no son extractables, estos taninos se encuentran adheridos a la fibra y a la proteína y no deben ser ignorados (Romero, C., 2000, p. 41).

Los taninos deben ser purificados de fenoles de bajo peso molecular (no taninos), de pigmentos y otras moléculas presentes en los extractos vegetales, la purificación es esencial para la preparación de los estándares y se realiza mediante la utilización de Sephadex LH-20 (Romero, C., 2000, p. 41).

3.2.3.5 Absorción y metabolismo:

Algunos son absorbidos desde el tracto digestivo produciendo efectos sistémicos, estos son metabolizados y tras convertirse en un nuevo compuesto glucuronidado, sulfatado o metilado son excretados en la orina y bilis. Otros, como los compuestos unidos a otras moléculas y polifenoles polimerizados, no son absorbidos en el intestino delgado y por tanto pasan al colon donde aumentarán el ambiente antioxidante o bien serán metabolizados por la microflora colónica y así serán al menos parcialmente absorbidos. Además, existe un metabolismo llamado eflujo que es producido por la glicoproteína-P del enterocito que hace que compuestos que han sido absorbidos puedan volver a pasar al lumen intestinal (Arranz, S., 2010, p. 12).

3.2.3.6 Actividad biológica:

- Cicatrizante:

La cicatrización se produce por la formación de las costras al unirse las proteínas con los taninos y crear un medio “seco” que impide el desarrollo de las bacterias (Marroquín, A., 2008, p. 18).

- **Hemostático:**

Al constreñir los vasos sanguíneos ayudan a la coagulación de la sangre y, por tanto, contribuyen a la curación de las heridas (Marroquín, A., 2008, p. 18).
- **Detención de la diarrea:**

Por su acción astringente (que contrae los tejidos y seca las secreciones) resultan eficaces en el tratamiento de la diarrea, contribuyendo a que el organismo pueda realizar deposiciones más secas (Marroquín, A., 2008, p. 19).
- **Antioxidantes:**

Los taninos se consideran antioxidantes por su capacidad para eliminar los radicales libres, previniendo la aparición de numerosas enfermedades degenerativas, entre ellas el cáncer (Marroquín, A., 2008).
- **Antibacterianas:**

La función antibacteriana de los taninos se produce fundamentalmente al privar a los microorganismos del medio apropiado para que puedan desarrollarse (Marroquín, A., 2008, p. 19).
- **Antídotos contra los venenos:**

La capacidad que tienen estos principios de inhibir la absorción de los alimentos en el tubo digestivo es aprovechada, en caso de ingestión de productos venenosos, para impedir que los venenos entren en la corriente sanguínea. El ácido tánico se utiliza como contra veneno para precipitar las sustancias venenosas de los alcaloides y ciertas sales metálicas (Marroquín, A., 2008, p. 20).
- **Colesterol:**

Reducen el colesterol al inhibir su absorción y expulsarlo a través de las heces. Se ha comprobado una reducción de los niveles de colesterol malo (LDL) y triglicéridos y un aumento de colesterol bueno (HDL) (Marroquín, A., 2008, p. 20).

3.2.3.7 Toxicidad:

Las plantas medicinales que contienen taninos, utilizadas medicinalmente en las proporciones adecuadas, proporcionan remedios adecuados para el tratamiento de muchas enfermedades. Sin embargo el uso inadecuado de plantas que contienen alto contenido de estos componentes resulta tóxico. Los taninos hidrolizables son los que mayor interés toxicológico encierran (Marroquín, A., 2008, p. 20).

3.3 Actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos

3.3.1 Radical libre:

Un radical libre es un átomo o grupo de átomos que contiene uno o varios electrones desapareados en un orbital externo, por lo cual constituye una molécula altamente inestable. Entre los radicales libres más importantes están los derivados del oxígeno: el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y el oxígeno singlete (1O_2). Estos compuestos reciben el nombre de especies reactivas del oxígeno (ROS) y cuando se forman cantidades significativas pueden dañar a las células del organismo (Marroquín, M., 2011, p. 5).

Las fuentes más comunes de generación de radicales libres son: la radiación (UV, rayos X, infrarrojo), el metabolismo, las sustancias químicas (fármacos, tabaco, alcohol, etc.) y las infecciones (bacterianas, víricas, etc.) (Marroquín, M., 2011, p. 6).

3.3.2 Agresión oxidativa:

Se denomina así al daño que pueden llegar a producir las especies reactivas del oxígeno cuando los mecanismos antioxidantes se desbordan. Las lesiones producidas es consecuencia principalmente de la inactivación enzimática, la despolimerización de polisacáridos, la degradación del DNA y la destrucción de membranas (Mckee, T. y Mckee, J., 2003, p. 319).

La agresión oxidativa se ha relacionado con el envejecimiento, el cáncer, enfermedades neurológicas y enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, infarto de miocardio e hipertensión, etc., (Mckee, T. y Mckee, J., 2003, p. 319).

3.3.3. Antioxidantes:

Son sustancias que inhiben la reacción de moléculas con los radicales de oxígeno, debido a que se oxidan más fácilmente que los átomos o moléculas que protegen. Para protegerse del daño que pueden producir las especies reactivas del oxígeno, el organismo ha desarrollado diversos mecanismos antioxidantes endógenos, además al introducir sustancias antioxidantes con la dieta diaria, pueden obtener una protección extra (Marroquín, M., 2011, p. 5).

Los antioxidantes pueden ser clasificados en dos amplios grupos, dependiendo de si son solubles en agua o en lípidos. En general los antioxidantes solubles en agua reaccionan con los oxidantes en el citoplasma celular y el plasma sanguíneo, mientras que los antioxidantes solubles en lípidos protegen las membranas de las células contra la peroxidación. Estos compuestos se encuentran en diferentes concentraciones en los fluidos corporales y tejidos. La glutatión peroxidasa o la ubiquinona presente mayoritariamente dentro de las células, mientras que otros como el ácido úrico se distribuyen más uniformemente a través del cuerpo (Marroquín, M., 2011, p. 5).

La protección proporcionada por cualquier antioxidante depende de su concentración, de su reactividad frente a la especie oxidante y del estado de los antioxidantes con los cuales interactúa (Marroquín, M., 2011, p. 5).

3.3.4 Sistemas enzimáticos antioxidantes:

Las principales defensas antioxidantes contra la agresión oxidativa son la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa (Abilés, J., 2007, p. 12).

Las superóxido dismutasa son la (SOD) son una clase de enzimas que catalizan la formación de H_2O_2 y O_2 a partir del radical superóxido (Abilés, J., 2007, p. 5) y (Mckee, T., y Mckee, J., 2003, p. 324).



Existen dos formas principales de SOD. En el ser humano, la isoenzima Cu-Zn se encuentra en el citoplasma. Una isoenzima que contiene Mn se encuentra en la matriz mitocondrial (Mckee, T., y Mckee, J., 2003, p. 324).

La glutatión peroxidasa, una enzima que contiene selenio, es un componente clave de un sistema enzimático que es el responsable principal del control de la concentración de peróxidos celulares. La glutatión peroxidasa transforma los peróxidos orgánicos en alcoholes (Mckee, T., y Mckee, J., 2003, p. 324).



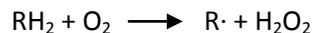
Varias enzimas ancestrales apoyan la función de la glutatión peroxidasa. El GSH se regenera a partir del GSSG por la glutatión reductasa:



La catalasa es una enzima que contiene hemo que utiliza el H_2O_2 , para oxidar otros sustratos (Mayor, R., 2010).



En los peroxisomas se encuentran cantidades abundantes de catalasa. En estos orgánulos se generan grandes cantidades de H_2O_2 como producto secundario en varias reacciones oxidativas:



Cuando el H_2O_2 se encuentra presente en cantidades excesivas, la catalasa lo convierte en agua:



3.3.5 Metabolitos con actividad antioxidante:

En las plantas existen una gran variedad de metabolitos secundarios que pueden actuar como antioxidantes, de los que se pueden mencionar:

3.3.5.1 Tocoferoles y tocotrienoles:

La vitamina E es el nombre dado a un grupo de tocoferoles y tocotrienoles relacionados entre sí. El α -tocoferol es el más estudiado del grupo, debido a que posee la mayor biodisponibilidad y es la que el cuerpo preferentemente absorbe y metaboliza. Debido a que es una molécula liposoluble protege la membrana de la célula contra la oxidación reaccionando con los radicales del lípido producidos en la reacción en cadena de peroxidación de lípidos. Esto elimina las formas intermedias de radicales libres y evita que la propagación de la reacción en cadena continúe. Las funciones de las otras formas de la vitamina E están menos estudiadas, aunque el γ -tocoferol es un nucleófilo que puede reaccionar con mutágenos electrofílicos y los tocotrienoles puede que tengan un rol especializado en la neuroprotección (Marroquín, M., 2011, p. 7).

3.3.5.2 Carotenoides:

Están entre los pigmentos naturales más comunes y han sido caracterizados hasta ahora más de 600 compuestos diferentes. Estos compuestos son los responsables por muchos de los colores rojos, amarillos y naranja de las hojas, flores y frutas de los vegetales, así como también por el color de algunos insectos, peces y crustáceos. Solamente pueden ser sintetizados por plantas, hongos, bacterias y algas, sin embargo muchos animales los incorporan a través de la dieta. Estos compuestos están involucrados en la eliminación de dos de las especies reactivas del oxígeno, el oxígeno singlete y el radical peroxilo. Además son efectivos desactivando moléculas excitadas electrónicamente las cuales están involucradas en la generación tanto de radicales como del oxígeno singlete (Marroquín, M., 2011, p. 7).

3.3.5.3 Ácido ascórbico:

Es un antioxidante eficaz, presente fundamentalmente como ascorbato, esta molécula hidrosoluble elimina varios ROS dentro de los compartimientos acuosos de las células y en lípidos extracelulares (Abilés, J., 2007, p. 18).

El ascorbato protege a las membranas mediante dos mecanismos: en primer lugar, el reacciona con los radicales peroxilo que se forman en el citoplasma antes de que puedan alcanzar la membrana, evitando de esta manera la peroxidación lipídica. En segundo lugar, el ascorbato potencia la actividad antioxidante de la vitamina E regenerando el α -tocoferol a partir del radical α -tocoferilo, luego se regenera el ascorbato por su reacción con el GSH (Abilés, J., 2007, p. 18).

3.3.5.4. Polifenoles:

Son metabolitos secundarios de origen vegetal, esenciales para el ser humano. Constituyen uno de los grupos de compuestos más numerosos que producen las plantas, con más de 8000 estructuras conocidas en la actualidad. Los polifenoles pueden ir desde moléculas simples (ácido fenólico, fenilpropanoides, flavonoides, etc.), hasta compuestos altamente polimerizados (ligninas, taninos). Los flavonoides representan el subgrupo más común y ampliamente distribuido en el reino vegetal, siendo parte integral de la dieta del hombre (Marroquín, M., 2011, p. 8).

Los polifenoles poseen una estructura química ideal para la actividad como consumidores de radicales libres. Su propiedad como antioxidantes, proviene de su gran reactividad como donadores de electrones e hidrógenos y de la capacidad del radical formado para estabilizar y deslocalizar el electrón desapareado y de su habilidad para quelar iones de metales de transición. Los polifenoles poseen una porción hidrofílica y una porción hidrofóbica. Su capacidad antioxidante está directamente relacionada con el grado de hidroxilación del compuesto. Los flavonoides tienen una poderosa acción antioxidante in vitro, siendo capaces de barrer un amplio rango de especies reactivas del oxígeno, nitrógeno y cloro, tales como el superóxido, el radical hidroxilo, el radical peroxilo, el ácido hipocloroso, actuando como agentes reductores. Además pueden quelar iones de metales de transición (Marroquín, M., 2011, p. 8).

3.4 Estudios realizados con anterioridad relacionados con el tema de investigación

3.4.1 Identificación y cuantificación de colorantes naturales en cinco especies vegetales nativas:

El objetivo de esta investigación fue caracterizar las propiedades colorantes y tintóreas de cinco especies nativas, la corteza de Palo de sangre (*Bocconia arborea* Wat), Nance (*Byrsonima crassifolia*) y Palo de pito (*Erythrina berteroana* Urban), rizoma de Zarzaparrilla (*Smilax domingensis* Willd.) y la hierba Pericón (*Tagetes lucida* Cav.). La metodología incluyó colecta, identificación botánica, extracción y caracterización fitoquímica, cuantificación de flavonoides y prueba de estabilidad comparando con aquellos utilizados por la industria como colorantes de cosméticos y tintes en fibras. En todos los extractos se observaron flavonoides y compuestos fenólicos, el extracto de *T. lucida* presentó el mayor porcentaje de flavonoides totales expresados en quercetina. Se demostró que los extractos de las cinco plantas nativas, son efectivas para ser utilizadas como tintes en textiles y colorantes en cosméticos. De acuerdo a los resultados de estabilidad los extractos de *B. arborea*, *T. lucida* y *E. berteroana* podrían utilizarse para colorear sistemas alimentarios o cosméticos a pH 3. El extracto de *S. domingensis* y *E. berteroana*, presentó el pH óptimo a 4. El extracto menos estable fue el *B. crassifolia* (Cruz, S., 2008, p. 78).

3.4.2 Caracterización, extracción y estabilidad de los colorantes naturales presentes en el cáliz de *Hibiscus sabdariffa* L. (Rosa de Jamaica) como alternativa de consumo del colorante artificial rojo No. 40:

Esta investigación pretendió realizar dos acciones fundamentales: a) identificar por medio de cromatografía en capa fina los pigmentos antociánicos característicos de la rosa de jamaica; b) realizar un estudio de estabilidad acelerada, comparando el comportamiento de la rosa de jamaica contra el colorante artificial rojo No. 40, sometidos a ciertas condiciones de temperatura (30 °C y 50°C) y pH (4, 5 y 6). Se midió la concentración diaria de cada una de las muestras usando espectrofotometría UV-Vis, de los datos obtenidos se dedujo que la muestra de rosa de jamaica expuesta a 50 °C y pH 6 disminuyó su concentración inicial hasta un 78% al día 17 de observación, las demás muestras mantuvieron su concentración por arriba del 80%. El modelo estadístico indicó que las condiciones óptimas de estabilidad para el colorante artificial rojo No. 40 son a 30 °C a cualquier pH y para la rosa de Jamaica es a 30 °C y pH de 5. El estudio permitió concluir que los colorantes presentes en la rosa de Jamaica presentan una estabilidad similar a la que tiene el colorante artificial rojo No. 40, por lo que puede ser utilizada como

alternativa de consumo tanto en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia (Arriaga, I., 2007, p. 61).

3.4.3 Estandarización de dos extractos del rizoma de la planta de Zarzaparrilla (*Smilax domingensis*), proveniente del departamento de Santa Rosa, para desarrollo fitofarmacéutico a nivel de laboratorio, utilizando la extracción por percolación de lecho estático con 24 horas de reposo:

En esta investigación se realizó la estandarización de un extracto fluido y un extracto seco del rizoma de *S. domingensis* por el método de percolación de lecho estático con 24 horas de reposo. Las extracciones fueron realizadas con etanol al 70 % y al final se concentraron hasta llegar a proporción 1:1 para el extracto fluido y 1:4 para el extracto seco. Habiendo elaborado de esta manera los extractos, se procedió a evaluar las propiedades fisicoquímicas, determinar la presencia de saponinas y flavonoides por el método de cromatografía en capa fina y al mismo tiempo cuantificar estos metabolitos por espectrofotometría UV-Vis. El análisis cromatográfico evidenció la presencia de saponinas y flavonoides del tipo quercetina, ácido clorogénico e hiperósido; no se evidenció presencia de rutina. La concentración de saponinas en el extracto fluido fue de $6.847E^{-2} \pm 2.14E^{-3}$ g/dl y para el extracto seco $1.55E^{-1} \pm 2.59E^{-3}$ g/dl; para la cuantificación de flavonoides totales el resultado se determinó en base a la quercetina, siendo para el extracto fluido 0.028 ± 0.001 y para el extracto seco 0.177 ± 0.009 . Se determinó que el extracto seco inhibe el crecimiento de la bacteria *E. coli* a una concentración de 1 mg/ml (Escobar, C., 2007, p. 136).

3.4.4 Caracterización y cuantificación de flavonoides y saponinas esteroidales en extractos de tres plantas mesoamericanas *Lippia graveolens* (Orégano), *Passiflora edulis* (Maracuyá) y *Smilax domingensis* (Zarzaparrilla):

El presente trabajo pretendió caracterizar y cuantificar los flavonoides y saponinas esteroidales presentes en los extractos etanólicos de las tres plantas de estudio. La caracterización se llevó a cabo mediante el uso de cromatografía en capa fina y la cuantificación mediante espectrofotometría en la región visible. El método usado para la cuantificación de saponinas fue el de la ecuación de la curva de calibración del estándar de diosgenina, y para los flavonoides el de flavonoides totales expresados en quercetina, los resultados obtenidos confirman la presencia de saponinas esteroidales y flavonoides

en la composición química de las tres especies de estudio, siendo respectivamente para *L. graveolens* 1.36% y 2.4343%, *P. edulis* 0.7059% y 0.2675% y *S. domingensis* 1.63% y 0.0871% (Teleguario, C., 2008, p. 61).

3.4.5 Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada:

En el presente estudio se analizaron muestras de jamaica importada (Sudán y China) y de México (Guerrero) para determinar el color de sus cálices en las bebidas preparadas con sus extractos, además del pH, acidez, perfil de antocianinas y la actividad antioxidante, a fin de encontrar si existen diferencias que pudieran repercutir en su apreciación comercial. Las soluciones preparadas con los extractos de Jamaica China y México presentaron una coloración rojo brillante, mientras la muestra de Sudán fue café-rojiza. La muestra de México mostró los porcentajes de acidez más altos y los valores más bajos de pH, en tanto que la Jamaica China tuvo la mayor concentración de antocianinas. Los extractos de las tres jamaicas presentaron el mismo perfil de antocianinas, obtenido mediante HPLC. De acuerdo con los parámetros de calidad determinados, la jamaica de México y China tienen mejor calidad que la de Sudán. El extracto de jamaica de México fue el que presentó la mayor actividad antioxidante, lo que podría ayudar a darle un valor agregado a la jamaica (*H. sabdariffa* L.) mexicana (Galicia, L., Salinas, Y., et. al., 2008, p. 121-129).

3.4.6 Propiedades antioxidantes de *Rhizophora mangle* y su relación con el proceso de curación de heridas en ratas:

El extracto acuoso de *Rhizophora mangle* y su fracción polifenólica mayoritaria fueron evaluados en un modelo de curación de heridas abiertas asépticas en ratas para la determinación de sus propiedades antioxidantes y su efecto sobre el balance redox durante el proceso de reparación de las heridas. La curación de las heridas fue evaluada al séptimo día mediante la medición del área de la herida (mm²) empleando el Sistema de Procesamiento Digital de Imágenes MADIP 3.0 Lab Lapdis del Hospital Carlos J. Finlay. El balance redox durante el proceso de reparación de las heridas se analizó mediante la determinación de los indicadores: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reducido y malonildialdehído en el nuevo tejido cicatricial a los 0, 3, 7 y 14 días de realizadas las heridas. Los resultados demostraron las propiedades antioxidantes *in vivo* del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* y que su fracción polifenólica mayoritaria constituyó el

principal determinante de dichos efectos. Además el tratamiento de heridas cutáneas con estas preparaciones redujo el área de las heridas ($p < 0,05$) y modificó el balance redox durante el proceso de reparación del tejido (Sánchez, J., et. al., 2009, p. 170-175).

3.4.7 *Hibiscus sabdariffa* L: Fuente de fibra antioxidante:

Fibra dietética y compuestos antioxidantes son dos conceptos que generalmente se utilizan por separado tanto en la industria como en nutrición. Actualmente el concepto de fibra se ha ampliado debido a que en los alimentos hay otros componentes diferentes a polisacáridos y lignina que no son digeridos en el intestino delgado y que pasan al intestino grueso constituyendo la mayor parte del substrato para la microbiota colónica. El concepto de *fibra antioxidante* se refiere a aquella materia prima con un elevado porcentaje de fibra dietética y cantidades apreciables de antioxidantes naturales asociados a la matriz del conjunto de compuestos no digeribles. Las flores de *Hibiscus sabdariffa* L, presentan en su composición un porcentaje importante de fibra dietética así como una elevada capacidad antioxidante. La infusión que se obtiene de la decocción de los cálices de *Hibiscus*, ha sido ampliamente estudiada debido a las propiedades saludables que se le confieren. En este trabajo se consideran los principales aspectos nutricionales de *Hibiscus sabdariffa* L y se plantea la posibilidad de estudiarlos como una posible fuente de fibra antioxidante, con propiedades funcionales de interés nutricional (Sáyago, S. y Goñi, I., 2010, p. 84).

Como se puede observar la gran mayoría de estudios generados a nivel nacional como internacional relacionados con el tema de investigación, se centran en la planta *Hibiscus sabdariffa*, a la que se le ha identificado los metabolitos responsables del color de los cálices y la concentración en que se encuentran, se han realizado estudios sobre la actividad antioxidante del extracto y sobre su estabilidad, así como la posibilidad de que el extracto sea usado como sustituto de colorantes artificiales. Los estudios disponibles sobre la planta *Smilax domingensis* son más limitados, habiéndose estudiado únicamente los metabolitos responsables del color del rizoma y la concentración en que se encuentran, su extracto ha sido evaluado como posible sustituto de colorantes sintéticos y como tintes en textiles. La planta menos estudiada es *Rhizophora mangle*, de la que no se encontró información sobre la concentración de los metabolitos responsables del color de la corteza, su actividad antioxidante o si pueden ser usados como sustitutos de colorantes sintéticos.

4. JUSTIFICACIÓN

Investigaciones recientes han proporcionado información acerca de los peligros y daños a la salud que los colorantes sintéticos pueden causar, sin embargo, el color es una de las características principales de que la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica se vale para darle estética a sus productos, por ello se ha empezado a usar como alternativa los colorantes naturales. Cuando un colorante es natural no requiere de certificaciones internacionales, tanto de la comunidad económica Europea y de la Administración de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos de los Estados Unidos (FDA), además los riesgos nocivos que presentan son casi nulos, por lo que pueden usarse ampliamente.

Este trabajo evaluó los colorantes presentes en rizoma de *Smilax domingensis* (Zarzaparrilla), cálices de *Hibiscus sabdariffa* (Rosa de Jamaica) y corteza de *Rizhophora mangle* (Mangle) para determinar su aplicación a la agroindustria. El diseño experimental permitió determinar la concentración de los colorantes extraídos y la actividad antioxidante que presentan. Para evaluar esos parámetros se procedió a obtener los extractos de las plantas de interés usando solventes apropiados, la cuantificación se llevó a cabo usando espectrofotometría y la evaluación de la actividad antioxidante se realizó usando el método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo) y el método ABTS (2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)). Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente y se evaluó si los mismos justificaban su aplicación a la actividad agroindustrial.

Con este trabajo se pretendió crear una nueva alternativa que pudiera sustituir a los colorantes sintéticos, proporcionando productos de alta calidad y seguros, así como fortalecer una de las áreas más importantes para el país como la agricultura, contribuyendo así a implementar un nuevo recurso económico.

5. OBJETIVOS

5.1. General:

Evaluar la capacidad colorante y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos del rizoma de *Smilax domingensis* (Zarzaparrilla), cálices de *Hibiscus sabdariffa* (Rosa de Jamaica) y corteza de *Rizhophora mangle* (Mangle) para determinar su aplicación agroindustrial.

5.2. Específicos:

5.2.1. Extraer los colorantes presentes en el rizoma de *Smilax domingensis* (Zarzaparrilla), cálices de *Hibiscus sabdariffa* (Rosa de Jamaica) y corteza de *Rizhophora mangle* (Mangle).

5.2.2. Cuantificar los metabolitos responsables de la capacidad colorante de los extractos obtenidos del rizoma de *Smilax domingensis* (Zarzaparrilla), cálices de *Hibiscus sabdariffa* (Rosa de Jamaica) y corteza de *Rizhophora mangle* (Mangle).

5.2.3. Evaluar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos del rizoma de *Smilax domingensis* (Zarzaparrilla), cálices de *Hibiscus sabdariffa* (Rosa de Jamaica) y corteza de *Rizhophora mangle* (Mangle).

5.2.4. Establecer la aplicabilidad de los extractos a la actividad agroindustrial.

6. HIPÓTESIS

Por lo menos uno de los extractos vegetales a ensayar presenta las características apropiadas para ser usado como sustituto de colorantes y antioxidantes sintéticos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Universo:

7.1.1. Población:

Especies vegetales que posean, dentro de su composición química, flavonoides, antocianinas, taninos, o aquellas usadas popularmente como colorantes.

7.1.2. Muestra:

Tres especies vegetales, Zarzaparrilla (*S. domingensis*) rizoma, Rosa de Jamaica (*H. sabdariffa*) cálices y Mangle (*R. mangle*) corteza.

7.2. Medios:

7.2.1. Recursos Humanos:

- a. Autores: Rudy Daniel Toc Noriega.
Elmer Geovany Oliva Palencia.
- b. Asesora: Licda. Sully Cruz.
- c. Revisora: Licda. Aylin Santizo.

7.2.2. Recursos Institucionales:

- a. Biblioteca Central de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- b. Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia -CEDOF- de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- c. Laboratorio del Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- d. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT).

7.3. Materiales:

7.3.1. Materiales y equipos:

- Agitador tipo Vortex
- Ampolla de decantación
- Balanza analítica
- Balanza de humedad
- Balanza semianalitica
- Baño de maría
- Bomba de vacio
- Campana extractora de gases
- Cápsulas de porcelana
- Cristalería en general
- Cromatoplaaca de silicagel 60 F₂₅₄
- Desecadora
- Espectrofotómetro
- Estufa
- Gradilla para tubo de ensayo
- Horno
- Molino de cuchillas
- Molino de martillos
- Papel filtro
- Percolador de acero inoxidable
- Plancha de calentamiento con agitación
- Secador de flujo transversal
- Sonificador
- Tamices

7.3.2. Reactivos:

- Acetato de Sodio
- Acetona
- Ácido Clorhídrico

- Ácido Acético Glacial
- Ácido Fosfórico
- Ácido Fosfomolibdico
- ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico))
- Butanol
- Etanol
- Estándar de Ácido Ascórbico
- Estándar de Ácido Clorogénico
- Estándar de Hiperósido
- Estándar de Quercetina
- Estándar de Rutina
- Estándar de Ácido tánico
- Estándar de α -Tocoferol
- DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo)
- Hexametilentetramida
- Hidróxido de Sodio
- Metanol
- Persulfato de Potasio
- Reactivos para fase móvil de las cromatografías en capa fina.
- Reactivos específicos para la determinación de metabolitos secundarios
- Sulfato de Sodio Anhidro
- Ter-butilhidroquinona (TBHQ)
- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)
- Tugstato de Sodio Dihidratado

7.4. Métodos:

7.4.1. Recolección:

La recolección se realizará en Suchitepéquez, para *S. domingensis*; Jutiapa, para *H. sabdariffa* y Santa Rosa, para *R. mangle*. Para la extracción se recolectará de cada especie aproximadamente 1.5 Kg de droga vegetal.

7.4.2. Tratamiento previo de las muestras:

7.4.2.1. Secado y molienda del rizoma de Zorzaparrilla y de la corteza del Mangle:

- Pesar la cantidad de droga por bolsa.
- Etiquetar las bandejas del secador de flujo transversal según la muestra a colocar y posteriormente pesarlas con la materia prima.
- Secar a una temperatura entre 40 a 45 °C.
- Realizar la prueba de humedad residual la cual debe variar entre 8 y 14%.
- Almacenar en bolsas identificadas y selladas totalmente.
- Moler la droga desecada en el molino de martillos, con el disco de mayor tamaño.
- Almacenar la materia molida en bolsas plásticas debidamente identificadas y selladas en su totalidad.
- Tamizar la droga en un tamiz No. 5 para disminuir el tamaño de partícula.
- Almacenar en bolsas herméticamente selladas para su posterior tratamiento (Marroquin, A., 2008, p. 152).

7.4.2.2. Secado y molienda de los cálices de Rosa de Jamaica:

- Pesar la cantidad de droga por bolsa.
- Etiquetar las bandejas del secador de flujo transversal con la muestra a desecar y posteriormente pesarlas con la materia prima.
- Secar a una temperatura de 40 °C.
- Realizar la prueba de humedad residual la cual debe ser menor al 10%.
- Almacenar en bolsas identificadas y selladas totalmente.
- Moler la droga desecada en un molino de cuchillas.
- Almacenar la materia molida en bolsas plásticas debidamente identificadas y selladas en su totalidad.
- Tamizar la droga en un tamiz No. 5 para disminuir el tamaño de partícula.
- Almacenar en bolsas herméticamente selladas para su posterior tratamiento (Arriaga, I., 2007, p. 19).

7.4.3. Extracción de los colorantes presentes en los cálices de Rosa de Jamaica y rizoma de Zarzaparrilla:

Someter a percolación 100 a 200 g de cada droga vegetal usando como disolvente extractor etanol y ácido clorhídrico 0.1N (proporción 85:15) en una relación 1:5 o 1:10 según sea el caso, dejar por 24 horas en reposo y posteriormente concentrar el disolvente extraído hasta obtener una consistencia grado miel, secar en desecador. Pesar el residuo y calcular el porcentaje de rendimiento de la extracción. Almacenar a 4 °C para su posterior análisis (Fuentes, W., 2005, p. 25).

Calculo del porcentaje de rendimiento de la extracción:

$$\% \text{ Rendimiento} = (\text{peso del extracto obtenido} / \text{peso original de la muestra}) * 100$$

7.4.3.1. Investigación de flavonoides y antocianinas en los extractos de Rosa de Jamaica y Zarzaparrilla:

- Ensayo macrométrico:

Disolver 0.4 g de extracto seco en 20 ml de metanol al 80%, filtrar y dividir en 6 tubos:

Tubo 1: Agregar 0.5 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Tubo 2: Agregar 3 a 5 gotas de cloruro férrico al 10% (p/v).

Tubo 3: Agregar 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño de maría por 5 minutos (prueba para leucoantocianinas).

Tubo 4: Agregar magnesio metálico y 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado.

Tubo 5: Agregar 10 gotas de NaOH.

Tubo 6: Testigo.

Evaluar las reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo. Desarrollo inmediato de color flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas

(amarillo); isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración (Marroquin, M., 2011, p. 28).

- Determinación de flavonoides por cromatografía en capa fina (TLC):

Disolver 0.1 g de extracto seco con 5 ml de metanol al 80%, filtrar. Aplicar 25-40 μ l en una cromatoplaca de silicagel 60 F₂₅₄; como estándares emplear soluciones de flavonoides al 0.05% en metanol (10 μ l) (Quercetina, Rutina, Ácido clorogénico e Hiperósido). Fase móvil: Acetato de etilo-acido fórmico-acido acético glacial-agua (100:11:11:27).

Detección:

Sin tratamiento químico: UV 254 nm fluorescencia, zonas azules o amarillas. UV 365 nm, dependiendo la estructura fluorescen amarillo, azul o verde.

Con tratamiento químico: Reactivo de productos naturales (NP/PEG). Para ello asperjar solución 1 y solución 2.

Solución 1: Solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina (NP).

Solución 2: Solución etanólica al 5% de polietilenglicol 4000 (PEG).

Aplicar a la placa vapores de amoniaco para intensificar el color de las manchas. Se produce intensa fluorescencia a 365 nm (Marroquin, M., 2011, p. 29).

- Determinación de antocianinas por cromatografía en capa fina (TLC):

Disolver 0.1 g de extracto de Rosa de Jamaica con 5 ml de metanol al 80% y acido clorhídrico al 25% (9:1), filtrar. Aplicar 15 μ l en una cromatoplaca de silicagel 60 F₂₅₄. Fase móvil: n-butanol-ácido acético glacial-agua (40:10:20).

Soluciones de referencia:

Azul de metileno: Disolver 5 mg en 10 ml de metanol al 80%, aplicar 5 μ l.

Amarillo naftol: Disolver 5 mg en 5 ml de metanol al 80 %, aplicar 5 μ l.

Rojo sudan: Disolver 5 mg en 5 ml de cloroformo, aplicar 5 μ l.

7.4.4. Cuantificación del colorante presente en el extracto de los cálices de Rosa de Jamaica por el método del pH diferencial:

Preparación de los buffer:

Buffer de cloruro de potasio 0.025 M/ácido clorhídrico pH 1:

Pesar 1.864 g de cloruro de potasio.

Mezclar con 980 ml de agua destilada usando agitador magnético.

Ajustar el pH a 1 con ácido clorhídrico concentrado.

Aforar a un litro con agua destilada.

Buffer de acetato de sodio 0.4 M/ácido clorhídrico pH 4.5

Pesar 32.812 g de acetato de sodio.

Mezclar con 980 ml de agua destilada usando agitador magnético.

Ajustar el pH a 4.5 con ácido clorhídrico concentrado.

Aforar a un litro con agua destilada.

Cuantificación del colorante:

Tomar 2 tubos de ensayo perfectamente limpios.

Agregar a un tubo 7 ml de buffer pH 1 y al otro 7 ml de buffer pH 4.5.

Anadir a cada tubo 200 μ l del extracto, cubrir con papel parafilm.

Agitar.

Hacer barrido espectrofotométrico en las longitudes de onda de 400 a 700 nm para cada tubo.

Tomar los valores de absorbancia para cada dilución a 520 nm (longitud de onda de máxima absorbancia de las antocianinas) y a 700 nm (lectura de grado de degradación del compuesto y lectura de corrección debido a sustancias interferentes).

Usar agua destilada como blanco.

Calcular la absorbancia final usando la siguiente ecuación:

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5}$$

Sustituir en esta ecuación:

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/L)} = (A/\epsilon * 1)(PM)(FD)(1000)$$

Donde:

A = Absorbancia corregida.

ϵ = Absortividad molar de la Cianidina-3-glucosido (26,900).

L = Longitud de la celda (1 cm).

PM = Antocianina mayoritaria en el extracto (Cianidina-3-glucosido = 449.2 g/mol).

FD = Factor de dilución (volumen total/volumen del extracto).

7.4.5. Cuantificación del colorante presente en el extracto de rizoma de Zarzaparrilla:

Disolución madre: En un balón de fondo redondo de 100 ml para reflujo poner 0.1 g de extracto seco, 1 ml de una disolución de 5 g/l de hexametilentetramina, 20 ml de acetona y 7 ml de ácido clorhídrico. Calentar a ebullición la mezcla a reflujo durante 30 min. Filtrar el líquido a través de algodón hidrófilo a un matraz de 100 ml. Añadir el algodón hidrófilo al residuo en el matraz de fondo redondo y extraer dos veces con 20 ml, cada vez, de acetona, calentando a ebullición a reflujo cada una de las veces durante 10 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente, filtrar el líquido a través de algodón hidrófilo y después filtrar las disoluciones de acetona reunidas a través de un papel de filtro a un matraz aforado y diluir hasta 100 ml con acetona lavando el matraz y el filtro. Poner 20 ml de la disolución en una ampolla de decantación, añadir 20 ml de agua y extraer la mezcla una vez con 15 ml y luego tres veces con 10 ml, cada vez, de acetato de etilo. Reunir los extractos de acetato de etilo en una ampolla de decantación, lavar dos veces con 50 ml, cada vez, de agua, filtrar el extracto sobre 10 g de sulfato de sodio anhidro a un matraz aforado de 50 ml y diluir hasta 50 ml con acetato de etilo.

Disolución problema: A 10 ml de la disolución madre añadir 1 ml de reactivo de cloruro de aluminio y diluir hasta 25 ml con una disolución al 5 % v/v de ácido acético glacial en metanol.

Disolución de compensación: Diluir 10 ml de la disolución madre hasta 25 ml con una disolución al 5 % v/v de ácido acético glacial en metanol.

Medir la absorbancia de la disolución problema después de 30 min, por comparación con la disolución de compensación a 425 nm (Real Farmacopea Española, 2002).

Calcular el contenido en porcentaje de flavonoides, calculado como hiperósido, a partir de la expresión:

Tomando la absorbancia específica del hiperósido como 500 nm.

A = absorbancia a 425 nm.

m = masa de la sustancia a examinar en gramos.

$$\frac{A * 1.25}{m}$$

7.4.6. Extracción del colorante presente en la corteza de Mangle:

Someter a percolación 100 a 200 g de droga vegetal usando como disolvente extractor etanol en una relación 1:5 o 1:10 según sea el caso, dejar por 24 horas en reposo. A la solución resultante agregar 15 gts de solución acuosa de NaCl al 10% (para precipitar compuestos no tánicos), y filtrar. Concentrar el disolvente extraído hasta obtener una consistencia grado miel, secar en desecador. Pesar el residuo y calcular el porcentaje de rendimiento de la extracción. Almacenar a 4 °C para su posterior análisis (Tezén, P., 2008, p. 23).

Calculo del porcentaje de rendimiento de la extracción:

$$\% \text{ Rendimiento} = (\text{peso del extracto obtenido} / \text{peso original de la muestra}) * 100$$

7.4.6.1. Investigación de taninos:

- Ensayo macrométrico:

Disolver 0.4 g de extracto en 20 ml de agua desmineralizada, repartir 3 ml de esta solución en cuatro tubos de ensayo y proceder así:

Tubo 1: Testigo.

Tubo 2: Agregar 4 a 5 gotas de solución de gelatina al 1% (p/v).

Tubo 3: Agregar 4 a 5 gotas de gelatina-sal (1% de gelatina + cloruro de sodio al 10%).

Tubo 4: Agregar 3 a 4 gotas de solución de cloruro férrico al 10 %.

Interpretación:

Tubo 2: Formación de precipitado indica presencia de taninos.

Tubo 3: Formación de un precipitado más definido indica presencia de taninos.

Tubo 4: Asumiendo la formación de precipitado en las pruebas anteriores, la aparición de una coloración verde-grisácea implica la presencia de taninos condensados, mientras que la aparición de una coloración azul-grisácea indica la presencia de taninos del tipo hidrolizables (Tezén, P., 2008, p. 21).

7.4.7. Cuantificación del colorante presente en el extracto de la corteza de Mangle:

Solución madre: Disolver 0.4 g del extracto seco en 500 ml de etanol al 50%, agitar por 30 min y posteriormente filtrar. Se transfieren 3 ml del filtrado a un matraz aforado de 50 ml y se diluye con agua destilada hasta enrase.

Preparar matraces aforados de 50 ml, los cuales contendrán:

Reactivos	Blanco	Patrón	Muestra
Solución madre	-	-	1.0 ml
Solución de referencia de ácido tánico	-	3.0 ml	-
Agua destilada	5.0 ml	2.0 ml	4.0 ml
Reactivo para taninos	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml
Se agita y se deja en reposo por 5 minutos			
Solución de carbonato de sodio al 20%	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

Se completa cada matraz con agua destilada hasta enrase, se mezclan bien y se lee cada uno a 700 nm.

Solución de referencia de ácido tánico: Se disuelven 25 mg de ácido tánico en 100 ml de agua destilada, de esta solución se toma 20 ml y se completa volumen hasta 100 ml.

Reactivo para taninos: 10 g de tungstato de sodio dihidratado, 0.2 g de ácido fosfomolibdico y 5 ml de ácido fosfórico al 85 % en 75 ml de agua destilada. Se refluxa 2 h y después se completa a 100 ml con agua destilada (Gutiérrez, Y., et. al., 2000, p. 51).

Se calcula el porcentaje de taninos usando la siguiente función:

$$X = \frac{A_m * P * 1000 * 100}{A_p * PM * (100 - p)}$$

Donde:

X: Contenido de taninos en el extracto (%).

P: Masa de la sustancia de referencia (g).

A_m: Absorbancia de la muestra (nm).

A_p: Absorbancia de la solución de referencia (nm).

PM: Masa de la droga (g).

p: Humedad de la droga (%).

7.4.8. Procedimiento para realizar cuantificación de colorante natural comparado con soluciones de concentración conocida de colorantes sintéticos:

Preparar un litro de cuatro soluciones amortiguadoras a pH de 3, 4, 5, 7 y un litro de solución de etanol/acido clorhídrico de la siguiente manera:

pH 3: Disolver en 500 ml de agua destilada 14.1327 g de Ftalato Ácido de Potasio con 7 ml de Ácido Clorhídrico 4.40 N y aforar a 1L.

pH 4: Disolver en 500 ml de agua destilada 20.3822 g de Ftalato Ácido de Potasio con 2 ml de Ácido Clorhídrico 0.10 N y aforar a 1L.

pH 5: Disolver en 500 ml de agua destilada 14.0714 g de Ftalato Ácido de Potasio con 10 ml de Hidróxido de Sodio 3.11 N y aforar a 1L.

pH 7: Disolver en 500 ml de agua destilada 6.8050 g de Fosfato Monobásico de Potasio con 145.5 ml de Hidróxido de Sodio 0.2 N y aforar a 1L.

Etanol/acido clorhídrico: A 500 ml de etanol al 95% adicionar 150 ml de acido clorhídrico 0.1 N y aforar a 1L.

A cinco balones aforados de 100 ml agregar 2 mililitros de la solución filtrada 1A, a cada uno enrazar utilizando diferentes soluciones buffer (pH 3, 4, 5, 7 y etanol/acido clorhídrico) rotular como 1A3, 1A4, 1A5, 1A6 y 1A7 respectivamente, determinar la longitud de máxima absorbancia en la región visible del espectro electromagnético en los distintos valores de pH

Repetir el procedimiento con las otras soluciones filtradas 2A y 3A.

Preparar soluciones de concentración 0.1g/L aproximadamente, de cada uno de los estándares (Rojo No. 40, Amarillo No. 5 y Amarillo No. 6) a pH 3, 4, 5, 7 y etanol/acido clorhídrico.

Determinar la longitud de máxima absorbancia en la región visible del espectro electromagnético para cada una de las soluciones de colorantes artificiales a diferentes pH.

Comparar la longitud de máxima absorbancia de las diferentes muestras con la longitud de máxima absorbancia de los diferentes estándares a distintos valores de pH. Considerar para el resto del trabajo solo aquellas muestras en las que la longitud de máxima absorbancia en la región visible del espectro electromagnético (a un pH determinado) coincida con la de algún colorante artificial a los mismos valores de pH.

Elaborar una curva de calibrado entre 1ppm y 10ppm para el colorante artificial Rojo No. 40, utilizando el buffer en el cual la longitud de máxima absorbancia sea igual, tanto para la muestra como para el estándar y realizar la lectura de absorbancia de las diferentes muestras, a ese valor de longitud de onda, para obtener un equivalente de concentración de los colorantes naturales en función del colorante artificial (1g de la especie vegetal equivale a X mg de Rojo No. 2).

Cálculos para la determinación de la cantidad total de colorante natural expresado en términos de equivalentes de colorante sintético:

Para determinar la cantidad de colorante natural expresado en términos de mg de colorante sintético por gramo de las especies vegetales a pH 4 se utiliza la siguiente fórmula:

$$Y = \text{Con} * \text{VD} * \text{VTE} / (\text{ME}_{\text{pH}} * \text{CF})$$

Y: mg de colorante sintético/g de la droga vegetal.

Con: Concentración (g/L) de colorante sintético obtenido al despejar concentración de la ecuación de la Curva de Calibración.

VD: Volumen final de la solución 1A4 (ml) solución preparada para medir la absorbancia.

VTE: Volumen final de la solución 1A (ml).

ME_{pH}: Volumen de muestra del extracto 1A que fue diluida en la solución buffer a pH 4, solución 1A4 (ml).

CF: Cantidad de especie vegetal utilizada (g).

7.4.9. Procedimiento para evaluar la estabilidad de los colorantes naturales:

Evaluar la estabilidad de los colorantes presentes en cada una de las diferentes muestras, a los valores de pH (3, 4, 5, 7 y etanol/acido clorhídrico) donde las muestras presenten el mismo valor de longitud de máxima absorbancia en la región visible del espectro electromagnético que alguno de los estándares (Rojo No. 40, Amarillo No. 5 y Amarillo No. 6) y a 40 °C, para mantener las muestras a esta temperatura colocar en una incubadora calibrada para mantener dicha temperatura; la incubadora permanece conectada durante todo el tiempo que dure la parte experimental. Las muestras se monitorean frecuentemente.

Leer las muestras a la longitud de onda de máxima absorbancia determinada anteriormente, para cada muestra a un valor específico de pH y temperatura.

Llevar tres tubos simultáneos conteniendo la misma muestra (Zarzaparrilla, Rosa de Jamaica y Mangle) realizar el seguimiento cada día hasta que la absorbancia de una de las muestras baje alrededor del 80% del valor inicial.

El procedimiento que se indica a continuación se realiza para cada muestra que cumpla con las condiciones mencionadas anteriormente.

Agregar 20 ml de solución amortiguadora pH 3 a 6 tubos de 30 ml e identificar 3 como T1-pH1 y 3 como T2-pH1.

Agregar 20 ml de solución amortiguadora pH 4 a 6 tubos de 30 ml e identificar 3 como T1-pH2 y 3 como T2-pH2.

Agregar 20 ml de solución amortiguadora pH 5 a 6 tubos de 30 ml e identificar 3 como T1-pH3 y 3 como T2-pH3.

Agregar 20 ml de solución amortiguadora pH 7 a 6 tubos de 30 ml e identificar 3 como T1-pH4 y 3 como T2-pH4.

Agregar 20 ml de solución de etanol/acido clorhídrico a 6 tubos de 30 ml e identificar 3 como T1-ETA y 3 como T2-ETA.

Agregar una cantidad de extracto de cada muestra para que brinden un valor de absorbancia entre 0.4 y 0.6 unidades en la región visible del espectro electromagnético. Realizar las determinaciones para cada tubo cada día como se indicó al inicio.

Cálculos para determinar la estabilidad de los colorantes:

$Ab = a * \ln(t) + b$; donde Ab es absorbancia, t es el tiempo, a y b son las constantes.

Para poder comparar las diferentes muestras entre sí, se procede a calcular la primera derivada de cada una de las ecuaciones, así se determina el cambio de la absorbancia respecto al tiempo; es decir, la estabilidad que presenta cada extracto.

7.4.10. Prueba de tinción en fibras y prueba de coloración en cosméticos:

7.4.10.1 Técnica de tinción en lana (Lock, 1997):

Preparar una solución al 1% de extracto en etanol al 85%.

Lavar la lana con agua caliente, seguidamente enjuagar con agua fría y lavar con jabón, dejar remojando con agua fría toda la noche para limpiar bien la lana.

- Técnica de tinción en frío:
Sumergir 0.5 g de lana en 25 ml de la solución al 1% del extracto y dejar reposar durante 10 horas.
- Técnica de tinción en caliente:
Sumergir 0.5 g de la lana en 50 ml de la solución al 1% del extracto y calentar hasta ebullición durante 30 minutos y dejar reposar durante 10 horas.
- Técnica de tinción usando mordiente:
Preparar una solución con mordiente 0.5 g de de sulfato de aluminio en 50 ml de agua. Sumergir la lana en la solución y calentar durante 1 hora, agregar 25 ml de la

solución del extracto y calentar a ebullición durante 1 hora, dejar reposar por 10 horas.

7.4.10.2 Técnica de coloración en cosméticos:

Fórmulas de los cosméticos utilizados:

- Gel:

Carbopol	5%
Trietanolamina	1%
Parabenos (preservantes)	2%
Agua c.s.p.	100%

Procedimiento:

Disolver el carbopol en agua, con agitación constante hasta que se encuentre solución transparente.

Agregar los preservantes y agitar.

Agregar la trietanolamina para obtener la viscosidad deseada.

- Shampoo:

Lauril sulfato de sodio (texapon)	8%
Amida de coco	4%
Cloruro de sodio (sal)	0.75%
Parabenos (preservantes)	2%
Agua c.s.p.	100%

Procedimiento:

Disolver el lauril sulfato de sodio y la amida de coco en agua, con agitación constante hasta que se encuentre solución transparente.

Agregar los preservantes y agitar.

Agregar el cloruro de sodio y mezclar para obtener la viscosidad deseada.

- Loción:

Alcohol etílico al 70%	40%
Propilenglicol	3%
Glicerina	3%
Agua c.s.p.	100%

Procedimiento:

Mezclar todas las materias primas con agitación constante hasta que se encuentre solución transparente.

- Procedimiento de coloración de los cosméticos:

De los cosméticos base se colocaran 50 ml en un vaso de precipitar de 100 ml y se adicionaran 5 ml de cada extracto a las diferentes concentraciones y posteriormente se realizaran las comparaciones visuales con el pantone. Se monitoreara la estabilidad de los colorantes por un lapso de un mes.

7.4.11. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de estudio:

7.4.11.1 Determinación de la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina:

- Aplicar 10 μ l muestra y 5 μ l del estándar antioxidante terc-butil-hidroquinona (TBHQ), rutina, quercetina, vitamina C, vitamina E y Trolox en la cromatoplaca de silicagel 60F₂₅₄.
- Colocar la placa en la cámara de vidrio saturada previamente con acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:26).
- Secar y asperjar con 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (1mg/1ml de metanol).
- Detección: Si los extractos presentan actividad antioxidante se observa decoloración del DPPH en las bandas correspondientes.

7.4.11.2 Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo):

Preparación de la solución madre: Pesar 0.1g de extracto seco y agregar 5 ml de metanol absoluto, introducirlo en el sonicador por 30 minutos, para obtener la solución madre. De esta solución madre preparar una serie de diluciones:

No. Tubo	Extracto	Metanol	Dilución
1	1	4	0.2
2	2	3	0.4
3	3	2	0.6
4	4	1	0.8
5	5	0	1.0

De estas disoluciones se encontrará el porcentaje de inhibición (debe estar entre 60-70%).

A. *Solución de 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) 500 μ M en metanol:* Pesar 0.0219g de reactivo de DPPH y disolver con metanol hasta un volumen de 100 ml en un balón aforado. Agitar la solución y conservar en un recipiente ámbar (solución inestable), se recomienda preparar la solución el mismo día que se va a emplear, preparando únicamente lo necesario.

B. *Buffer de acetato:* Pesar 5.98 g de acetato de sodio, disolver con agua destilada y trasvasar a un balón de 1000 ml; antes de aforar adicionar 3ml de ácido acético glacial. Aforar con agua destilada y agitar. El buffer tendrá un pH de 5.5.

C. *Preparación de los tubos de reacción:* Utilizar tubos de vidrio con capacidad de 10 ml, de preferencia nuevos. En caso de no contar con tubos nuevos, emplear tubos que se hayan lavado correctamente, agregando agua desmineralizada después de su lavado para evitar que interfieran sustancias contenidas en el agua de chorro. Recubrir los tubos completamente con papel aluminio para proteger la reacción de la luz. Preparar una serie de tubos que contiene los reactivos que se citan a continuación:

Reactivo	Blanco Control	Control	Blanco de ensayo	Ensayo*
Buffer de acetatos	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Metanol	2 ml	1.5 ml	1.9 ml	1.4 ml
Solución de DPPH	-----	0.5 ml	-----	0.5 ml
Dilución de cada muestra	-----	-----	0.1 ml	0.1 ml

* Cada tubo de ensayo de cada dilución de muestra se prepara por triplicado.

Agitar los tubos preparados de esta forma en un vortex durante 30 segundos y luego incubar a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 30 minutos. Leer a una longitud de onda de 517 nm. Siempre debe leerse la absorbancia del control y del ensayo vrs el blanco respectivo (Marroquin, M., 2011, p. 23).

D. Registro de los resultados y cálculo del porcentaje de inhibición de la absorbancia.

Para calcular el porcentaje de inhibición de la concentración se emplea la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia de la dilución}}{\text{Absorbancia del control}} * 100 = \% \text{ de inhibición}$$

Luego graficar la concentración del extracto (eje X) vrs porcentaje de absorbancia (eje Y). Determinar la ecuación de la recta y el r^2 el cual se debe encontrar entre 0.97-0.99.

Expresar la actividad antioxidante en términos de la concentración de inhibición al 50% (CI_{50}), que es la concentración del extracto requerida para dar un 50% de disminución de absorbancia de DPPH. Para ello se emplea la ecuación de la recta, quedando la formula de la siguiente manera:

$$CI_{50} = (50 - \text{pendiente}) / \text{intercepto}$$

7.4.11.3 Determinación de la actividad antioxidante por el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido 2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS):

A. *Preparación de solución madre:* Pesar 0.1 g de extracto seco y agregar 5ml de metanol absoluto, luego introducirlo en el sonicador por 30 minutos, para obtener la solución madre. De esta solución madre preparar una serie de diluciones:

No. Tubo	Extracto	Metanol	Dilución
1	1	4	0.2
2	2	3	0.4
3	3	2	0.6
4	4	1	0.8
5	5	0	1.0

De estas disoluciones se encontrará el porcentaje de inhibición (debe estar entre 60-70%, con un r^2 de 0.97-0.99).

B. *Preparación de estándares:*

1. Trolox 2.5 mM, se prepara en etanol, emplear diluciones de 0-15 μ M.
2. Vitamina C: Pesar 0.1g y diluir con 5 ml de metanol, preparar diluciones de 0.03-0.04-0.05-0.06-0.07/5 ml.
3. Vitamina E: Pesar 10mg y diluir con 5ml de metanol, preparar diluciones de 0.8-0.9-1-1.1-1.2/5 ml.
4. Rutina: Pesar 40mg y diluir en 20ml de metanol, preparar diluciones de 2-2.5-3-3.5-4/5 ml.
5. Quercetina: Pesar 10mg y diluir con 5ml de etanol, preparar diluciones de 0.2-0.25-0.3-0.35-0.4/5 ml.
6. Ter-butilhidroquinona (TBHQ): Pesar 10mg y diluir con 5ml de etanol, preparar diluciones de 0.4-0.5-0.6-0.7-0.8/5 ml.

C. *Solución de 2,2`-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS.+) 7mM en agua:* Para preparar 10 ml pesar 38.41mg y diluir con agua hasta 10 ml.

D. *Solución de persulfato de potasio 2.45mM en agua:* Para preparar 5ml pesar 3.31mg y diluir con agua hasta 5ml.

E. *Formación del catión (ABTS⁺):* Se produce por la reacción de la solución stock de ABTS con persulfato de potasio 2.45mM, en una proporción 2:1; y dejando la mezcla en un lugar oscuro por al menos 16-18 horas a temperatura ambiente antes de su uso. Se prepara un día antes de realizar la prueba.

F. *Preparación de la solución de uso:* La solución ABTS⁺ es diluida con etanol hasta lograr una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 734 nm y equilibrado a 30°C. Se emplea una dilución 1/30 a 1/35 para obtener dicha absorbancia.

G. *Preparación de los tubos de reacción:* Utilizar tubos de vidrio con capacidad de 10 ml, de preferencia nuevos. En caso de no contar con tubos nuevos, emplear tubos que se hayan lavado correctamente, agregando agua desmineralizada después de su lavado para evitar que interfieran sustancias contenidas en el agua de chorro. Recubrir los tubos completamente con papel aluminio para proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar la vitamina C. Preparar una serie de tubos que contiene los reactivos que se citan a continuación:

Reactivo	Control	Ensayo*
Solución de ABTS ⁺	3 ml	3 ml
Dilución de cada muestra	-----	30 μ l

* Cada tubo de ensayo de cada dilución de muestra se prepara por triplicado. El blanco de la corrida es etanol al 95%. Tanto la solución de ABTS⁺ como la muestra deben haber estado en la incubadora a 30 °C mínimo 30 minutos antes de mezclarlos.

La lectura de la absorbancia se toma a 30 °C exactamente un minuto después de la mezcla inicial, al cuarto minuto y al minuto seis (Marroquin, M., 2011, p. 25).

Para calcular el porcentaje de inhibición de la concentración se emplea la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia de la dilución}}{\text{Absorbancia del control}} * 100 = \% \text{ de inhibición}$$

Luego graficar la concentración del extracto (eje X) vrs porcentaje de absorbancia (eje Y). Determinar la ecuación de la recta y el r^2 el cual se debe encontrar entre 0.97-0.99.

Expresar la actividad antioxidante en términos de la concentración de inhibición al 50% (CI_{50}), que es la concentración del extracto requerida para dar un 50% de disminución de absorbancia de ABTS. Para ello se emplea la ecuación de la recta, quedando la formula de la siguiente manera:

$$CI_{50} = (50 - \text{pendiente}) / \text{intercepto}$$

La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) de un extracto representa la concentración de solución de Trolox que tiene la misma capacidad antioxidante que el extracto. Los valores de TEAC se determinan como sigue:

$$\Delta A_{\text{trolox}} = (A_{T=0 \text{ Trolox}} - A_{T=6 \text{ Trolox}}) - \Delta A_{\text{solvente}(0-6 \text{ min})}$$

$$\Delta A_{\text{trolox}} = m \cdot [\text{Trolox}]$$

$$TEAC_{\text{extracto}} = (\Delta A_{\text{extracto}} / m) \cdot d$$

Donde ΔA = reducción de la absorbancia, A = absorbancia al tiempo dado, m = pendiente de la curva estándar, $[\text{Trolox}]$ = concentración de trolox, d = factor de dilución.

7.5. Diseño de la investigación:

Se realizará un estudio de tipo descriptivo.

7.6. Diseño estadístico:

Las muestras se colectaron en el lugar de mayor distribución de cada especie, identificando para cada una de ellas, el lugar de colecta.

En este tipo de estudios, donde no existen datos numéricos confiables con respecto de la cantidad de colorantes y actividad antioxidante; el tamaño de la muestra es igual al nivel de confianza elevada al cuadrado; siendo que el nivel de confianza es igual a Z (1.64), por lo que fue necesario efectuar como mínimo tres replicas para obtener un nivel de confianza del 90%.

Por conveniencia para cada extracto se realizaron las pruebas cualitativas de coloración y cromatografía en capa fina para la determinación de flavonoides, antocianinas, taninos, y determinación de la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina, haciéndose un análisis descriptivo. Se realizaron 5 réplicas de cada extracto obtenido de cada especie de los siguientes ensayos: Cuantificación de antocianinas, cuantificación de flavonoides y cuantificación de taninos; la determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS se aplicó a 3 réplicas de cada extracto (por conveniencia), los resultados arrojados fueron analizados usando media aritmética y desviación estándar. Así mismo se hizo una comparación descriptiva entre los resultados, comparando los valores de CI_{50} de cada extracto en su actividad antioxidante por DPPH y ABTS; además se comparó la actividad antioxidante equivalente a Trolox de cada extracto haciéndose un análisis descriptivo.

Para el estudio de estabilidad, se sometió a cada extracto de estudio a diferente medio (pH) y a una temperatura específica (40°C) durante un lapso de tiempo en días hasta que la concentración inicial disminuyó o aumentó en un 20%. Los datos generados fueron expresados usando graficas de líneas que indican el grado de desviación de cada punto y permiten observar la relación existente entre las diferentes variables. Para el cálculo de los equivalentes de concentración respecto a un colorante artificial, se realizó respecto a la lectura inicial tomada en el estudio de estabilidad y se expresó usando tablas de interacción que permiten observar la concentración equivalente en cada extracto a un pH dado.

Para las pruebas de coloración y tinción se indicaron los colores obtenidos de acuerdo a una comparación con estándares universales mediante visualización con un pantone.

8. RESULTADOS

8.1. Obtención del material vegetal: En el cuadro 1 se puede observar la procedencia del material vegetal y la parte de la planta utilizada para la obtención de los extractos usados en los diferentes ensayos programados.

Cuadro 1: Recolección del material vegetal

Nombre científico	Nombre común	Parte de la planta recolectada	Cantidad de materia vegetal recolectada	Procedencia
<i>Smilax domingensis</i>	Zarzaparrilla	Rizoma	1.5 Kg	Finca Bulbuxyá Suchitepéquez
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Rosa de Jamaica	Cálices	1.5 Kg	Jutiapa
<i>Rizophora mangle</i>	Mangle	Corteza	1.5 Kg	Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico (RNUMM), Santa Rosa

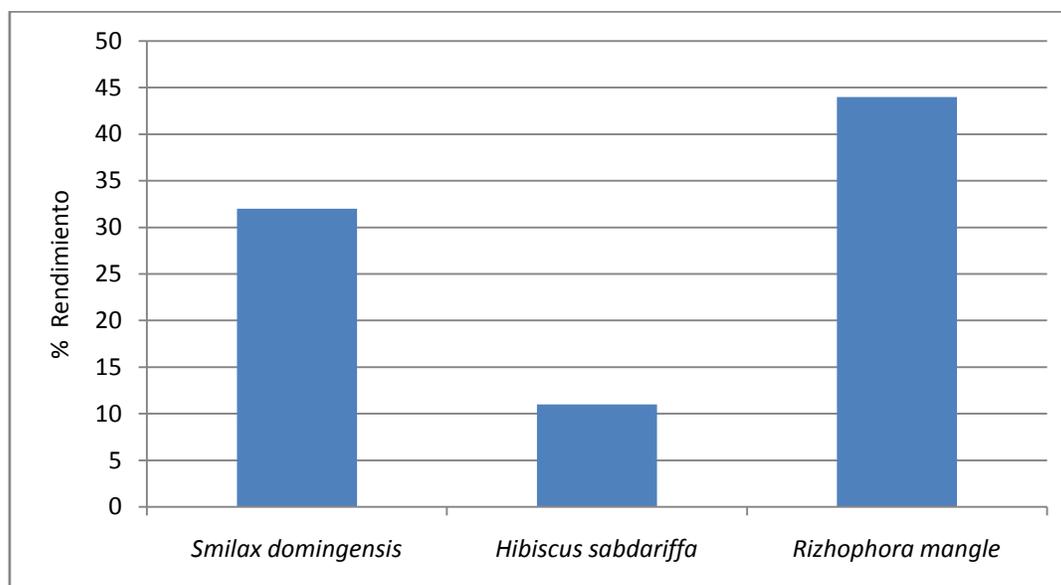
Fuente: Datos experimentales.

8.2. Obtención de los extractos por medio de percolación y concentración por rotavapor: En el cuadro 2 se puede observar la cantidad del material vegetal empleada para la obtención de cada extracto, cantidad de solvente, porcentaje de rendimiento y humedad del extracto final. En el grafico 1 se puede visualizar el rendimiento de cada extracto, observándose una comparación entre cada especie.

Cuadro 2: Proceso de extracción por percolación y concentración por rotavapor

Nombre Científico	Material vegetal (g)	Humedad del material vegetal (%)	Cantidad de solvente (L)	Extracto seco (g)	Rendimiento de extracción (%)	Humedad del extracto seco (%)
<i>Smilax domingensis</i>	200	8.30	2 Etanol al 70%	64.00	32.00	13.41
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	200	7.50	2 Etanol al 20%	21.54	11.00	5.29
<i>Rizhophora mangle</i>	200	9.68	2 Etanol al 70%	87.94	44.00	28.05

Fuente: Datos experimentales. Ver foto de percolador y rotavapor en Anexo 2.

Gráfico 1: Porcentaje de rendimiento de los extractos de las especies de estudio

Fuente: Datos experimentales.

8.3. Determinación de flavonoides: Se demostró la presencia de flavonoides en los extractos etanólicos de Zarzaparrilla y Rosa de Jamaica, mediante pruebas cualitativas de ensayo macrométrico (ácido sulfúrico, cloruro férrico, ácido clorhídrico + calor, magnesio + ácido clorhídrico, ácido bórico en anhídrido acético), dando en todos los casos positivo para este grupo de metabolitos (ver tabla de resultado y fotografía en anexo 3). En el cuadro 3 se presenta la determinación de flavonoides por cromatografía en capa fina (TLC), de los extractos anteriormente mencionados.

Cuadro 3: Determinación de flavonoides por Cromatografía en Capa Fina en extractos de Zarzaparrilla y Rosa de Jamaica

Muestra	Rf	Resultado
<i>S. domingensis</i>	0.27	Positivo
	0.40	
	0.97	
<i>H. sabdariffa</i>	0.26	Positivo
	0.41	
Quercetina	0.71	
Rutina	0.26	
Ácido clorogénico	0.37	
Ácido caféico	0.94	

Fuente: Datos experimentales. Fase móvil: Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, agua (100:11:11:27).

Detección: Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG). Ver foto de resultado en anexo 4.

8.4. Determinación de antocianinas: En el cuadro 4 se pueden observar los resultados de la determinación de antocianinas en el extracto etanólico de Rosa de Jamaica, mediante cromatografía en capa fina (TLC). Con este ensayo se pretendió caracterizar la antocianina responsable de la coloración rojiza de la Rosa de Jamaica, la delfinidin-3-xilosilglucósido (hibiscina), de coloración azul violeta y un Rf cercano al 0.5.

Cuadro 4: Caracterización de los pigmentos antociánicos presentes en el extracto de Rosa de Jamaica por Cromatografía en Capa Fina

Número de banda	Color observado en visible	Rf
1	Azul	0.38
2	Azul-violeta	0.45
3	Amarillo	0.68
Rojo sudán	Rojo	0.91
Azul de metileno	Azul-celeste	0.39

Fuente: Datos Experimentales. Fase móvil: n-butanol, ácido acético glacial, agua (40:10:20).

Ver foto de resultado en anexo 5.

8.5. Determinación de taninos: Se demostró la presencia de taninos en el extracto etanólico de corteza de Mangle, mediante pruebas cualitativas de ensayo macrométrico (gelatina al 1%, gelatina al 1% + cloruro de sodio al 10%, cloruro férrico), dando en todos los casos positivo para este grupo de metabolitos (ver tabla de resultado y fotografía en anexo 6). El ensayo con cloruro férrico permitió determinar la presencia mayoritaria de taninos del tipo catecol o condensados al dar una coloración negro-grisáceo.

8.6. Cuantificación de los metabolitos responsables de la actividad colorante en los extractos de las tres plantas de estudio: En el cuadro 5 se pueden observar los resultados de las cuantificaciones realizadas en cada extracto del metabolito relacionado con la propiedad colorante, flavonoides para Zarzaparrilla, antocianinas para Rosa de Jamaica y taninos para Mangle.

Cuadro 5: Cuantificación de los metabolitos responsables de la actividad colorante

Grupo de metabolito	<i>S. domingensis</i>	<i>H. sabdariffa</i>	<i>R. mangle</i>
Flavonoides (%)	0.39	---	---
Taninos (%)	---	---	39.61
Antocianinas (mg/g de extracto)	---	33.93 ± 0.25	---

Fuente: Datos experimentales. % flavonoides expresados en hiperósido.

Antocianinas calculadas en función de la delfinidina-3-glucósido.

8.7. Determinación del equivalente de concentración de los colorantes naturales en función de colorante artificial: En los cuadros 6, 8, 10, 12 y 14, se pueden observar las longitudes de onda de máxima absorbancia de cada extracto de estudio y de los tres colorantes sintéticos de referencia, en diferentes medios de reconstitución. En los cuadros 7, 9, 11, 13 y 15, se pueden observar los equivalentes de concentración de los colorantes de estudio en función de los colorantes sintéticos de referencia. Para este cálculo únicamente se tomaron en cuenta las muestras en las que la longitud de onda de máxima absorbancia era similar o aproximada a la longitud de onda de máxima absorbancia de un colorante artificial en el mismo medio de reconstitución.

Cuadro 6: Longitud de onda de máxima absorbancia de los extractos de estudio en medio etanol/HCl

Extracto	Longitud de onda de mayor absorbancia	Colorante con similar longitud de onda máxima
Rosa de Jamaica (<i>H. sabdariffa</i>) cálices	536	Rojo No. 40
Zarzaparrilla (<i>S. domingensis</i>) rizoma	283 328	Amarillo No. 5 Rojo No. 40, Amarillo No. 6
Mangle (<i>R. mangle</i>) corteza	281 329	Amarillo No. 5 Rojo No. 40, Amarillo No. 6
Rojo No. 40	507 315	Rosa de Jamaica Zarzaparrilla, Mangle
Amarillo No. 5	260	Zarzaparrilla, Mangle
Amarillo No. 6	313	Mangle, Zarzaparrilla

Fuente: Datos experimentales. Solvente: Etanol al 95%/HCl 0.1 N (85:15). Ver datos en anexo 7.

Cuadro 7: Equivalente de concentración de los colorantes naturales en función de colorante artificial en medio etanol/HCl

Extracto	Equivalentes de Rojo No. 40 (mg/g extracto)	Equivalentes de Amarillo No. 5 (mg/g extracto)	Equivalentes de Amarillo No. 6 (mg/g extracto)
Zarzaparrilla (<i>S. domingensis</i>) Rizoma	596.47 ± 0.02	134.32	640.96
Rosa de Jamaica (<i>H. sabdariffa</i>) Cálices	152.41 ± 0.01	-----	-----
Mangle (<i>R. mangle</i>) Corteza	263.32	111.66	394.63 ± 0.02

Fuente: Datos experimentales. Solvente: Etanol al 95%/HCl 0.1 N (85:15). Ver curvas de calibración de los colorantes artificiales en anexo 8.

Cuadro 8: Longitud de onda de máxima absorbancia de los extractos de estudio en medio buffer pH3

Nombre del extracto	Longitud de onda de mayor absorbancia	Colorante con similar longitud de onda máxima
Rosa de Jamaica (<i>H. sabdariffa</i>) cálices	525	Rojo No. 40
Zarzaparrilla (<i>S. domingensis</i>) rizoma	306	Rojo No. 40, Amarillo No. 5
Mangle (<i>R. mangle</i>) corteza	306	Rojo No. 40, Amarillo No. 5
Rojo No. 40	306 510	Zarzaparrilla, Mangle Rosa de Jamaica
Amarillo No. 5	306	Zarzaparrilla, Mangle

Fuente: Datos experimentales. Solvente: Buffer pH 3. Ver datos en anexo 7.

Cuadro 9: Equivalente de concentración de los colorantes naturales en función de colorante artificial en medio pH3

Extracto	Equivalentes de Rojo No. 40 (mg/g extracto)	Equivalentes de Amarillo No. 5 (mg/g extracto)	Equivalentes de Amarillo No. 6 (mg/g extracto)
Zarzaparrilla (<i>S. domingensis</i>) Rizoma	235.81	12.46 ± 0.03	-----
Rosa de Jamaica (<i>H. sabdariffa</i>) Cálices	51.07 ± 0.02	-----	-----
Mangle (<i>R. mangle</i>) Corteza	184.81	5.92	-----

Fuente: Datos experimentales. Solvente: Buffer pH 3. Ver curvas de calibración de los colorantes artificiales en anexo 8.

Cuadro 10: Longitud de onda de máxima absorbancia de los extractos de estudio en medio buffer pH4

Nombre del extracto	Longitud de onda de mayor absorbancia	Colorante con similar longitud de onda máxima
Rosa de Jamaica (<i>H. sabdariffa</i>) cálices	527	Rojo No. 40
Zarzaparrilla (<i>S. domingensis</i>) rizoma	486	Amarillo No. 5, Amarillo No. 6, Rojo No. 40
Mangle (<i>R. mangle</i>) corteza	486	Amarillo No. 5, amarillo No. 6, Rojo No.40
Rojo No. 40	511	Rosa de Jamaica, Zarzaparrilla, Mangle
Amarillo No. 5	429	Zarzaparrilla, Mangle
Amarillo No. 6	483	Zarzaparrilla, Mangle

Fuente: Datos experimentales. Solvente: Buffer pH 4. Ver datos en anexo 7.

Cuadro 11: Equivalente de concentración de los colorantes naturales en función de colorante artificial en medio pH4

Extracto	Equivalentes de Rojo No. 40 (mg/g extracto)	Equivalentes de Amarillo No. 5 (mg/g extracto)	Equivalentes de Amarillo No. 6 (mg/g extracto)
Zarzaparrilla (<i>S. domingensis</i>) Rizoma	198.04 ± 0.02	20.64 ± 0.02	6.17 ± 0.03
Rosa de Jamaica (<i>H. sabdariffa</i>) Cálices	59.29	-----	-----
Mangle (<i>R. mangle</i>) Corteza	113.40 ± 0.01	3.70	4.69 ± 0.01

Fuente: Datos experimentales. Solvente: Buffer pH 4. Ver curvas de calibración de los colorantes artificiales en anexo 8.

Cuadro 12: Longitud de onda de máxima absorbancia de los extractos de estudio en medio buffer pH5

Nombre del extracto	Longitud de onda de mayor absorbancia	Colorante con similar longitud de onda máxima
Rosa de Jamaica (<i>H. sabdariffa</i>) cálices	524	Rojo No. 40
Zarzaparrilla (<i>S. domingensis</i>) rizoma	306 321	Rojo No. 40, Amarillo No. 5, Amarillo No. 6
Mangle (<i>R. mangle</i>) corteza	324	Rojo No. 40, Amarillo No. 5, Amarillo No. 6
Rojo No. 40	306 509	Zarzaparrilla, Mangle Rosa de Jamaica
Amarillo No. 5	305	Zarzaparrilla, Mangle
Amarillo No. 6	306	Zarzaparrilla, Mangle

Fuente: Datos experimentales. Solvente: Buffer pH 5. Ver datos en anexo 7.

Cuadro 13: Equivalente de concentración de los colorantes naturales en función de colorante artificial en medio pH5

Extracto	Equivalentes de Rojo No. 40 (mg/g extracto)	Equivalentes de Amarillo No. 5 (mg/g extracto)	Equivalentes de Amarillo No. 6 (mg/g extracto)
Zarzaparrilla (<i>S. domingensis</i>) Rizoma	234.61 ± 0.02	10.59 ± 0.03	8.02 ± 0.01
Rosa de Jamaica (<i>H. sabdariffa</i>) Cálices	70.53 ± 0.02	-----	-----
Mangle (<i>R. mangle</i>) Corteza	158.72 ± 0.03	4.31	2.92

Fuente: Datos experimentales. Solvente: Buffer pH 5. Ver curvas de calibración de los colorantes artificiales en anexo 8.

Cuadro 14: Longitud de onda de máxima absorbanza de los extractos de estudio en medio buffer pH7

Nombre del extracto	Longitud de onda de mayor absorbanza	Colorante con similar longitud de onda máxima
Rosa de Jamaica (<i>H. sabdariffa</i>) cálices	525	Rojo No. 40
Zarzaparrilla (<i>S. domingensis</i>) rizoma	206 282	Rojo No. 40 Amarillo No. 5, Amarillo No. 6
Mangle (<i>R. mangle</i>) corteza	205 279	Rojo No. 40 Amarillo No. 5, Amarillo No. 6
Rojo No. 40	506 243 217	Rosa de Jamaica Zarzaparrilla, Mangle Zarzaparrilla, Mangle
Amarillo No. 5	258 213	Zarzaparrilla , Mangle Zarzaparrilla, Mangle
Amarillo No. 6	240 262	Zarzaparrilla, Mangle Zarzaparrilla, Mangle

Fuente: Datos experimentales. Solvente: Buffer pH 7. Ver datos en anexo 7.

Cuadro 15: Equivalente de concentración de los colorantes naturales en función de colorante artificial en medio pH7

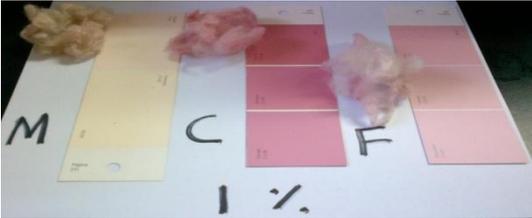
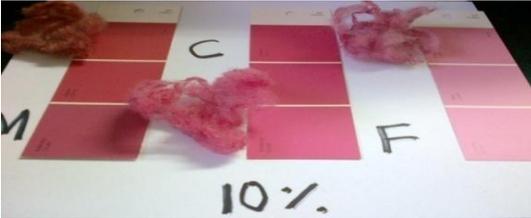
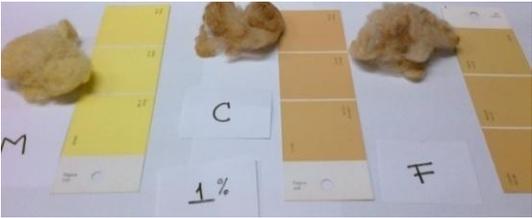
Extracto	Equivalentes de Rojo No. 40 (mg/g extracto)	Equivalentes de Amarillo No. 5 (mg/g extracto)	Equivalentes de Amarillo No. 6 (mg/g extracto)
Zarzaparrilla (<i>S. domingensis</i>) Rizoma	790.83 ± 0.02	167.02 ± 0.02	153.35 ± 0.03
Rosa de Jamaica (<i>H. sabdariffa</i>) Cálices	63.02 ± 0.01	-----	-----
Mangle (<i>R. mangle</i>) Corteza	550.97 ± 0.03	106.22	91.53

Fuente: Datos experimentales. Solvente: Buffer pH 7. Ver curvas de calibración de los colorantes artificiales en anexo 8.

8.8. Ensayo de tinción en fibras: En el cuadro 16 se presentan los resultados de la evaluación del potencial tintóreo de las tres especies de estudio, usando dos concentraciones diferentes de cada extracto (1 y 10%) y tres formas diferentes de tinción (método directo en frío, método directo en caliente y método indirecto con mordiente).

Cuadro 16: Tinción en lana de los diferentes extractos

Especie	Resultados de color			
	%	Frío	Caliente	Mordiente
Zarzaparrilla (<i>S. domingensis</i>) Rizoma	1	Croissant H4-03	Dulce de Leche H4-06	Níspero H1-07
	10	Cappuchino F4-11	Cappuchino F4-11	Incienso H3-09

				
Rosa de Jamaica (<i>H. sabdariffa</i>) Cálices	1	Ponny C3-04	Prusia C3-08	Coyote F1-01
	10	Fresas con crema C2-08	Tentación C2-09	Gaudi C3-11
				
Mangle (<i>R. mangle</i>) Corteza	1	Pepita H3-08	Palma G3-06	Mangle J1-07
	10	Muérdago H3-10	Pepita H3-08	Trópico J2-14
				

Fuente: Datos experimentales.

8.9. Ensayo de coloración en cosméticos: En los cuadros 17 al 25, se presentan los resultados de las pruebas de coloración en tres productos cosméticos diferentes (gel, shampoo y loción). Para tales ensayos se emplearon diferentes concentraciones de los extractos etanolicos de las tres plantas de estudio (1, 2.5 y 5%).

Zarzaparrilla (*S. domingensis*) rizoma

Gel: pH 7

Cuadro 17: Ensayo de coloración en gel

No.	Concentración	Color según Pantone COMEX®	
		No.	Nombre
1	1%	H1-13	Jarabe
2	2.5%	G1-12	Mandarina
3	5%	E2-14	Oaxaca



Fuente: Datos experimentales.

Loción: pH 5

Cuadro 18: Ensayo de coloración en loción

No.	Concentración	Color según Pantone COMEX®	
		No.	Nombre
1	1%	H2-11	Piedra de sol
2	2.5%	H2-12	Tejocote
3	5%	G2-12	Magma



Fuente: Datos experimentales.

Shampoo: pH 9

Cuadro 19: Ensayo de coloración en shampoo

No.	Concentración	Color según Pantone COMEX®	
		No.	Nombre
1	1%	G1-12	Mandarina
2	2.5%	F2-12	Andalucía
3	5%	E2-14	Oxaca



Fuente: Datos experimentales.

Rosa de Jamaica (*H. sabdariffa*) cálices

Gel: pH 7

Cuadro 20: Ensayo de coloración en gel

No.	Concentración	Color según Pantone COMEX®	
		No.	Nombre
1	1%	D3-01	Boli goma
2	2.5%	D3-08	Tortilla Azteca
3	5%	C3-10	Júpiter

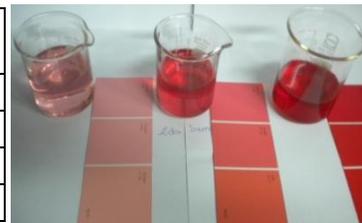


Fuente: Datos experimentales.

Loción: pH 5

Cuadro 21: Ensayo de coloración en loción

No.	Concentración	Color según Pantone COMEX®	
		No.	Nombre
1	1%	E1-06	Chiclamino
2	2.5%	E1-09	Rehilete
3	5%	E1-12	Machis



Fuente: Datos experimentales.

Shampoo: pH 9

Cuadro 22: Ensayo de coloración en shampoo

No.	Concentración	Color según Pantone COMEX®	
		No.	Nombre
1	1%	J2-06	Raspado
2	2.5%	J3-09	Leopardo
3	5%	J3-12	Aragón



Fuente: Datos experimentales.

Mangle (*R. mangle*) corteza

Gel: pH 7

Cuadro 23: Ensayo de coloración en gel

No.	Concentración	Color según Pantone COMEX®	
		No.	Nombre
1	1%	J2-10	Leo
2	2.5%	J110	Dalai
3	5%	J2-12	León



Fuente: Datos experimentales.

Loción: pH 5

Cuadro 24: Ensayo de coloración en loción

No.	Concentración	Color según Pantone COMEX®	
		No.	Nombre
1	1%	J3-05	Manta
2	2.5%	J3-07	Polen
3	5%	J2-10	Leo



Fuente: Datos experimentales.

Shampoo: pH 9

Cuadro 25: Ensayo de coloración en shampoo

No.	Concentración	Color según Pantone COMEX®	
		No.	Nombre
1	1%	G2-12	Magma
2	2.5%	G1-12	Mandarina
3	5%	H1-13	Jarabe



Fuente: Datos experimentales.

8.10. Costo de producción de colorantes naturales vrs el costo de venta de los colorantes sintéticos: En la siguiente tabla se muestra el costo de producción por gramo de los colorantes naturales, en el cual se demuestra que de acuerdo a los rendimientos obtenidos en cada especie, el Mangle es el que presenta el menor costo, y el costo más alto lo presenta la Rosa de Jamaica.

Cuadro 26: Costo de producción de los extractos de cada planta de estudio

Especie vegetal	g producidos	Costo de producción por gramo en Q.
Zarzaparrilla (<i>S. domingensis</i>) rizoma	64	18.00
Rosa de Jamaica (<i>H. sabdariffa</i>) cálices	21.54	14.00
Mangle (<i>R. mangle</i>) corteza	87.94	12.00

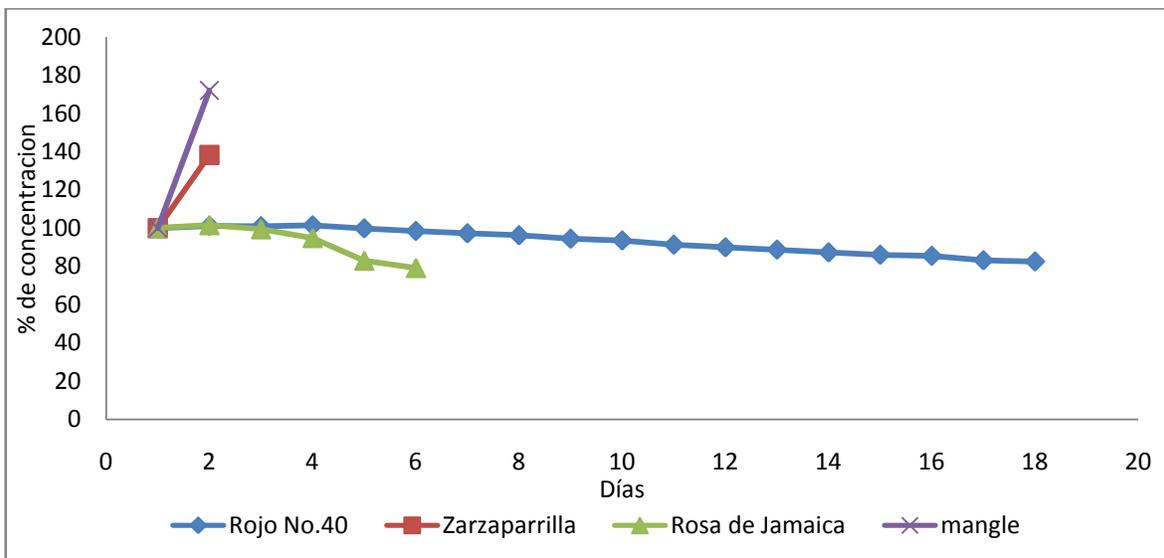
Fuente: Datos experimentales.

Cuadro 27: Costo de venta de los colorantes sintéticos usados como referencia

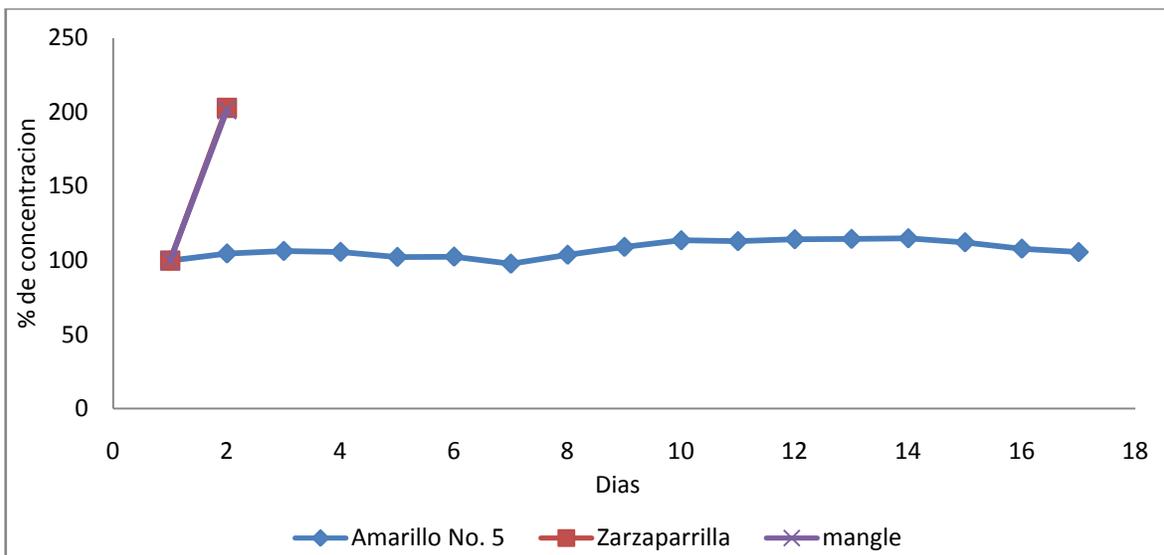
Colorante	Costo de venta por gramo en Q.
Rojo No. 40 Allura	0.35
Amarillo No. 5 Tartrazina	0.25
Amarillo No. 6 Crepúsculo	0.27

Fuente: Datos experimentales.

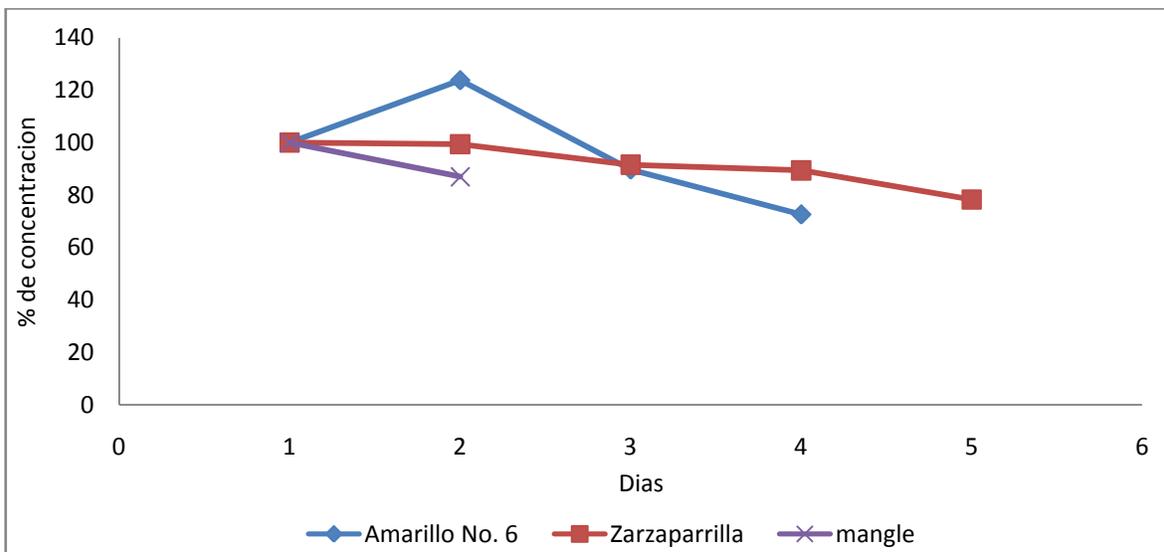
8.11. Estudio de estabilidad: En los siguientes gráficos se muestran las estabildades de cada extracto y estándares a los diferentes pH, mostrando el número de días a los cuales disminuye o aumenta su concentración en un 20% de su concentración inicial (100 ± 20).

Grafico 2: Estabilidad de los extractos de estudio en medio etanol/HCl vrs Rojo No. 40

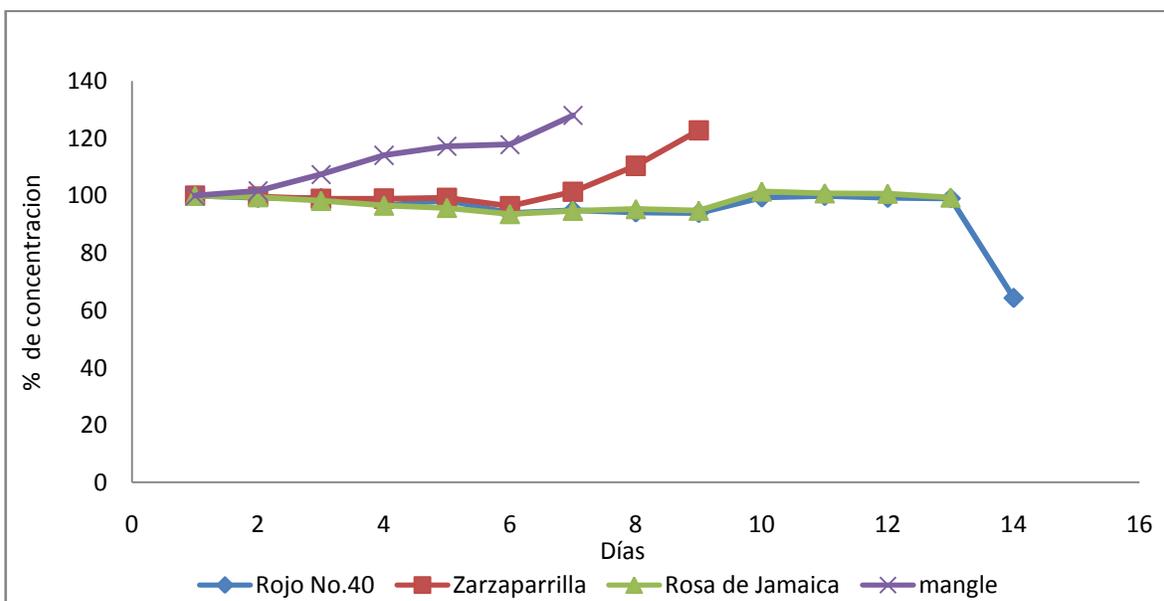
Fuente: Datos experimentales.

Grafico 3: Estabilidad de los extractos de estudio en medio etanol/HCl vrs Amarillo No. 5

Fuente: Datos experimentales.

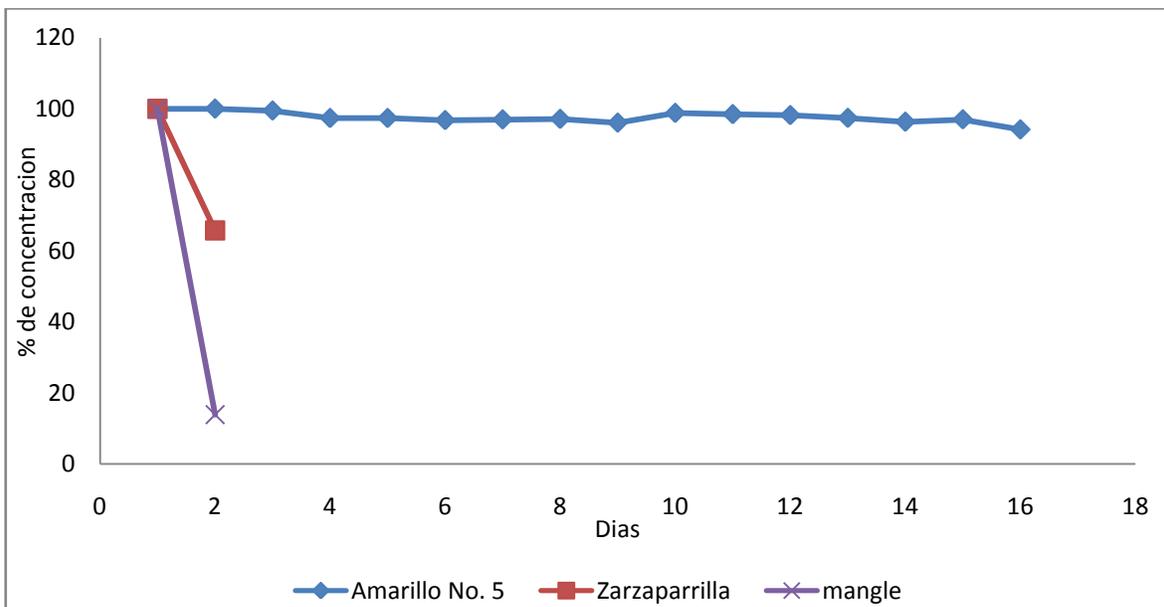
Grafico 4: Estabilidad de los extractos de estudio en medio etanol/HCl vrs Amarillo No. 6

Fuente: Datos experimentales.

Grafico 5: Estabilidad de los extractos de estudio en medio buffer pH3 vrs Rojo No. 40

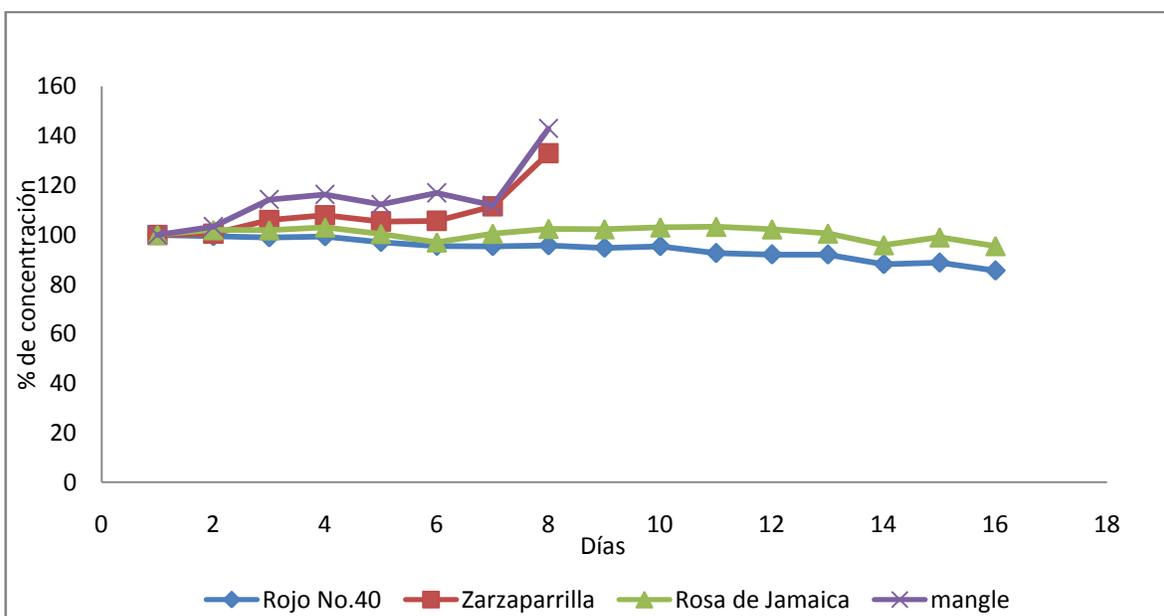
Fuente: Datos experimentales.

Grafico 6: Estabilidad de los extractos de estudio en medio buffer pH3 vrs Amarillo No. 5

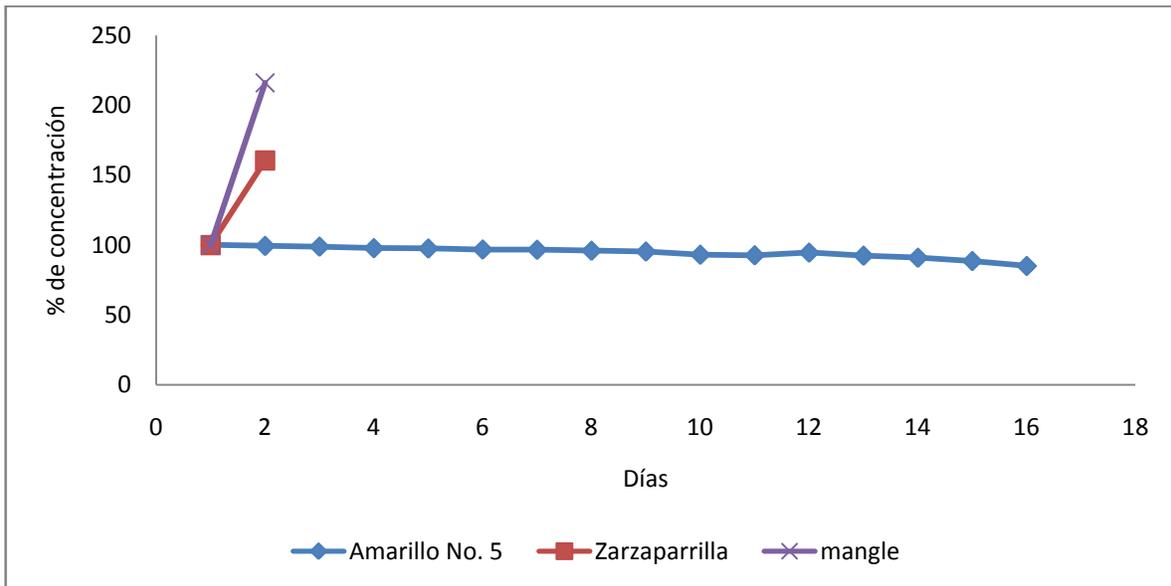


Fuente: Datos experimentales.

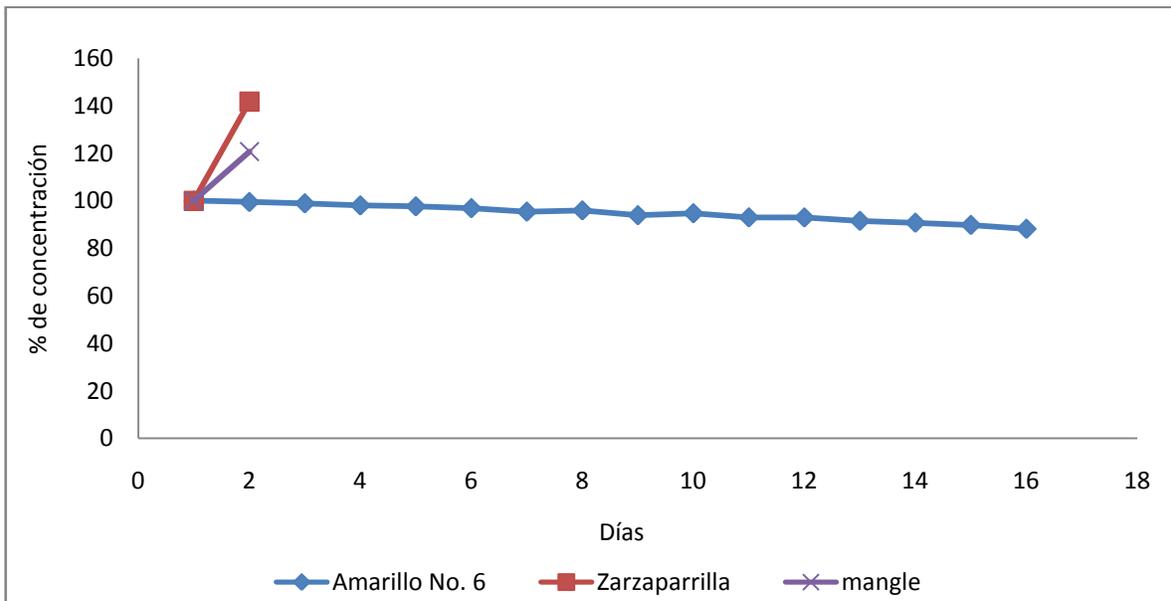
Grafico 7: Estabilidad de los extractos de estudio en medio buffer pH4 vrs Rojo No. 40



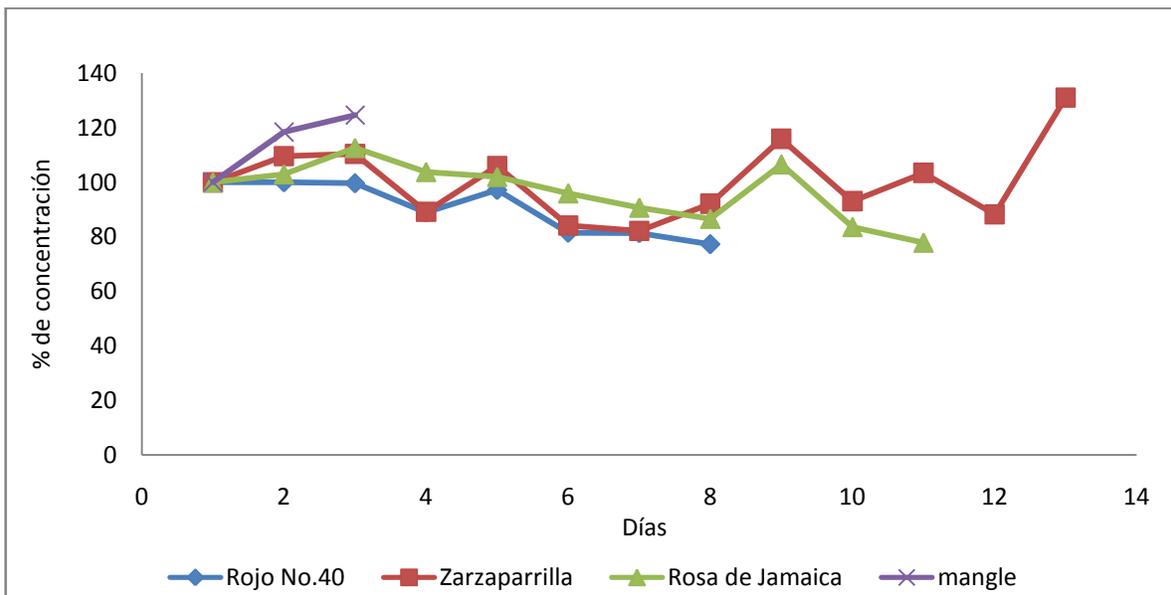
Fuente: Datos experimentales.

Grafico 8: Estabilidad de los extractos de estudio en medio buffer pH4 vrs Amarillo No. 5

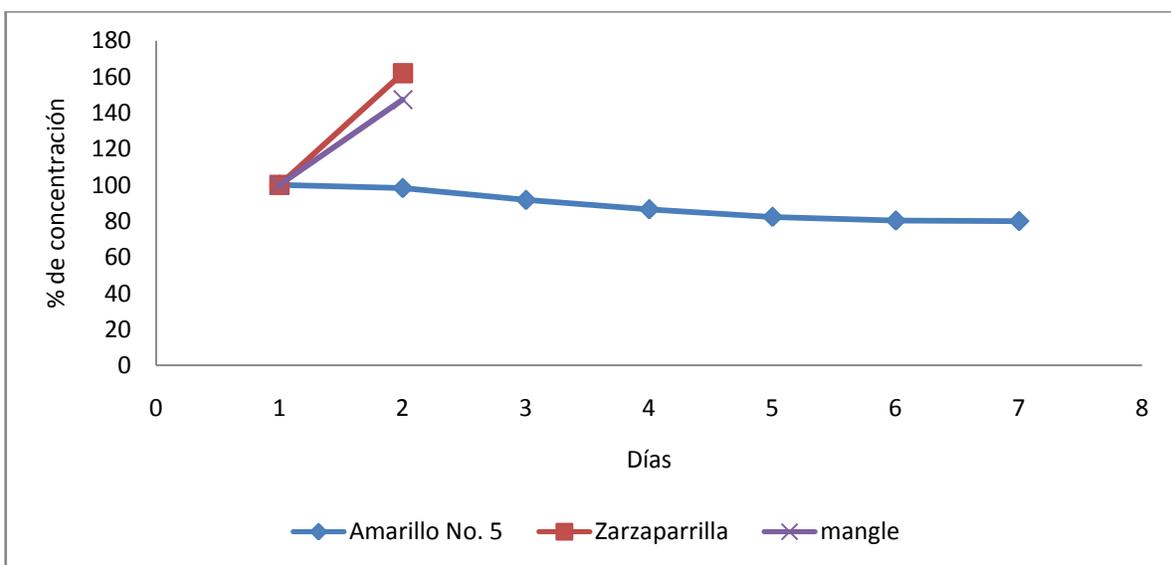
Fuente: Datos experimentales.

Grafico 9: Estabilidad de los extractos de estudio en medio buffer pH4 vrs Amarillo No. 6

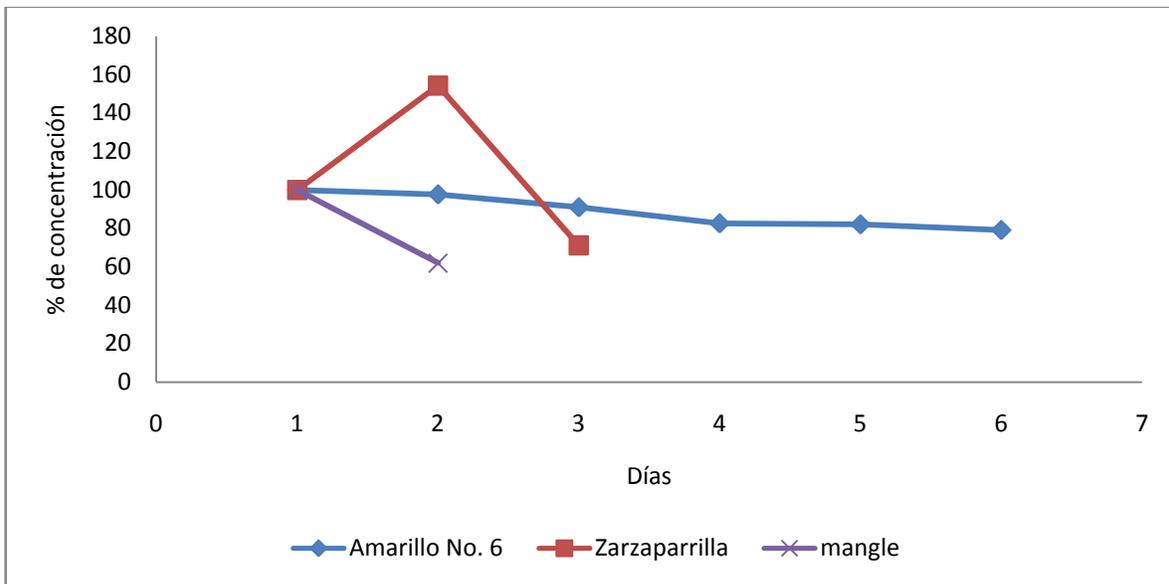
Fuente: Datos experimentales.

Grafico 10: Estabilidad de los extractos de estudio en medio buffer pH5 vrs Rojo No. 40

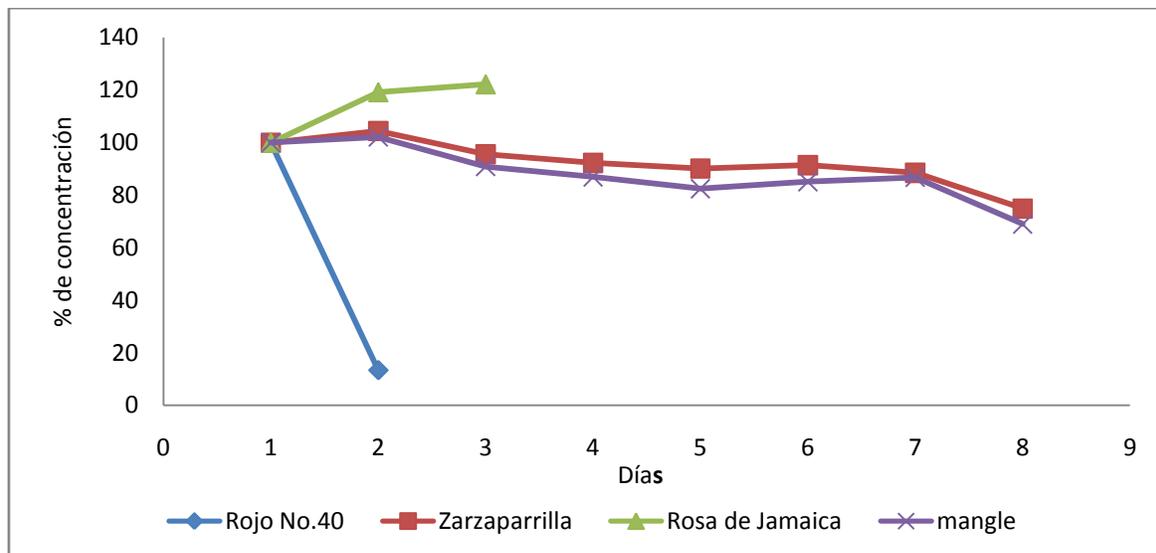
Fuente: Datos experimentales.

Grafico 11: Estabilidad de los extractos de estudio en medio buffer pH5 vrs Amarillo No. 5

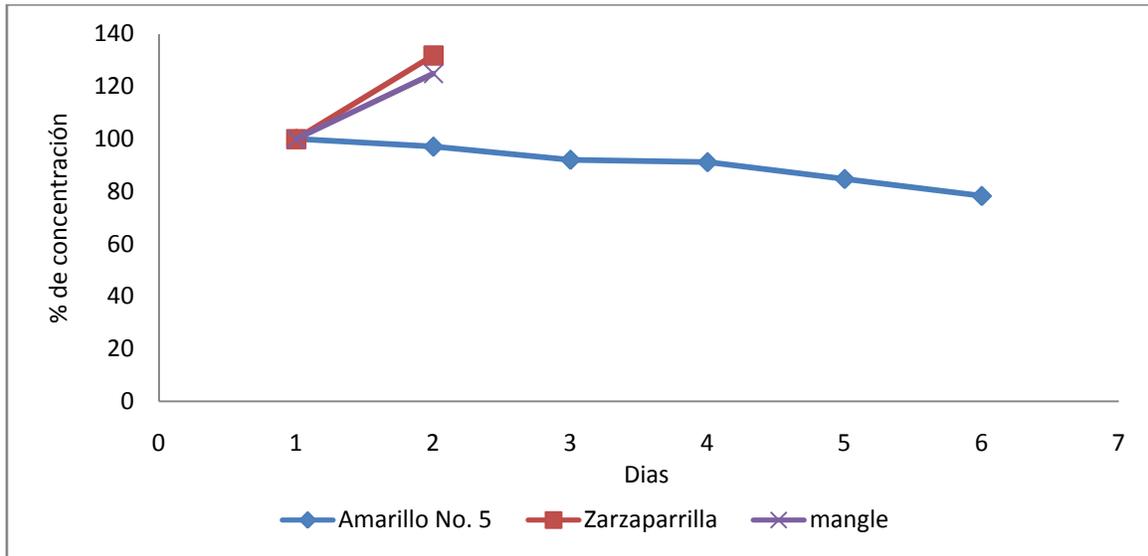
Fuente: Datos experimentales.

Grafico 12: Estabilidad de los extractos de estudio en medio buffer pH5 vrs amarillo No. 6

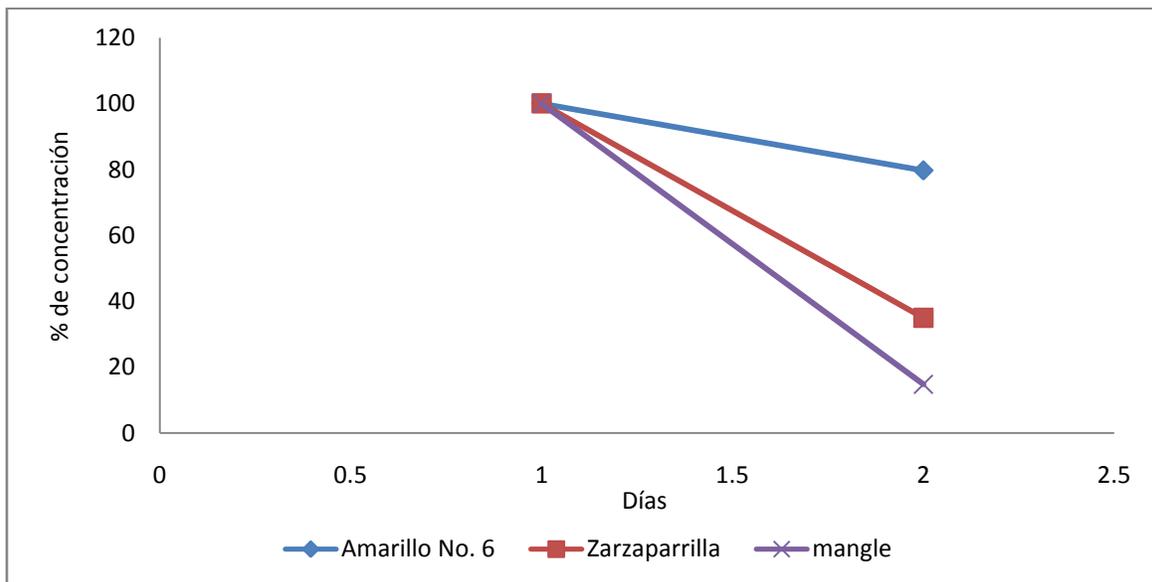
Fuente: Datos experimentales.

Grafico 13: Estabilidad de los extractos de estudio en medio buffer pH7 vrs Rojo No. 40

Fuente: Datos experimentales.

Grafico 14: Estabilidad de los extractos de estudio en medio buffer pH7 vrs Amarillo No. 5

Fuente: Datos experimentales.

Grafico 15: Estabilidad de los extractos de estudio en medio buffer pH7 vrs Amarillo No. 6

Fuente: Datos experimentales.

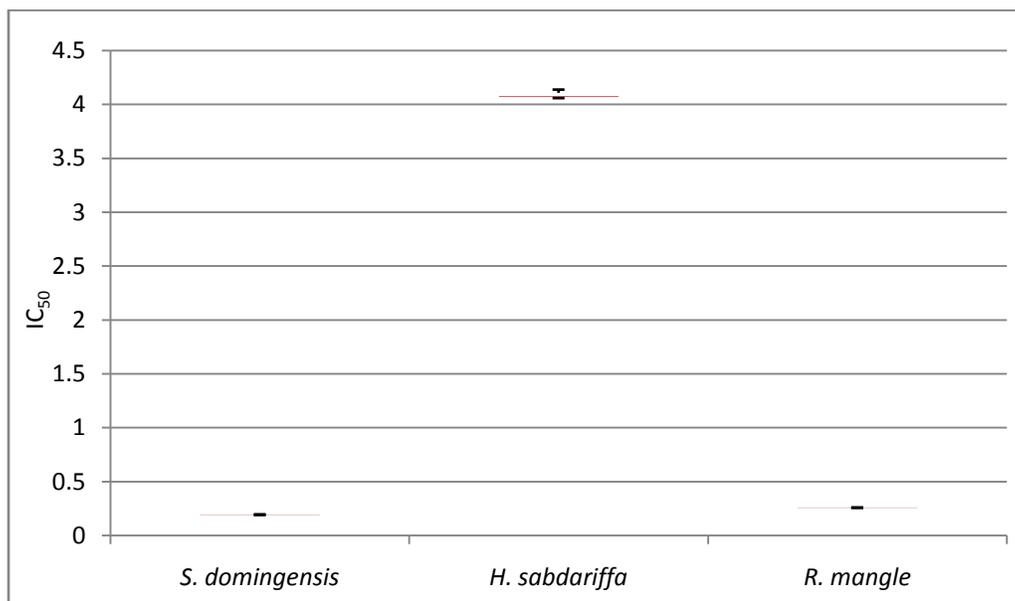
8.12. Determinación de la actividad antioxidante: La actividad antioxidante de los extractos de las tres plantas de estudio se evaluó por medio de tres métodos, uno cualitativo y dos cuantitativos. Para el ensayo cualitativo se empleó el método de cromatografía en capa fina (TLC) usando como revelador DPPH. Los resultados obtenidos para los tres extractos fueron positivos para actividad antioxidante, los estándares empleados fueron: Terbutilhidroquinona (TBHQ), rutina, quercetina, ácido ascórbico, β -caroteno y trolox, los cuales también dieron positiva la prueba (ver resultados en anexo 9). Los resultados cuantitativos de la actividad antioxidante se pueden observar en el cuadro 28 por medio de DPPH, que es para determinar la actividad antioxidante de compuestos con características polares; en el gráfico 16 se puede observar la comparación entre los diferentes extractos según el método DPPH. El cuadro 29 por medio de ABTS, que es para determinar la actividad antioxidante en compuestos con características más apolares; en el gráfico 17 se puede observar la comparación entre los diferentes extractos según el método ABTS y el gráfico 18 muestra los resultados obtenidos de actividad antioxidante equivalente a trolox.

Cuadro 28: Determinación de la actividad antioxidante por medio del método DPPH
(Método macrométrico)

Especie	Extracto	Peso de muestra (g)	Volumen de reconstitución (ml)	Dilución empleada	Porcentaje de inhibición (%)	Actividad antioxidante expresada como CI_{50} (mg/ml)
<i>S. domingensis</i>	Etanólico	0.2006	10	0.06:5	60.89	0.20 ± 0.003
<i>H. sabdariffa</i>	Etanólico	0.4010	20	1.2:5	62.15	4.09 ± 0.041
<i>R. mangle</i>	Etanólico	0.2012	10	0.08:5	60.94	0.26 ± 0.002
Trolox	Estándar	0.010	5	0.1	60.25	0.182 ± 0.002
Vitamina E		0.011	5	0.18	65.45	0.72 ± 0.01
Vitamina C		0.2007	10	0.008	67.40	0.14 ± 0.0003
Rutina		0.1005	5	0.012	65.57	0.16 ± 0.001
Quercetina		0.010	5	0.025	65.37	0.16 ± 0.0004
TBHQ		0.010	5	0.08	68.71	0.29 ± 0.002

Fuente: Datos experimentales. Ver fotografías de cuantificación de actividad antioxidante por DPPH en Anexo 10 y curvas de calibración de muestras y estándares en Anexo 12.

Grafico 16: IC_{50} de actividad antioxidante de las especies de estudio determinado por el método DPPH (Método macrométrico)



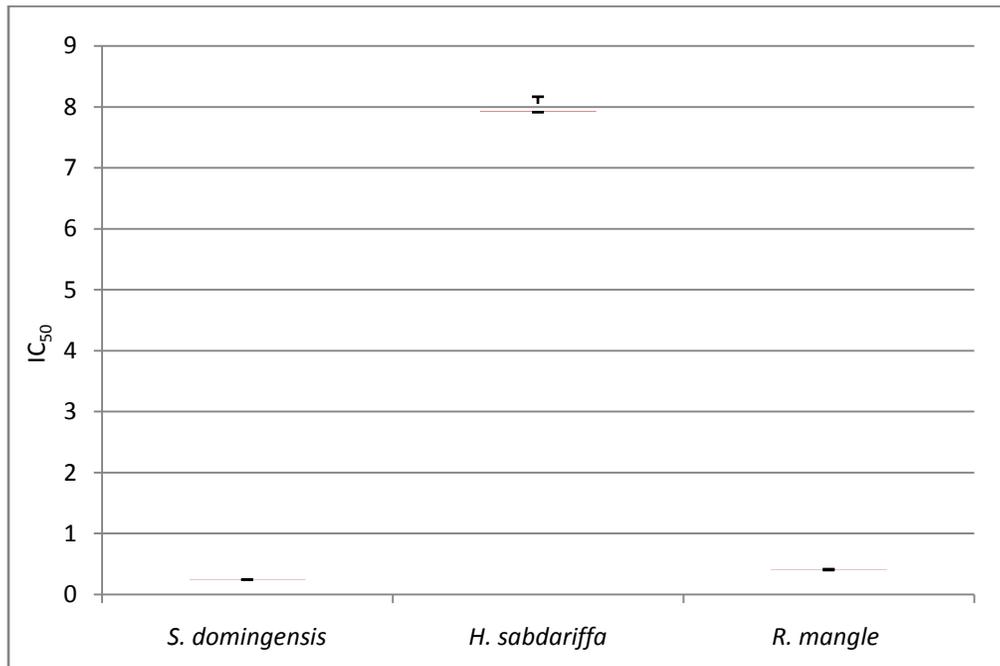
Fuente: Datos experimentales.

Cuadro 29: Determinación de la actividad antioxidante por medio del método ABTS (Método macrométrico)

Especie	Extracto	Peso de muestra (g)	Volumen de reconstitución (ml)	Dilución empleada	Porcentaje de inhibición	Actividad antioxidante expresada como IC_{50} (mg/ml)	Equivalente de actividad antioxidante de trolox (mmol/g)
<i>S. domingensis</i>	Etanólico	0.2009	10	0.08:5	64.30	0.24 ± 0.003	0.99 ± 0.004
<i>H. sabdariffa</i>	Etanólico	0.4011	20	2.5:5	62.11	7.92 ± 0.02	0.42 ± 0.076
<i>R. mangle</i>	Etanólico	0.2011	10	0.14:5	63.18	0.41 ± 0.008	0.59 ± 0.004
Trolox	Estándar	0.010	5	0.04	78.17	0.2726 ± 0.002	-----
Vitamina E		0.021	10	0.24	59.96	0.1923 ± 0.003	-----
Vitamina C		0.010	5	0.012	61.13	0.0201 ± 0.03	-----
Rutina		0.040	20	0.4	67.79	0.05 ± 0.0002	-----
Quercetina		0.010	5	0.07	61.64	0.10 ± 0.004	-----
TBHQ		0.010	5	0.24	60.59	0.0996 ± 0.001	-----

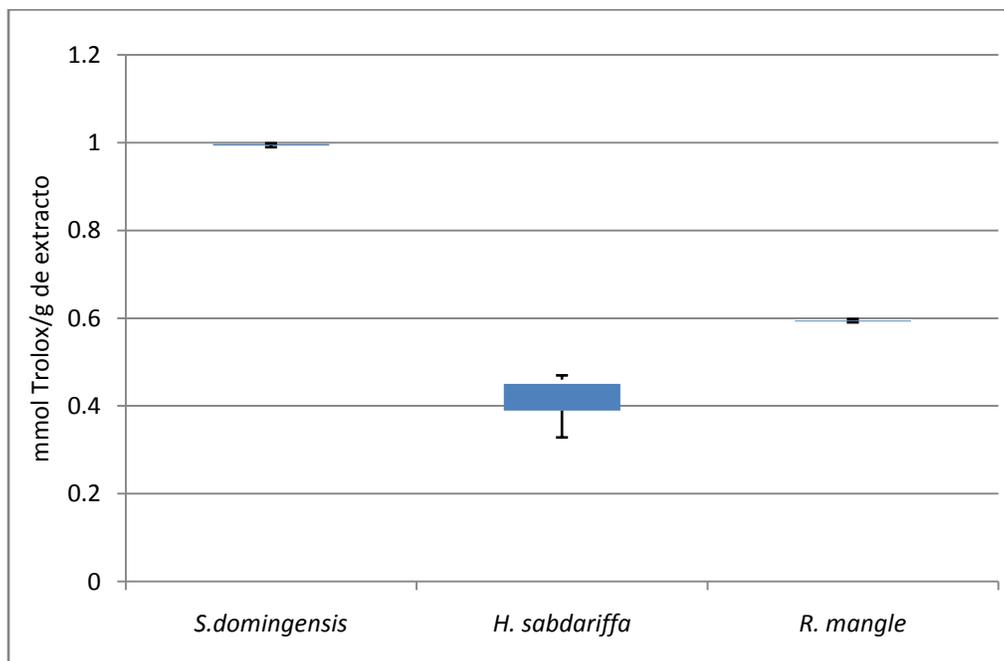
Fuente: Datos experimentales. Ver fotografías de cuantificación de actividad antioxidante por ABTS en Anexo 11 y curvas de calibración de muestras y estándares en Anexo 13.

Grafico 17: IC_{50} de actividad antioxidante de las especies de estudio determinado por el método ABTS (Método macrométrico)



Fuente: Datos experimentales.

Grafico 18: Comparación de la actividad antioxidante de equivalente de Trolox en cada uno de los extractos



Fuente: Datos experimentales.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se seleccionaron tres especies vegetales con presencia fuerte en el país, que por la composición química reportada en la literatura, constituyen un potencial en la industria farmacéutica, alimenticia y/o cosmética, especialmente como colorantes, tintes, pigmentos y/o antioxidantes. (Ver fichas técnicas de las tres especies de estudio en Anexo 1).

La colecta del material vegetal se llevó a cabo en los departamentos del país en que el cultivo de las especies vegetales es mayoritario; en el cuadro 1 se indica la procedencia del material vegetal, el rizoma de Zarzaparrilla (*Smilax domingensis*), fue colectado en Suchitepéquez, los cálices de Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), fueron colectados en Jutiapa, la corteza de Mangle (*Rizophora mangle*), fue colectada en Santa Rosa. Cabe destacar que si bien las tres especies no son nativas del continente, son especies bien adaptadas al país y bastante usadas por sus habitantes.

La extracción de los colorantes presentes en cada especie de estudio fue realizada por el método de percolación y la concentración usando rotavapor. El solvente usado para cada especie fue seleccionado acorde al metabolito de interés, responsable del color final del extracto. Para *S. domingensis*, los metabolitos identificados como responsables del color fueron los flavonoides; para *H. sabdariffa*, los metabolitos identificados fueron las antocianinas; y para el caso de *R. mangle*, los metabolitos identificados fueron los taninos. Para las tres especies se seleccionó un disolvente polar para favorecer la separación de los colorantes ya que la estructura química de los metabolitos de interés identificados son más afines a disolventes polares tipo metanol o etanol; se seleccionó el etanol por su baja toxicidad y uso en farmacia y cosmética. Para *S. domingensis* y *R. mangle*, se usó etanol al 70 % como menstruo; mientras que para *H. sabdariffa* se usó etanol al 20 %. La extracción se realizó por percolación ya que es una técnica que agota el material vegetal y se asegura de la extracción total de los metabolitos, la concentración se realizó usando rotavapor, ya que al trabajar a presión reducida se evita de usar temperaturas altas que degradarían los metabolitos de interés.

En el cuadro 2 y gráfico 1 se observan los porcentajes de rendimiento de cada extracto, de acuerdo a ellos *R. mangle* (Mangle) corteza y *S. domingensis* (Zarzaparrilla) rizoma, presentaron los mayores rendimientos de extracción (44% y 32% respectivamente); mientras que el menor rendimiento lo presentó *H. sabdariffa* (Rosa de Jamaica) cálices (11%). Lo cual nos demuestra la rentabilidad de los primeros dos extractos respecto al de Rosa de Jamaica.

Para la caracterización fitoquímica, se realizaron ensayos macro, semimicro y cromatografía en capa fina (TLC) del principal grupo químico responsable del color identificado en cada especie de estudio.

En el extracto de *S. domingensis* (Zarzaparrilla) se identificó la presencia de flavonoides (metabolito de interés), antocianinas y posible presencia de flavanonas mediante pruebas cualitativas de ensayo macrométrico; la determinación de flavonoides por cromatografía en capa fina (TLC) reveló la presencia de ácido clorogénico y ácido caféico en el extracto (ver cuadro 3).

En el extracto de *H. sabdariffa* (Rosa de Jamaica) se identificó presencia de flavonoides del tipo flavonas, flavonoles, flavanonoles, flavanonas, isoflavonas y antocianinas mediante pruebas de ensayo macrométrico; la determinación de flavonoides por cromatografía en capa fina (TLC) permitió identificar la presencia de ácido clorogénico y rutina dentro de su composición química (ver cuadro 3).

Como en los ensayos de tipo macrométrico se identificó la presencia de antocianinas y siendo este grupo el de interés para el extracto de *H. sabdariffa*, se procedió a caracterizar las antocianinas presentes en el extracto por cromatografía en capa fina (ver cuadro 4), con este ensayo se logró identificar la antocianina responsable de la coloración rojiza de los cálices de la Rosa de Jamaica, la delphinidin-3-xilosilglucósido (hibiscina) con un Rf cercano a 0.5; además se logró identificar otro pigmento antociánico presente en el extracto, la gospetina que no tiene relevancia significativa para la investigación, pero se menciona ya que este permite confirmar la caracterización del extracto de Rosa de Jamaica.

En el extracto de *R. mangle* (mangle) se identificó la presencia de taninos mediante ensayos cualitativos de tipo macrométrico, dando todas las pruebas positivas, el ensayo con cloruro férrico permitió determinar la presencia mayoritaria de taninos de tipo catecol o condensados al dar una coloración negro-grisáceo.

Una vez caracterizado el grupo químico de metabolitos relacionados con la propiedad colorante en cada extracto, se procedió a la cuantificación de los mismos mediante ensayos específicos. En el cuadro 5 se muestran los resultados de las cuantificaciones realizadas, todas fueron hechas por espectrofotometría UV/VIS, debido a la sensibilidad y precisión del aparato.

La cuantificación de flavonoides en *S. domingensis* se realizó determinando el porcentaje de flavonoides totales expresado en hiperósido, siguiendo el método de la Real Farmacopea Española (2002), realizando las mediciones a 425 nm, el porcentaje obtenido fue de 0.39%, esto indica que hay 3.9 mg de hiperósido en cada gramo de extracto del material vegetal; la literatura es pobre en

cuanto a cuantificación de flavonoides en rizoma de Zarzaparrilla, sin embargo, se logró determinar en un estudio previo los resultados del porcentaje de flavonoides expresados en hiperósido obtenidos directamente del rizoma de Zarzaparrilla, reportando un valor de 0.0216% (Cruz, S., 2008); sin embargo en nuestro estudio, la determinación se realizó a partir del extracto, por lo que este dato constituye un primer reporte respecto del porcentaje de flavonoides calculados a partir del extracto del rizoma de Zarzaparrilla.

La cuantificación de antocianinas en *H. sabdariffa* se realizó por el método del pH diferencial debido al desplazamiento del equilibrio que sufren estas moléculas producto de la influencia del pH del medio. Han sido encontradas cuatro formas de antocianinas que coexisten en equilibrio: el catión rojo flavilium, la base azul quinoidal, la pseudobase incolora carbinol y la chalcona incolora. En medios fuertemente ácidos (valores de pH debajo de 2) las antocianinas existen predominantemente en su forma roja coloreada como catión flavilium. A valores de pH débilmente ácidos, neutros y básicos el carbinol y las formas de base quinoidal dominan al catión flavilium, así que el color destiñe y cambia de color rojo a azul. El método del pH diferencial, es un método práctico y sencillo, que permite cuantificar de una manera más precisa la concentración de antocianinas al hacer una corrección de las absorbancias de la muestra a diferentes valores de pH (1 y 4.5). La concentración de antocianinas fue calculada en función de la delfinidina-3-glucosido siendo de 33.93 mg/g, lo que significa que hay 33.93 mg de delfinidina-3-glucosido por cada gramo de extracto; se calculó en función de esta antocianina ya que es una de las más comunes en la naturaleza. En un estudio previo se determinó la concentración de antocianinas en un extracto metanólico acidificado con HCl y de un extracto acuoso, siendo las concentraciones reportadas de 3.65 mg/g y de 1.73 mg/g de muestra de cálices secos respectivamente (Galicia, L., Salinas, Y., et. al., 2008), en nuestro estudio la determinación se realizó a partir del extracto seco.

La cuantificación de taninos en *R. mangle* se realizó por el método tungsto-molibdico-fosfórico, las mediciones se realizaron a 700 nm, como solución de referencia se empleo ácido tánico y como solución reactante el reactivo de taninos (tungstato de sodio dihidratado + ácido fosfomolibdico + ácido fosfórico). El porcentaje de taninos obtenido fue de 39.61%, lo que indica que hay 396.1 mg de taninos en 1 g de extracto del material vegetal. La literatura disponible en cuanto a la cuantificación de taninos en corteza de mangle es poca, sin embargo, se logró determinar en un estudio previo los resultados del porcentaje de taninos obtenidos directamente del material vegetal, reportando un valor de 16% (Pérez, T., Rodríguez, Y., et. al., 2011); en nuestro estudio, la

determinación se realizó a partir del extracto, por lo que este dato constituye otro primer reporte respecto del porcentaje de taninos calculados a partir del extracto de corteza de mangle.

Como la presencia de los metabolitos secundarios es variable en cada especie y depende de la época de recolección, estado fenológico de la especie, clima, suelo, altitud, etc., no se pueden comparar con otras especies vegetales, por lo que para establecer los límites máximos y mínimos de los metabolitos de interés para cada especie, se debería realizar un estudio incluyendo algunas de las variables mencionadas más importantes, para determinar si es aceptable o no el porcentaje determinado y de esta manera garantizar la calidad en las especies, siempre y cuando sean estos metabolitos los que se utilicen como marcadores.

En el cuadro 6 se pueden observar las longitudes de onda de máxima absorbancia de cada extracto de estudio y de los tres colorantes sintéticos de referencia, todos en medio de etanol/HCl. Al compararlos se pudo determinar que el colorante artificial rojo No. 40 (507 y 315 nm), presentó bandas similares a los extractos de las tres plantas de estudio; mientras que el amarillo No. 5 (260 nm) y amarillo No. 6 (313 nm), presentaron bandas similares a los extractos de Zarzaparrilla y Mangle. En el cuadro 7 se pueden observar los equivalentes de concentración de los colorantes de estudio en función de los colorantes sintéticos de referencia en el mismo medio anteriormente citado. Se evidenció que el extracto de Zarzaparrilla fue el que presentó mayor concentración equivalente al rojo No. 40, con una concentración de 596.47 mg/g de extracto, seguido por el extracto de Mangle con 263.32 mg/g. El extracto que presentó mayor concentración equivalente al amarillo No. 5 y amarillo No. 6 fue la Zarzaparrilla con 134.32 mg/g y 640.96 mg/g respectivamente.

En el cuadro 8 se pueden observar las longitudes de onda de máxima absorbancia de cada extracto de estudio y de los tres colorantes sintéticos de referencia, en medio de buffer pH3. Al compararlos se pudo evidenciar que el colorante artificial rojo No. 40 (306 y 510 nm), presentó bandas similares a los extractos de las tres especies de estudio; mientras que el amarillo No. 5 (306 nm), presentó banda similar al extracto de Zarzaparrilla y Mangle. En el cuadro 9, se pueden observar los equivalentes de concentración de los colorantes de estudio en función de los colorantes sintéticos de referencia en el mismo medio anteriormente citado. Se evidenció que el extracto de Zarzaparrilla fue el que presentó mayor concentración equivalente al rojo No. 40, con una concentración de 235.81 mg/g de extracto, seguido por el extracto de Mangle con 184.81 mg/g. El extracto que presentó mayor concentración equivalente al amarillo No. 5 fue la Zarzaparrilla con 12.46 mg/g de extracto.

En el cuadro 10 se pueden observar las longitudes de onda de máxima absorbancia de los extractos de estudio y de los tres colorantes sintéticos de referencia, todos en medio de buffer pH 4. Al compararlos se evidenció que el colorante artificial rojo No. 40 (511 nm), presentó banda similar a los extractos de las tres especies de estudio; mientras que el amarillo No. 5 (429 nm) y amarillo No. 6 (483 nm), presentaron bandas similares a los extractos de Zarzaparrilla y Mangle. En el cuadro 11, se pueden observar los equivalentes de concentración de los colorantes de estudio en función de los colorantes sintéticos de referencia en el mismo medio anteriormente citado. Se evidenció que el extracto de Zarzaparrilla fue el que presentó mayor concentración equivalente al rojo No. 40, con una concentración de 198.04 mg/g de extracto. El extracto que presentó mayor concentración equivalente al amarillo No. 5 y amarillo No. 6 fue la Zarzaparrilla con 20.64 mg/g y 6.17 mg/g respectivamente.

En el cuadro 12 se pueden observar las longitudes de onda de máxima absorbancia de los extractos de estudio y de los tres colorantes sintéticos de referencia en medio de buffer pH 5. Al compararlos se pudo evidenciar que el colorante artificial rojo No. 40 (306 y 509 nm), presentó bandas similares a los extractos de las tres especies de estudio; mientras que el amarillo No. 5 (305 nm) y amarillo No. 6 (306 nm), presentaron bandas similares a los extractos de Zarzaparrilla y Mangle. En el cuadro 13, se pueden observar los equivalentes de concentración de los colorantes de estudio en función de los colorantes sintéticos de referencia; se evidenció que el extracto de Zarzaparrilla fue el que presentó mayor concentración equivalente al rojo No. 40, con una concentración de 234.61 mg/g de extracto, seguido por el extracto de Mangle con 158.72 mg/g. El extracto que presentó mayor concentración equivalente al amarillo No. 5 y amarillo No. 6 fue la Zarzaparrilla con 10.59 mg/g y 8.02 mg/g respectivamente.

En el cuadro 14 se observan las longitudes de onda de máxima absorbancia de los extractos de estudio y de los tres colorantes sintéticos de referencia, todos en medio de buffer pH 7. Al compararlos se pudo evidenciar que el colorante artificial rojo No. 40 (506, 243 y 217 nm), presentó bandas similares a los extractos de las tres especies de estudio; mientras que el amarillo No. 5 (258 y 213 nm) y amarillo No. 6 (240 y 262 nm), presentaron bandas similares a los extractos de Zarzaparrilla y Mangle. En el cuadro 15, se pueden observar los equivalentes de concentración de los colorantes de estudio en función de los colorantes sintéticos de referencia en el mismo medio anteriormente citado. Se evidenció que el extracto de Zarzaparrilla fue el que presentó mayor concentración equivalente al rojo No. 40, con una concentración de 790.83 mg/g de extracto, seguido por el extracto de Mangle con 550.97 mg/g. El extracto que presentó mayor concentración equivalente al amarillo No. 5 fue la Zarzaparrilla con 167.02 mg/g de extracto;

finalmente el extracto que presentó mayor concentración equivalente al amarillo No. 6 fue la Zarzaparrilla con 153.35 mg/g.

Para la realización de los cálculos únicamente se tomaron en cuenta las muestras en las que la longitud de onda de máxima absorbancia fue similar o aproximada a la longitud de onda de máxima absorbancia de un colorante artificial. La longitud de onda en común fue usada para elaborar las diferentes curvas de calibración usadas para obtener los equivalentes de concentración (ver anexo 8). Se pudo observar un cambio de las longitudes de onda de máxima absorbancia al realizar las lecturas a los diferentes pH (3, 4, 5 y 7), presentando un desplazamiento mayor, respecto al observado inicialmente en los extractos etanólicos, lo cual demuestra que cambios de pH afectan los máximos de absorción de los espectros obtenidos con disolventes como el etanol.

La coloración constituye un elemento subjetivo para la evaluación de la calidad de un producto; esta frecuentemente relacionada con la presencia de impurezas, la calidad tecnológica, condiciones de almacenamiento e invasión bacteriana. Desde el punto de vista tecnológico se busca obtener un poder colorante seguro, estable, reproducible y eficaz; utilizando la dosis más pequeña de colorante. Es importante mencionar que las cantidades de colorante utilizado en sistemas alimenticios son menores en relación a las utilizadas en sistemas cosméticos, farmacéuticos y en la industria textil (Multon, 2000).

Actualmente, el mundo se ve invadido por una tendencia ecológica o de protección al medio ambiente, lo que está modificando muchos patrones de comportamiento, incluyendo las corrientes de la moda y así se empieza a escuchar cada vez más de los "ecotextiles". En esta moda ecológica se contempla entre otros requisitos, el teñido con tinte naturales (Lock, 1997). Por lo que para evaluar el potencial tintóreo de las especies de estudio, se procedió a realizar la técnica de tinción utilizando tres formas, método directo en frío, método directo en caliente y método indirecto con mordiente. Se aplicó el ensayo usando dos concentraciones diferentes con el objetivo de comparar la capacidad tintórea de los extractos; se observó en todos los casos una dependencia de la intensificación del color con respecto a la concentración del extracto, además de una intensificación del color con la técnica en caliente y utilizando mordiente.

En el cuadro 16 se pueden observar los resultados de la tinción en lana de los diferentes extractos, las concentraciones ensayadas fueron del 1 y 10 %, con la primera concentración se obtuvieron coloraciones tenues. De las tres plantas ensayadas a concentración del 1%, la Zarzaparrilla y el Mangle presentaron la coloración más intensa, con coloraciones entre el crema al

café, la Rosa de Jamaica presentó las coloraciones más tenues, con coloraciones entre el crema al rosado.

De las tres plantas ensayadas a concentración del 10%, la Rosa de Jamaica presentó la coloración más intensa, con coloraciones entre el rojo y el rosado. La Zarzaparrilla presentó coloraciones entre el amarillo al café. Mientras que el Mangle con coloraciones más tenues se situó entre el crema al amarillo (ver cuadro 16).

En el caso de la Zarzaparrilla, se ha reportado que las raíces de varias especies del género se han utilizado como colorantes de refrescos, pero no se indica su uso como tinte en fibras. En un estudio previo se ensayó el extracto del rizoma de Zarzaparrilla en fibras, siguiendo la misma metodología descrita en este informe (Cruz, S., 2008), las coloraciones obtenidas estuvieron comprendidas entre en el mismo rango descrito con anterioridad, dando un indicio de la posible reproducibilidad de las coloraciones que se pueden obtener al emplear este extracto como tinte en fibras.

Está bien descrito en la literatura el uso del colorante obtenido a partir de los cálices de la Rosa de Jamaica como corrector organoléptico en refrescos, ya que brinda un color rojo vistoso y un sabor agradable; sin embargo, no se reporta su uso en la tinción de fibras, por lo que este dato constituye un primer reporte para el uso de esta especie.

En el caso del Mangle, casi todos los reportes se enfocan en el poder curtiente de pieles que tienen la corteza y la raíz, debido a su contenido de taninos; se encontró además el uso del extracto en la tinción de cuerdas, redes y sedales. En este estudio se demostró la capacidad tintórea del extracto de la corteza de mangle en fibras textiles, por lo que representa otro aporte importante de nuestro estudio en el uso de la especie.

De acuerdo a los resultados obtenidos se demostró el potencial de las tres especies como plantas tintóreas, sin embargo faltaría realizar pruebas fisicoquímicas y fisicomecánicas para determinar la resistencia y solidez del tinte en las fibras.

Igualmente por la tendencia de la cosmética hacia lo natural se realizaron pruebas de coloración en tres productos cosméticos diferentes. Se escogieron tres cosméticos cuya base es el agua: Gel, shampoo y loción, para realizar las pruebas de coloración. Debido a que los extractos eran de tipo etanólico, estos debían disolverse completamente en cada cosmético para poder ser incorporados. Se elaboraron los cosméticos como base, para después ser coloreados en pequeñas porciones con los extractos.

Las concentraciones de los extractos fueron de 1%, 2.5% y 5%, para poder observar la gama de tonalidades de colores de los diferentes extractos vegetales, a tres diferentes concentraciones, los

cuales solamente se utilizaron para colorear el cosmético, es decir hacer más atractiva su presentación, y no con fines de pigmentación, es decir que el cosmético no coloree la piel al ser aplicado (esmalte de uñas, tinte capilar, sombras, etc.); por lo anterior, se seleccionaron concentraciones debajo de 5%, pero la seleccionada dependerá del formulador.

Los colorantes de origen animal y vegetal han sido casi totalmente sustituidos por los derivados orgánicos sintéticos del alquitrán, conocidos como anilinas, los cuales deben ser perfectamente adecuados no solo en su aspecto técnico (pureza de tonos, compatibilidad entre el pH del colorante y del cosmético, etc.), sino medico para evitar efectos tóxicos, irritantes o sensibilizantes. Sin embargo, actualmente el uso de sustancias provenientes de la naturaleza, han tomado auge, tal es el caso de los cosméticos naturales o verdes, donde todas las materias primas involucradas son de origen vegetal, o los llamados fitocosméticos que incluyen dentro de su formulación uno o más componentes de origen vegetal.

En el presente estudio se demostró que los extractos de las tres plantas de estudio, son efectivas para ser utilizadas como colorantes en cosméticos y además pueden proveer otras propiedades propias de cada planta dependiendo de su composición química y actividad farmacológica.

El pH es importante en un cosmético, ya que éste al ser aplicado en la piel, debe de tener el valor igual a la parte de la piel donde se aplique (cuero cabelludo, uñas, dermis, etc.). El colorante influye de manera significativa en la variación de pH, estabilidad del cosmético (separación de fases en emulsiones, etc.), como se observa en los resultados los valores de pH en gel, loción y shampoo, son diferentes en las pruebas realizadas en los extractos vegetales y por lo tanto en la formulación debe incluirse correctores de pH (ácidos o bases, según el caso), para poder observar el color del cosmético final; no se consideró en esta investigación debido a que el propósito de la misma era determinar el uso en cosméticos no diseñar una formulación con los mismos.

La evaluación del color es subjetiva, ya que se realizó de forma visual al comparar el color del cosmético con un pantone, en este trabajo se analizaron los resultados usando un pantone de pinturas de la marca COMEX, debido a que es fácil de conseguir; sin embargo los datos deberían haberse analizado usando un pantone con los códigos internacionales de colores, el cual no se pudo adquirir.

De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo observar que al diluir el extracto al 2.5% se obtuvieron colores más brillantes y con mayor intensidad, que se incorpora bien a las diferentes bases de los cosméticos. El extracto diluido al 1% presentó coloraciones más tenues, menos intensas y menos brillantes, como la concentración del extracto es más baja, la incorporación a la base del cosmético fue más sencilla. El extracto diluido al 5% dio coloraciones más fuertes, con

menor intensidad y menor brillantes, en cuanto a la incorporación a la base del cosmético, se mezcló bien.

En el extracto de Zarzaparrilla se observaron tonalidades naranja a café en el gel, amarillo a anaranjado en la loción, en el caso del shampoo por el incremento del pH se presentaron tonalidades más intensas que se desplazaron al color rojo (ver cuadros 17, 18 y 19); en dicha especie se ha reportado actividad cicatrizante y antiinflamatoria, la cual se podría aprovechar para incorporar el extracto en cremas antiarrugas y cicatrizantes y por su propiedad antifúngica se podría incorporar en geles para los pies, por su actividad antimicrobiana podría emplearse como preservante y por la presencia de flavonoides, que han demostrado actividad antioxidante, se podría incorporar en cremas antiedad o agentes antisolares como fotoprotectores.

En el extracto de Rosa de Jamaica se observaron tonalidades rosadas azuladas en el gel (pH7), rosado a rojo en el caso de la loción, en el caso del shampoo por el incremento del pH se presentaron tonalidades amarillas a verde (ver cuadros 20, 21 y 22). Debido a que el metabolito mayoritario son antocianinas, la coloración vario de tonalidades rojas para pH ácidos, y azulados e incoloros para pH neutro. En esta especie se ha reportado actividad antiinflamatoria y actividad antioxidante, lo cual podría emplearse como preservante o incorporarse en cremas antiedad o agentes antisolares como fotoprotectores.

En el extracto de Mangle se observaron tonalidades amarillas en el gel y loción, en el caso del shampoo por el incremento del pH se presentaron tonalidades más intensas con un marcado desplazamiento hacia el color rojo (ver cuadros 23, 24 y 25); en dicha especie se ha reportado actividad cicatrizante debido a la presencia de taninos, lo cual podría emplearse en cremas cicatrizantes; también se ha reportado actividad antioxidante, por lo que podría emplearse como preservante en formulaciones cosméticas o incorporarse en cremas antiedad o en protectores solares.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede visualizar el potencial cosmético en las tres especies como colorante, ya que presentaron colores interesantes para la industria, en su mayoría amarillo-naranja-rojo, cuando se incorporaron a las diferentes bases evaluadas a una concentración del 1 a 2.5% lo cual es algo rentable; por lo que se debe de continuar con el diseño de formulaciones para evaluar la estabilidad y aprovechar las propiedades reportadas para su estudio y validación en una indicación específica (antioxidante, preservante, cicatrizante, antiarrugas, fotoprotectoras, etc.).

Según los resultados obtenidos en el estimado de costos de producción de los colorantes naturales y el precio de venta de los colorantes sintéticos disponibles en el mercado, se observa

una marcada diferencia. Sin embargo la mayoría de los colorantes artificiales poseen restricciones de uso y algunos se encuentran restringidos en productos específicos por los efectos adversos y toxicidad que presentan aun en bajas concentraciones.

El rojo No. 40 se encuentra restringido en alimentos que contienen grasas, además se han reportado estudios toxicológicos mostrando resultados contradictorios sobre su efecto mutagénico y teratogénico, y en la Unión Europea no está permitido.

Para los colorantes amarillos la FDA establece que debe especificarse su uso en la etiqueta de los productos, especialmente en el caso del amarillo No. 6 que puede provocar severas reacciones alérgicas. En el caso del amarillo No. 5 no debe especificarse su nombre como tal en la etiqueta, sin embargo puede provocar reacciones alérgicas en algunas personas, particularmente en aquellas que son sensibles a la aspirina. Por lo que se justifica la investigación en colorantes naturales, por no mostrar efectos dañinos a la salud y no necesitar certificación para ser utilizados en procesos industriales, lo cual les confiere importantes ventajas, además de las propiedades que presentan las especies vegetales como agentes antioxidantes, antimicrobianas, cicatrizantes, etc.

Es por ello que en años recientes se ha renovado el interés por los colorantes naturales debido a las limitaciones cada vez mayores en el uso de algunos colorantes sintéticos en alimentos, medicamentos y en productos cosméticos debido a su toxicidad. Son frecuentes las denuncias por el uso de los colorantes no adecuados en estos productos de uso humano, esto ha originado un considerable interés mundial en el desarrollo de los colorantes naturales. Un indicativo de ello, es el número de distribución de las patentes reportadas a nivel mundial, en los últimos años de un total de 427 patentes 356 están referidas a colorantes naturales y 71 a colorantes sintéticos (Lock, O., 1997).

Se evaluó la estabilidad de los colorantes presentes en los extractos de estudio en diferente medio de reconstitución (etanol/HCl, buffer pH3, buffer pH4, buffer pH5, buffer pH7) donde las muestras presentaron el mismo valor de longitud de máxima absorbancia en la región visible del espectro electromagnético que alguno de los colorantes sintéticos de referencia (Rojo No. 40, Amarillo No. 5, Amarillo No. 6) y a 40 °C, para mantener las muestras a esta temperatura se colocaron en una cámara climática, la cual permaneció conectada durante todo el transcurso del ensayo. Antes de iniciar la prueba, se midió la absorbancia inicial de cada extracto y de cada colorante de referencia a un pH específico y se monitoreo cada día que duro el mismo, el parámetro usado para suspender el ensayo fue hasta que la absorbancia de las muestras aumentará o disminuyera un 20% del valor inicial (indicador de inestabilidad).

Puede observarse en los gráficos descriptivos de estabilidad que las muestras de los tres extractos fueron equiparables al rojo No. 40 cuando se midieron las absorbancias en medio etanol/HCl, buffer pH3, buffer pH4, buffer pH5 y buffer pH7. El extracto de Rosa de Jamaica presentó un comportamiento semejante al rojo No. 40 en medio de buffer pH3, pH4 y pH5; mientras que la Zarparrilla presentó un comportamiento similar al mismo colorante en medio de pH3, pH4, pH5, en medio pH7, el colorante sintético presentó inestabilidad al segundo día de monitoreo, sin embargo la zarzaparrilla presentó estabilidad por ocho días. En el gráfico 4 puede observarse que el extracto de Zarparrilla presentó comportamiento similar al colorante sintético amarillo No. 6 cuando se midieron las absorbancias en medio etanol/HCl. La inestabilidad de los extractos se debe a la aglomeración de sustancias en partículas que al principio son imperceptibles al ojo humano, pero que si son evidentes espectrofotométricamente.

Según lo discutido anteriormente, estos extractos podrían ser usados para colorear sistemas alimentarios, farmacéuticos o cosméticos formulados a pH 3, 4, 5 y 7, que incluyan en su formulación un sistema de buffer que asegure el pH del sistema hasta el momento del consumo o uso. Entre los sistemas alimentarios que se podrían formular pueden mencionarse las bebidas refrescantes sin alcohol, frutas enlatadas y conservas de frutas.

Con respecto al tiempo en que permanecen estables a condiciones extremas, antes de alcanzar el 80% de concentración; el extracto de que se perfila como el más promisorio es el de Rosa de Jamaica, ya que en la mayoría de pH's permaneció estable por lo menos diez días, otro extracto que mantuvo su concentración por arriba del 80% fue el de Zarparrilla a pH5, que permaneció sobre dicho porcentaje por lo menos durante 13 días. La mayoría de muestras a diferente pH mantuvieron estabilidad por dos días, comparados con los colorantes sintéticos.

Todo lo discutido sobre la estabilidad de los extractos vegetales estudiados, permite recomendar condiciones especiales de almacenamiento de los productos finales en que pudieran utilizarse, como por ejemplo: uso de frascos ámbar de vidrio por la propiedad fotosensible de los flavonoides, antocianinas y taninos, metabolitos responsables del color observado en los mismos. Almacenamiento a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) o en refrigeración ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$), dependiendo el uso y la formulación del sistema cosmético, farmacéutico o alimenticio.

En este estudio se evaluó el potencial antioxidante de los extractos de las tres plantas de estudio para determinar su aplicación agroindustrial; la actividad antioxidante se evaluó por medio de tres métodos, uno cualitativo y dos cuantitativos. El primero que se realizó fue el cualitativo ya que si los extractos no presentaban actividad antioxidante de forma cualitativa no se aplicarían los métodos cuantitativos. El ensayo cualitativo se realizó por cromatografía en capa fina (TLC) usando

como revelador DPPH, los resultados obtenidos para todos los extractos fueron positivos para actividad antioxidante, los estándares empleados fueron: Terbutilhidroquinona (TBHQ), rutina, quercetina, ácido ascórbico, β -caroteno y trolox, los cuales también dieron positiva la prueba. Estos estándares son en su mayoría metabolitos secundarios de plantas que pueden estar presentes en los extractos de las especies de estudio y pueden estar relacionados con la actividad que presentan; únicamente el TBHQ es un antioxidante sintético.

La cuantificación se realizó por espectrofotometría UV/Vis, usando el método con 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), para la detección de la actividad antioxidante de moléculas de tipo polar; y el ensayo de decoloración del radical catiónico del reactivo ácido 2,2-azinobis-(ácido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), que permite la determinación de la actividad antioxidante de moléculas de tipo apolar. En el cuadro 28 y gráfico 16 se observan los resultados de la actividad antioxidante por el método DPPH, se expresaron los resultados por CI_{50} (mg/ml) que indica la concentración del extracto que inhibe la concentración del 50% de los radicales que forman la oxidación; para la determinación del CI_{50} se empleó la ecuación de la recta para cada extracto, elaborada a partir de diferentes diluciones. Se determinó que la mejor actividad antioxidante la presentó el extracto etanólico de Zarparrilla, ya que inhibió el 50% de los radicales con la cantidad más pequeña de extracto (0.20 mg/ml), seguido por el extracto de Mangle con un CI_{50} de 0.26 mg/ml. El extracto de Rosa de Jamaica necesitó 4.09 mg/ml de extracto para inhibir el 50% de los radicales oxidantes. Al comparar los resultados de los extractos con los de los estándares de referencia se puede observar que los estándares presentan una actividad antioxidante superior a los mismos.

En el cuadro 29 y gráfico 17 se observan los resultados de la actividad antioxidante de los extractos medidos en base al método ABTS expresándolos también en base al CI_{50} (mg/ml), para determinarlo se empleó la ecuación de la recta para cada extracto, elaborada a partir de diferentes diluciones. Con este método se pudo observar que se detectó una menor actividad antioxidante en los extractos que con el método DPPH; esto indica que los compuestos con características apolares que están presentes en cada uno de los extractos presentan actividad antioxidante inferior al de los compuestos polares. Se determinó que la mejor actividad antioxidante la presentó el extracto etanólico de Zarparrilla con un CI_{50} de 0.24 mg/ml, seguido por el extracto de Mangle con un CI_{50} de 0.41 mg/ml. El extracto de Rosa de Jamaica necesitó 7.92 mg/ml para inhibir el 50% de los radicales antioxidantes. Al analizar los estándares en base a este método se puede observar que la vitamina C, la quercetina y el TBHQ presentaron mejor actividad antioxidante que los extractos de estudio.

En el cuadro 29 y gráfico 18 se observan los resultados de la actividad antioxidante de los extractos en base a equivalente de Trolox (TEAC), el cual es una sustancia de referencia. Se pudo observar que la cantidad más elevada de TEAC se encontró en *S. domingensis*, mismo extracto que reporto los mejores resultados de actividad antioxidante en base al CI_{50} , con ambos métodos de cuantificación citados anteriormente. Con esto se puede determinar que el extracto de Zarzaparrilla presenta el mayor número de equivalentes de Trolox para una actividad antioxidante, seguida por el extracto de Mangle, ambos fueron analizados a la misma dilución de estudio (0.02), el extracto de Rosa de Jamaica fue el que presentó menor actividad antioxidante y para la realización del cálculo de equivalente de Trolox se uso una dilución diferente a la de los extractos anteriores (0.12), por lo que presentó el menor número de equivalentes de Trolox.

Tomando como base los resultados reportados por ambos métodos cuantitativos para evaluar la actividad antioxidante de los extractos, se puede justificar el uso del extracto de rizoma de Zarzaparrilla y de la Corteza de Mangle, como antioxidantes naturales en preparados cosméticos, farmacéuticos o alimenticios. El extracto de Rosa de Jamaica, presentó menor actividad antioxidante, pero se demostró que puede ser usado para tales fines.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 Se identificaron los flavonoides en el rizoma de Zarzaparrilla (*S. domingensis*), como los metabolitos responsables del color, para el caso de los cálices de la Rosa de Jamaica (*H. sabdariffa*), se identificaron las antocianinas; y para la corteza de Mangle (*R. mangle*), los metabolitos identificados fueron los taninos.
- 10.2 El extracto de Mangle (*R. mangle*) corteza presentó el mayor rendimiento de extracción (44%), seguido por el extracto de Zarzaparrilla (*S. domingensis*) rizoma (32%), el menor rendimiento lo presentó la Rosa de Jamaica (*H. sabdariffa*) cálices con un (11%).
- 10.3 En el extracto de *S. domingensis* (Zarzaparrilla) se identificó la presencia de flavonoides, antocianinas y posible presencia de flavanonas, la TLC reveló la presencia de ácido clorogénico y ácido caféico.
- 10.4 La caracterización cromatográfica de antocianinas en el extracto de Rosa de Jamaica, permitió la identificación de la antocianina responsable de la coloración rojiza de los cálices de la Rosa de Jamaica, la delfinidin-3-xilosilglucósido (hibiscina).
- 10.5 En el extracto de *R. mangle* (mangle) se identificó la presencia de taninos de tipo catecol o condensados al dar una coloración negro-grisáceo con cloruro férrico.
- 10.6 La cuantificación de los metabolitos de interés en el extracto de *S. domingensis* se realizó determinando el porcentaje de flavonoides totales expresados en hiperósido, presentando un valor de 0.39%.
- 10.7 La cuantificación de los metabolitos de interés en el extracto de *H. sabdariffa* se realizó por el método del pH diferencial, el cálculo de la concentración de antocianinas se realizó en función de la delfinidina-3-glucosido siendo de 33.93 mg/g de extracto.
- 10.8 La cuantificación de los metabolitos de interés en el extracto de *R. mangle* se realizó por el método tungsto-molibdico-fosfórico, dando un valor de 39.61% de taninos.

- 10.9 Se observó en todos los extractos, en las pruebas de tinción el color se intensificó con la técnica en caliente y utilizando mordiente y al aumentar la concentración del mismo (1 y 10%)
- 10.10 De las tres plantas ensayadas a concentración al 1% en las pruebas de tinción, la Zarzaparrilla y el Mangle presentaron la coloración más intensa, con coloraciones entre el crema al café, la Rosa de Jamaica presentó las coloraciones más tenues, con coloraciones entre el crema al rosado.
- 10.11 De las tres plantas ensayadas a concentración del 10%, la Rosa de Jamaica presentó la coloración más intensa, con coloraciones entre el rojo y el rosado, la Zarzaparrilla presentó coloraciones entre el amarillo al café, mientras que el Mangle con coloraciones más tenues se situó entre el crema y el amarillo.
- 10.12 Se demostró el potencial de las tres especies como plantas tintóreas en textiles.
- 10.13 Se demostró que los extractos de las plantas en estudio, son efectivas para ser utilizadas como colorantes en cosméticos y además pueden proveer al cosmético otras propiedades propias de cada planta.
- 10.14 Se observó en las pruebas de coloración en cosméticos que al diluir el extracto al 1% dio coloraciones más tenues, menos intensas y menos brillantes, al diluir el extracto al 5% dio coloraciones más fuertes, con menor intensidad y menor brillantes, mientras que las coloraciones más brillantes y con mayor intensidad se lograron con el extracto diluido al 2.5%.
- 10.15 En el estudio de estabilidad puede observarse que las muestras de los tres extractos de estudio fueron equiparables al rojo No. 40 cuando se midieron las absorbancias en medio etanol/HCl, buffer pH3, buffer pH4, buffer pH5 y buffer pH7, la Rosa de Jamaica fue el que presentó el comportamiento más similar al colorante de referencia.
- 10.16 El extracto de Zarzaparrilla presentó un comportamiento similar al colorante sintético amarillo No. 6 cuando se midieron las absorbancias en medio etanol/HCl.

- 10.17 Con respecto al tiempo en que permanecen estables a condiciones extremas, el extracto que perfila como el más promisorio es el de Rosa de Jamaica, ya que en la mayoría de pH's permaneció estable por lo menos diez días, otro extracto que mantuvo su concentración por arriba del 80% fue el de Zarzaparrilla a pH5, que permaneció sobre dicho porcentaje por lo menos durante 13 días.
- 10.18 Se demostró el uso del extracto de rizoma de Zarzaparrilla y de la Corteza de Mangle, como antioxidantes naturales en preparados cosméticos, farmacéuticos o alimenticios. El extracto de Rosa de Jamaica, presentó menor actividad antioxidante, pero se demostró que puede ser usado para tales fines.
- 10.19 Se determinó mediante el método DPPH que la mejor actividad antioxidante la presentó el extracto etanólico de Zarzaparrilla, a una concentración inhibitoria media de 0.20 mg/ml, seguido por el extracto de Mangle con un CI_{50} de 0.26 mg/ml y el extracto de Rosa de Jamaica con un CI_{50} de 4.09 mg/ml.
- 10.20 Se determinó usando el método ABTS que la mejor actividad antioxidante la presentó el extracto etanólico de Zarzaparrilla con un CI_{50} de 0.24 mg/ml, seguido por el extracto de Mangle con un CI_{50} de 0.41 mg/ml y el extracto de Rosa de Jamaica con un CI_{50} de 7.92 mg/ml.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Realizar extracciones de los pigmentos vegetales identificados en las especies a escala piloto para transferir la tecnología a los diferentes sectores productivos.
- 11.2 Diseñar formulaciones cosméticas y/o medicinales utilizando las especies vegetales que presentaron las características ideales como colorante natural.
- 11.3 Evaluar las propiedades antioxidantes o preservantes de las especies en productos fitocosméticos, medicinales o alimenticios.
- 11.4 Caracterizar mediante pruebas fisicoquímicas y físico mecánicas las fibras teñidas con las especies vegetales, para determinar la potencialidad como especies tintóreas en textiles.
- 11.5 Establecer los parámetros de calidad de las especies, incluyendo las variables que afectan la producción de los metabolitos secundarios (clima, altitud, localidad, etc.).

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abilés, J. S. (2007). *Estrés Oxidativo y su Relación con el Aporte de Antioxidantes Nutricionales en el Paciente Crítico* (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada. Granada, España. 12-18.
- Alonso, J. (2004). *Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos*. Argentina: Editorial Corpus.
- Álvarez J. M. (2007). Tanino: La Revolución Enológica, Mito o Realidad. *Enología*, 4(2), 1-15.
- Arranz S. (2010). *Compuestos Polifenólicos (Extraíbles y no Extraíbles) en Alimentos de la Dieta Española: Metodología para su Determinación e Identificación* (Tesis de Doctorado). Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. 12-36.
- Arriaga I. (2007). *Caracterización, Extracción y Estabilidad de los Colorantes Naturales Presentes en el Cáliz de Hibiscus sabdariffa L. (Rosa de Jamaica) como Alternativa de Consumo del Colorante Artificial Rojo No. 40* (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 19-61.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales* (2a ed.). Zaragoza, España: Acribia, S.A. 355-356.
- Cáceres, A. (2006). *Vademecum Nacional de Plantas Medicinales*. Guatemala: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), Universidad de San Carlos de Guatemala. 185-222.
- Cerda, C., y Zález G. (s. f.) Implicaciones Fisiopatológicas del Estrés Oxidativo Fetal, 3(160), 303-325.
- Cevallos, B., y Cisneros, L. (2004). Stability of Anthocyanin based Aqueous Extract of Andean Purple Corn and Red Fleshed Sweet Potato Compared to Synthetic and Natural Colorants. *Food Chemistry*, 69-86.
- Cruz, S. (2008). *Identificación y Cuantificación de Colorantes Naturales en 5 Especies Vegetales Nativas* (Proyecto de Investigación). Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 78-104.

- De la Cruz, B. (2005). *Caracterización de Cinco Extractos de Plantas Medicinales Nativas de Guatemala, Validadas Científicamente* (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 1-78.
- Escamilla, Ch., Cuevas, E., y Fonseca, J. (2009). Flavonoides y sus Acciones Antioxidantes. *Medigraphic Artemisa*, 52(2), 73-75.
- Escobar, C. (2007). Estandarización de Dos Extractos del Rizoma de la Planta Zarzaparrilla (*Smilax domingensis*), Proveniente del Departamento de Santa Rosa, Para Desarrollo Fitofarmacéutico a Nivel de Laboratorio, Utilizando la Extracción por Percolación de Lecho Estático con 24 Horas de Reposo (Tesis de Licenciatura) Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 9-136.
- Fuentes, W. V. (2004). Extracción, *cuantificación y Estabilidad de Colorantes Naturales, Presentes en los Frutos de Prunus capulí, Rubus urticaefolius y Sambucus canadensis, como Alternativas de Consumo de los Colorantes Artificiales Rojo No. 40, No. 3 y No. 2, en Bebidas en el Rango de pH: 3, 4 y 5* (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 2-25.
- Galicia, L., Salinas, Y., et. al. (2008). Caracterización Físicoquímica y Actividad Antioxidante de Extractos de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) Nacional e Importada. *Chapingo Serie Horticultura*, 14(2), 121-129.
- Garzón, Gloria. (2008). Las Antocianinas como Colorantes Naturales y Compuestos Bioactivos: Revisión, 13(3), 27-36.
- Gattuso M. (1999). *Contribución personal*. Universidad Nacional del Rosario. Argentina.
- Gomez, E., et. al. (2006). Comparison of Chromatic Properties, Stability and Antioxidant Capacity of Anthocyanin-Based Aqueous Extracts from Grape Pomace Obtained From Different Vinification Methods. *Food Chemistry*, 2006(97), 87-94.
- Gutiérrez, Y., et. al. (2000). Validación de 2 Métodos Espectrofotométricos Para la Cuantificación de Taninos y Flavonoides (Quercetina) en *Psidium guajaba* L. *Revista Cubana Farmaceutica*, 34(1), 50-55.

- Hutchings, Jh. (1999). *Food Color and Appearance* (2a ed.) Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers.
- Jimenez, J. *Rhizophora mangle* L. Red mangrove. New Orleans, USA: Department of Agriculture, Forest Service. 450-453.
- Kuskoski, E., Asuero, A., et. al. (2004). Actividad Antioxidante de Pigmentos Antociánicos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 24(4), 691-693.
- Lock, O. (1997). *Colorantes Naturales*. Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial. Perú. 1-15.
- López, A. (2004). *Caracterización Morfológica y Fenológica de una Plantación de Zarzaparrilla (Smilax domingensis Willd), en el Municipio de Samayac, Suchitepequez*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 5-10.
- Martínez, A. (2005). *Flavonoides*. Medellín: Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmacéutica. 5-48.
- Marroquin A. (2008). *Obtención del Extracto Tánico por Maceración Dinámica de la Corteza de Árboles Jóvenes de Cuatro Especies Forestales, A Nivel de Laboratorio*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 1-152.
- Marroquin, M. (2011). *Comparación de la Actividad antioxidante, Detección y Cuantificación de Flavonoides y compuestos Fenólicos en Tres Especies de la Familia Passifloracea (Passiflora edulis, Passiflora incarnata, Passiflora ligularis)*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 5-29.
- Martínez, S., González, J., et. al. (2002). Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), 271-278.
- Mayor, R. (2010). Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Instituto de Medicina Tropical*, 5(2), 23-29.
- Mckee, T., Mckee J. (2003). *Bioquímica: La base de la vida*. (3a ed.). España: Editorial MacGraw Hill-Interamericana. 319-324.

- Moral, C. (1995). *Estudio de los Colorantes Alimentarios para su Aplicación en las Bellas Artes*. (Tesis de Doctorado). Universidad Complutense de Madrid. Madrid. 3-27.
- Pérez, T., Rodríguez, Y., et. al. (2011). Influencia de la preparación de la corteza de *Rhizophora mangle* L. en el proceso de extracción solido-liquido. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(1), 94-104.
- Quintanar, E., et. al. (2009). La Capacidad Antioxidante Total: Bases y Aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 28(3).
- Sánchez, J., Faure, R., et. al. (2009). Propiedades Antioxidantes de *Rhizophora mangle* L. y Su Relación Con el Proceso de Curación de Heridas en Ratas. *Salud Animal*, 31(3), 170-175.
- Satué, M. (1997). Anthocyanins as Antioxidants on Human Low-Density Lipoprotein and Lecithin-Liposome System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9), 3362-3366.
- Sáyago, S. y Goñi, I. (2010). *Hibiscus sabdariffa* L: Fuente de fibra antioxidante. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 60(1), 79-84.
- Standley and Steyermark. (1949). *Flora de Guatemala* (Vol. 24). Estados Unidos:Chicago Natural History Museum.
- Teleguario, C. (2008). Caracterización y Cuantificación de Flavonoides, Sapogeninas Esteroidales en Extractos de Tres Plantas Mesoamericanas *Lippia graveolens* (Óregano), *Passiflora edulis* (Maracuyá) y *Smilax domingensis* (Zarzaparrilla). (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 58-61.
- Tezén, P. (2008). *Determinación del Contenido Tánico en la Corteza de Cinco Especies Forestales Aprovechadas en el Aserradero de la Asociación de Cooperativas Forestales de Petén*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 21-23.
- Ugaz, O. (1997). *Colorantes Naturales*. Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

Wrolstad, R. (2000). Anthocyanins. In *Natural Food Coloran*. New York, Estados Unidos: Marcel Dekker, Inc. 237-252

12. ANEXOS

1. Fichas técnicas de las especies en estudio:

1.1. Zarzaparrilla (*Smilax domingensis* Willd.)

Nombres comunes:

Zarzaparrilla, Palo de Vida, Diente de Chucho, Cuculmecca, Uña de Gato (López, A., 2004, p. 5).



Taxonomía:

Nombre común:	Zarzaparrilla.
Nombre científico:	<i>Smilax domingensis</i> Willd.
Reino:	Plantae.
División:	Magnoliophyta.
Clase:	Liliopsida.
Orden:	Liliales.
Familia:	Smilacaceae.
Género:	Smilax.
Especie:	<i>S. domingensis</i> .

Descripción botánica:

Glabras completamente. Tallos teretes, escasamente armados en la parte inferior con aguijones robustos recurvados, inermes en la parte superior. Hojas 6 - 15 cm por 1.5 - 10 cm, 1.4 - 6 veces más largas que anchas, ovadas, lanceoladas-ovadas, o lanceoladas, cartáceas, inermes, 5 nervias desde la base, las nervaduras primarias prominentes en el envés, no impresas en el haz, el par exterior submarginal, las nervaduras secundarias conspicuas, algo prominentes, reticuladas, el ápice brevemente acuminado o brevicuspido, la base aguda, el margen entero; pecíolos 0.5-2

cm. Umbelas estaminadas solitarias; pedúnculo 1 - 5 mm, más corto que el pecíolo subyacente, subterete. Tépalos de las flores estaminados 4 - 6 mm; filamentos 2 - 4 mm; anteras 1 - 2 mm. Tépalos de las flores pistiladas 4 mm. Bayas 7 - 10 mm, rojas, purpuras o negras (Cáceres, A., 2006, p. 221).

Hábitat:

Crece en bosques o matorrales húmedos, desde cerca del nivel del mar hasta los 1,200 msnm; se ha descrito en Alta Verapaz, Escuintla, Izabal, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa (Cáceres, A., 2006, p. 221).

Historia:

Las *Smilax* del viejo mundo eran utilizadas por Dioscórides y Plinio. Los rizomas de zarzaparrilla fueron introducidas del Nuevo Mundo, a la medicina europea por comerciantes españoles del siglo XVI; de acuerdo con Monardes fue introducida por primera vez en Sevilla en 1,536 (Cáceres, A., 2006).

La zarzaparrilla tuvo buen mercado por su uso para el tratamiento de sífilis y una variedad de enfermedades que requería “purificación de la sangre”. En el siglo XVII; era recomendada por famosos clínicos como Doryce y Cullen, pero hacia principios del siglo XVIII dejó de usarse, posiblemente por adulteraciones. En 1,850 vuelve a tener importancia al incorporarse a la U.S. Pharmacopeia donde permanece para tratar sífilis hasta 1,950. Por una combinación de factores ha tenido una pérdida de popularidad, aunque pareciera seguir siendo una droga útil en el tratamiento de ciertas enfermedades crónicas (Cáceres, A., 2006, p. 221).

Droga vegetal:

Rizoma y raíces (Cáceres, A., 2006, p. 221).

Usos Medicinales Atribuidos:

Se usa por vía oral para el tratamiento de anemia, afecciones gastrointestinales (diarreas, dolor de estómago, inapetencia), hinchazón, malaria, dolor de riñones, enfermedades de la sangre y venéreas, hepatitis reumatismo y tumores (Cáceres, A., 2006, p. 221).

La decocción se aplica tópicamente para tratar afecciones dermatomucosas (alergias, eczema, liquen plano, tinea, psoriasis) (Cáceres, A., 2006, p. 221).

Otros usos:

Las raíces y rizomas de algunas especies del género se utilizan como colorantes de refrescos (Cáceres, A., 2006).

Composición química:

El tamizaje fitoquímico indica la presencia de alcaloides, aceite esencial, esteroides insaturados, glucósidos esteroidales (saponinas, cardenólidos, bufadienólicos), flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles, resinas, azúcares y grasas. Se han aislado agliconas esteroidales (parillina, sarsasapogenina, smilagenina), beta-sitosterol, stigmasterol, ácido sarsápico (Cáceres, A., 2006, p. 222).

Farmacognosia:

Las partes de interés medicinal son las raíces y rizomas secos. Microscópicamente es un polvo rojo-café, inodoro, consistente de células parenquimatosas rectangulares con gránulos esferoidales de almidón, hasta 30 μm de diámetro, gránulos poliédricos; exodermis de dos capas engrosadas, paredes amarillentas; células de hipodermis lignificadas; xilema de vasos y fibras lignificados con engrosamientos espirales (Cáceres, A., 2006).

La materia médica no debe contener más de 10% de ceniza, 4% de ceniza insoluble en ácido y no menos de 10% de extraíbles solubles en ácido (Cáceres, A., 2006).

La actividad antimicrobiana se atribuye a las saponinas, en particular a la sarsasapogenina y parillina. La parillina es una saponina neutra, peso molecular 1,000, cristales blancos, con actividad antimicótica y antitumoral. La sarsasapogenina tiene peso molecular de 416, son agujas prismáticas grandes al evaporar acetona, amarga, acrida, punto de fusión 199 °C, rotación óptica específica de -75 °C, soluble en alcohol, acetona, benceno, se precipita con digitonina; tiene actividad antiinflamatoria (Cáceres, A., 2006).

El extracto líquido de la raíz es de uso oficial en varios países. La zarzaparrilla es oficial en la USP desde 1,820; para 1,985, la zarzaparrilla era oficial en la mayoría de farmacopeas. Se comercializan

productos fitofarmacéuticos como polvo, tintura, extracto, jarabe, pomadas y ungüentos (Cáceres, A., 2006).

1.2. Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Nombres comunes:

Jamaica, Karkadé, Viñuela, Hibisco, Hibiscus, Pampola (Cáceres, A., 2006, p. 185).



Taxonomía:

Nombre común:	Rosa de Jamaica.
Nombre científico:	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.
Reino:	Plantae.
División:	Magnoliophyta.
Clase:	Magnoliopsida.
Orden:	Malvales.
Familia:	Malvaceae.
Genero:	Hibiscus.
Especie:	<i>H. sabdariffa</i> .

Descripción botánica:

Hierba leñosa, anual, erecta, 1 - 2 cm de alto, corteza roja, glabra. Hojas con peciolo cortos o largos, lóbulos angostos, borde aserrado; nervadura central; glándula grande cerca de la base en el envés. Flores con bractéolas unidas con el cáliz, acrescentes en la fructificación, forman una copa grande, carnosa, rojo oscura, pedículos cortos. Cáliz de 2 cm de largo y en número de 5; 5 pétalos, 4 - 5 cm de largo, amarillo pálido, estambres numerosos, ovario superior con 5 carpelos cerrados, placentación axial. Fruto en cápsula densamente estrigosa más corta que el cáliz (Cáceres, A., 2006, p. 185).

Hábitat:

Nativa de la India Oriental o Angola, naturalizada como maleza en América tropical, se cultiva en grandes extensiones de las partes secas del oeste de África Central, Sudán, México y la India. En Guatemala se cultiva en tierras bajas de Baja Verapaz, El Progreso, Izabal, Huehuetenango y Santa Rosa (Cáceres, A., 2006, p. 185).

Historia:

La primera mención de uso medicinal y culinario fue a través de Bontius en 1668. El hibisco fue introducido en Jamaica en el siglo XVII, siendo allí muy popular como aromatizante ácido, para cuyo fin empleaban los cálices de las flores. En Europa se introdujo a fines del siglo XIX como bebida refrescante, aunque su color sanguinolento no lo ha popularizado mucho. Sus flores características y su columna de estambres y estilo que sobresalen, representan uno de los símbolos de las islas tropicales como las de Hawai. Actualmente forman parte de ceremonias de devoción en la India, siendo sagrada dentro de ese contexto (Cáceres, A., 2006, p. 185).

Droga vegetal:

Flores y cálices (Cáceres, A., 2006, p. 185).

Usos medicinales atribuidos:

Vitamínico, aperitivo, digestivo, colagogo, demulcente, diurético, laxante, espasmolítico, vasoprotector, diurético, vasodilatador periférico, tranquilizante, antihelmíntico, antibacteriano, se utiliza en catarrros y resfríos (Cáceres, A., 2006, p. 185).

Usos alimenticios:

Se utiliza mucho como corrector organoléptico, ya que al incorporarla a infusiones otorga un vistoso color rojo y un agradable sabor ácido refrescante. Gracias a su calidad de aromatizante ácido puede ser incorporado a vinos, jaleas y salsas. El extracto puede ser utilizado en alimentos acuosos de pH ácido manteniendo su estabilidad en relación con el color. Suele prepararse un té muy agradable al sabor y un colorante rojo para totalizar otras tisanas (Alonso, J., 2004).

Otros usos:

Los tallos proporcionan una fibra excelente muy similar al yute, conocida con el nombre de cáñamo de hibisco, la cual resulta útil para el amarre y la elaboración de cordeles. La gosipetina es un colorante rojo, la gositrina amarillo y la hibiscina también rojizo, empleándose para teñir vinos y en diversas preparaciones farmacéuticas. El aceite de las semillas presenta baja viscosidad, lo cual es apreciado por los fabricantes de cosméticos (Alonso, J., 2004).

Composición química:

Presenta polisacáridos mucilaginosos casi en un 50% constituido por ácido urónico en forma de sal y el resto ramnosa, arabinosa y pequeñas cantidades de glucosa, xilosa y manosa. Ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, ácido hibístico, ácido málico, ácido oxálico y ácido tartárico. Contiene vitamina C, pectina, fitoesteroles, derivados flavónicos (gosipetina), ácido protocaténico (ácido fenólico). La raíz contiene principalmente ácido tartárico y saponinas, mientras que las semillas contienen fitoesteroles (Cáceres, A., 2006, p. 186).

Contiene otros polifenoles como flavonoides, por ejemplo: quercetina, miricetina, hibiscetina, hibiscitrina (Cáceres, A., 2006, p. 186).

Farmacognosia:

A los flavonoides y derivados antociánicos se les atribuye actividad diurética, colerética, disminuye la viscosidad de la sangre, reduce la presión sanguínea, estimula la peristalsis intestinal, sedante y laxante. La actividad antiflogística se atribuye al contenido de mucílago. Las antocianinas (delfidina, delfidina 3-sambubiósido, cianidin 3-sambubiósido) son los responsables del color vino tinto característico de la infusión. La antocianidina conocida como hibiscina (delfinidin-3-xilosilglucósido) es un colorante de vinos y de diversas preparaciones farmacéuticas, presenta además otro colorante rojo (gosipetina), así como colorante amarillo, la gositrina (Alonso, J., 2004).

1.3. Mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.)

Nombres comunes:

Mangle, Mangle Colorado, Mangle Tinto, Mangle Dulce, Candelón (Jiménez, J., s. f., p. 453).



Taxonomía:

Nombre común:	Mangle.
Nombre científico:	<i>Rhizophora mangle</i> L.
Reino:	Plantae.
División:	Fanerógama.
Clase:	Magnoliopsida.
Orden:	Malpighiales.
Familia:	Rhizophoraceae.
Genero:	Rhizophora.
Especie:	<i>R. mangle</i> .

Descripción botánica:

Forma: Árbol o arbusto perennifolio, halófito, de 1.5 a 15 m (hasta 30 m) de altura con un diámetro a la altura del pecho de hasta 50 cm.

Copa / Hojas: Copa redondeada. Hojas opuestas, simples, pecioladas, elípticas a oblongas, aglomeradas en las puntas de las ramas, de 8 a 13 cm de largo por 4 a 5.5 cm de ancho, coriáceas, lisas, gruesas; verde oscuras en el haz y amarillentas con puntos negros en el envés.

Tronco / Ramas: Tronco recto. Ramas apoyadas en numerosas raíces aéreas de origen adventicio, simples o dicotómicamente ramificadas, con numerosas lenticelas.

Corteza *Externa* de color olivo pálido con manchas grises, pero si se raspa adquiere un color rojo, inolora, amarga, dura, de textura lisa a rugosa y apariencia fibrosa, se desprende fácilmente en escamas. *Interna* de color rojo intenso, granulosa (con alto contenido de fibras y esclereidas). La corteza forma lenticelas hipertrofiadas en las partes sumergidas de tallos y raíces. Grosor total: 20 a 30 mm.

Flor(es): Inflorescencias simples, con 2 ó 3 flores, pedúnculos de 3 a 5 cm, flores actinomorfas; corola de 1.8 cm de diámetro; cáliz de 1.54 cm de diámetro; 4 sépalos, persistentes, amarillos, coriáceos, gruesos, de 4.1 mm de ancho; 4 pétalos no persistentes, blancos o amarillentos en la base y moreno rojizos arriba, de 2.6 mm de ancho.

Fruto(s): Baya de color pardo, coriácea, dura, piriforme, farinosa, de 2 a 3 cm de largo por 1.5 cm de ancho en la base, cáliz persistente. Se desarrolla una semilla, rara vez dos, por fruto.

Semilla(s): Una sola semilla germina en el interior del fruto (viviparidad). Los propágulos son frecuentemente curvos, de color verde a pardo en la parte inferior y presentan numerosas lenticelas.

Raíz: Raíces fulcreas, ramificadas, curvas y arqueadas. Destacan las modificaciones de sus raíces en prolongaciones aéreas del tallo como zancos o prolongaciones cortas que emergen del suelo llamadas neumatóforos.

Hábitat:

Habita las costas americanas del océano Pacífico en forma continua, desde el sur de Sonora y Baja California hasta Ecuador, incluyendo el Archipiélago Galápagos. En el océano Atlántico, se presenta en forma discontinua desde las costas de Florida hasta Brasil (Jiménez, J., s. f., p. 450).

Crece en ambientes de continuo movimiento de agua y salinidad variable (hipersalino a salobre). Su mejor desarrollo es en litorales someros, con poca pendiente donde la marea entra con mayor

facilidad. Se desarrolla en los sitios protegidos contra la acción del oleaje fuerte (Jiménez, J., s. f., p. 450).

Droga vegetal:

Corteza.

Usos medicinales atribuidos:

Corteza: Febrífugo, hemostático, antidiarréico, para el asma, hemoptisis, mordedura o picadura de animales marinos venenosos, diversas heridas, tuberculosis, lepra, hemorragias, disentería, elefantiasis (Jiménez, J., s. f., p. 450).

Hoja: Escorbuto, dolor de muelas, úlceras leprosas (Quintanar, E., 2009).

Raíz: La raspadura de las raíces es usada por los pescadores contra mordeduras de peces y picaduras de insectos venenosos (Jiménez, J., s. f., p. 453).

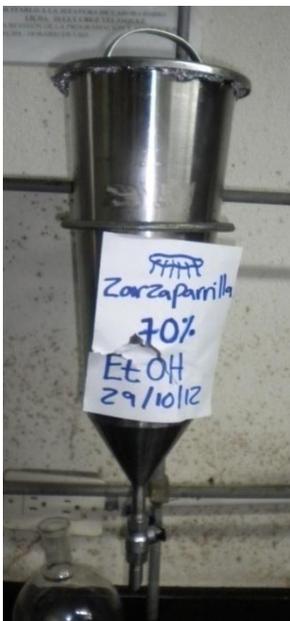
Los embriones son ricos en taninos y se emplean machacados y cocidos como astringentes (Jiménez, J., s. f.).

La planta tiene efecto anti-hiperglicémico y podría llegar a usarse clínicamente en el control de la diabetes mellitus (Jiménez, J., s. f., p. 453).

Composición química:

El extracto acuoso de la corteza de *Rhizophora mangle* se caracteriza por poseer una composición química compleja, destacándose la presencia de polifenoles (54.78 %), representados en su mayoría por taninos poliméricos (80 %) y taninos hidrolizables (20 %), destacándose la presencia en estos últimos de epicatequina, catequina, ácido clorogénico, ácido gálico y ácido elágico, además contiene galotaninos y elagitaninos. De las estructuras no tánicas, se refiere la presencia de carbohidratos (17.5 %) libres y enlazados; ácidos grasos (4.0 %) de cadena larga, saturados e insaturados; fitoesteroles (0.0285 %); componentes volátiles o semivolátiles (70 compuestos) (0.0205 %) y aromas o aceites esenciales no volátiles (Sánchez, J., et. al., 2009, p. 171).

2. Fotografías de percolación y rotavaporación para la obtención de los extractos:



3. Pruebas macrométricas en tubos para la detección de flavonoides:

3.1. Detección de flavonoides:

Extracto	Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	Cloruro férrico (FeCl ₃)	Ácido clorhídrico (HCl) + calor	Magnesio metálico (Mg ⁰) + HCl	Álcali	Ácido bórico en anhídrido acético	Resultado
<i>S. domingensis</i>	+	+	+	+	+	+	Positivo
<i>H. sabdariffa</i>	+	+	+	+	+	+	Positivo

Fuente: Datos experimentales. (+) Indica cambios de color y formación de precipitado comparado con el testigo.

3.2. *Smilax domingensis*:



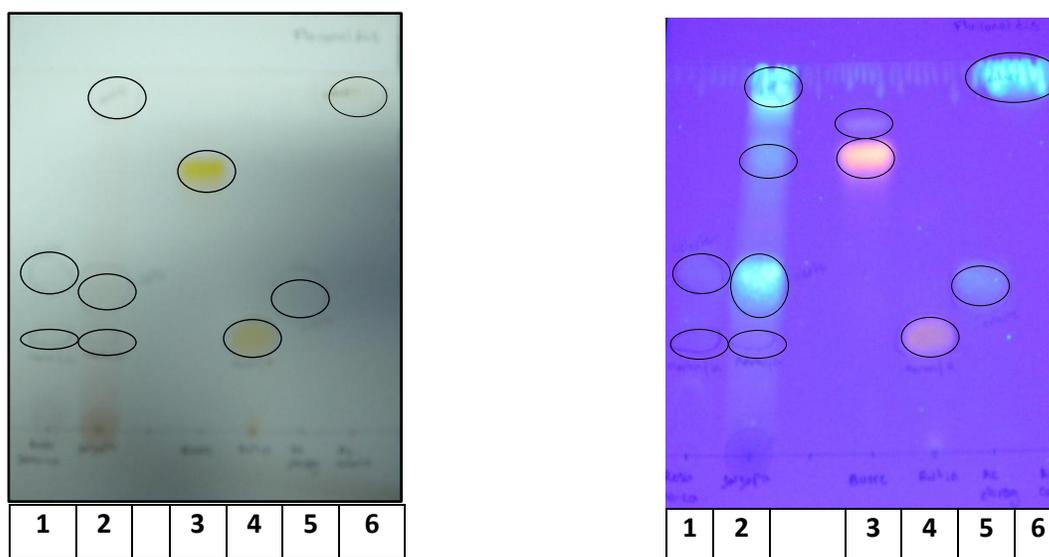
1. Testigo, 2. H₂SO₄, 3. FeCl₃, 4. HCl + calor, 5. Mg⁰ + HCl, 6. Álcali, 7. Ác. Bórico en anhídrido acético

3.3. *Hibiscus sabdariffa*:



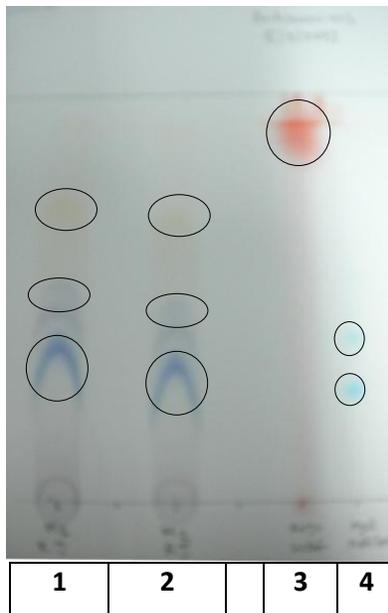
1. Testigo, 2. H₂SO₄, 3. FeCl₃, 4. HCl + calor, 5. Mg⁰ + HCl, 6. Álcali, 7. Ác. Bórico en anhídrido acético

4. Fotografías de cromatografía en capa fina (TLC) de la detección de flavonoides:



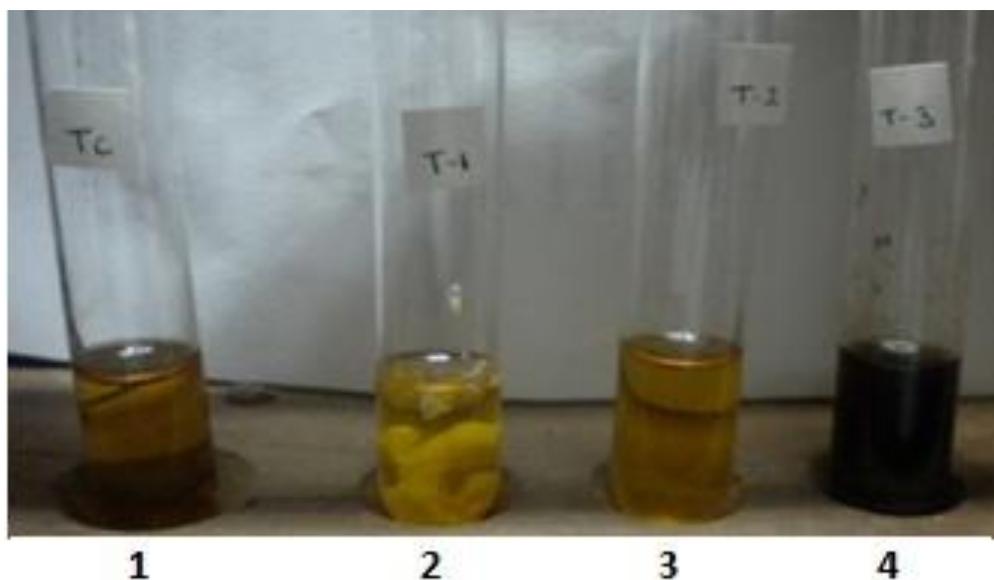
1. Rosa de Jamaica, 2. Zarparrilla, 3. Quercetina, 4. Rutina, 5. Ácido clorogénico, 6. Ácido caféico.

5. Fotografía de cromatografía en capa fina (TLC) de la determinación de antocianinas:



1. y 2. Muestras de Rosa de Jamaica, 3. Rojo Sudan, 4. Azul de Metileno.

6. Fotografía de prueba macrométrica en tubos para la detección de taninos en extracto de corteza de *R. mangle*:



1. Control, 2. Gelatina /NaCl, 3. Gelatina, 4. FeCl₃.

7. Determinación de la absorbancia máxima:

7.1. Etanol al 95% + HCl 0.1 N (85:15):

Muestra	Peso de muestra	Volumen de reconstitución*	Dilución empleada	Longitud de onda	Absorbancia máxima
<i>H. sabdariffa</i>	1.0064 g	10 ml	0.15:25	536	0.90837
<i>S. domingensis</i>	1.0428 g	10 ml	0.02:25	283	1.10540
				328	0.57711
<i>R. mangle</i>	1.0586 g	10 ml	0.02:25	283	0.51137
				329	0.19093
Rojo No. 40	0.05 g	50 ml	0.125/125	235	0.075459
				507	0.060304
				315	0.025927
Amarillo No. 5	0.05 g	50 ml	0.125/125	260	0.051306
				430	0.041448
Amarillo No. 6	0.05 g	50 ml	0.125/125	225	0.010110
				482	0.049088
				313	0.026563

7.2. Buffer pH3:

Muestra	Peso de muestra	Volumen de reconstitución*	Dilución empleada	Longitud de onda	Absorbancia máxima
<i>H. sabdariffa</i>	1.0064 g	10 ml	0.15:25	525	0.56840
<i>S. domingensis</i>	1.0428 g	10 ml	0.02:25	306	0.24708
<i>R. mangle</i>	1.0586 g	10 ml	0.02:25	306	0.13848
Rojo No. 40	50 mg	50 ml	0.125/125	306 430 510	0.075293 0.014855 0.054326
Amarillo No. 5	50 mg	50 ml	0.125/125	306 429	0.053970 0.041545
Amarillo No. 6	50 mg	50 ml	0.125/125	486	0.052317

7.3. Buffer pH4:

Muestra	Peso de muestra	Volumen de reconstitución*	Dilución empleada	Longitud de onda	Absorbancia máxima
<i>H. sabdariffa</i>	1.0064 g	10 ml	0.15:25	527	0.40601
<i>S. domingensis</i>	1.0428 g	10 ml	0.02:25	308 321 486	0.21075 0.19086 0.01003
<i>R. mangle</i>	1.0586 g	10 ml	0.02:25	325 486 430	0.071604 0.002451 0.001485
Rojo No. 40	50 mg	50 ml	0.125/125	511	0.047119
Amarillo No. 5	50 mg	50 ml	0.125/125	429	0.039610
Amarillo No. 6	50 mg	50 ml	0.125/125	483	0.053712

7.4. Buffer pH5:

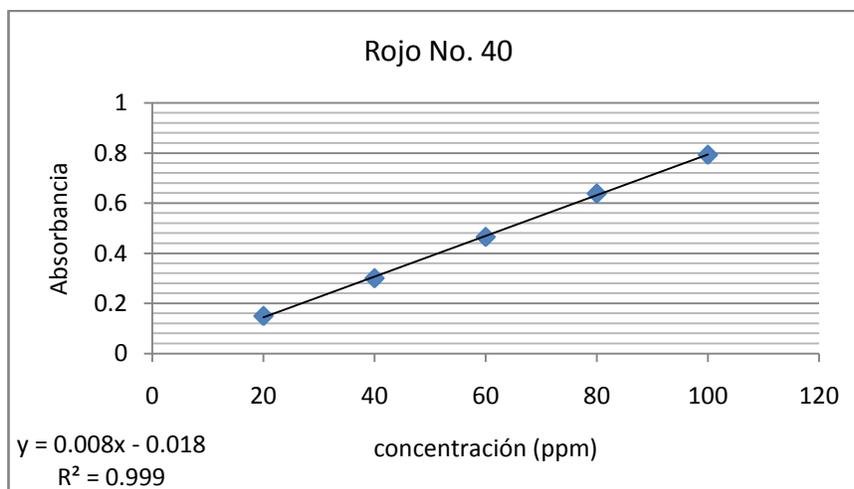
Muestra	Peso de muestra	Volumen de reconstitución*	Dilución empleada	Longitud de onda	Absorbancia máxima
<i>H. sabdariffa</i>	1.0064 g	10 ml	0.15:25	524	0.17986
<i>S. domingensis</i>	1.0428 g	10 ml	0.02:25	306 321	0.20835 0.19244
<i>R. mangle</i>	1.0586 g	10 ml	0.02:25	324	0.082607
Rojo No. 40	50 mg	50 ml	0.125/125	306 509 430	0.048212 0.045653 0.010721
Amarillo No. 5	50 mg	50 ml	0.125/125	256 305 430	0.48797 0.047756 0.037485
Amarillo No. 6	50 mg	50 ml	0.125/125	306 484	0.056831 0.050135

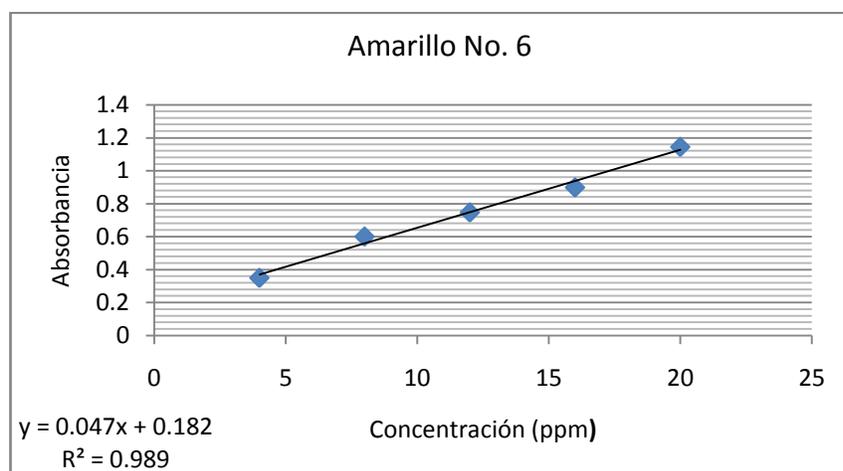
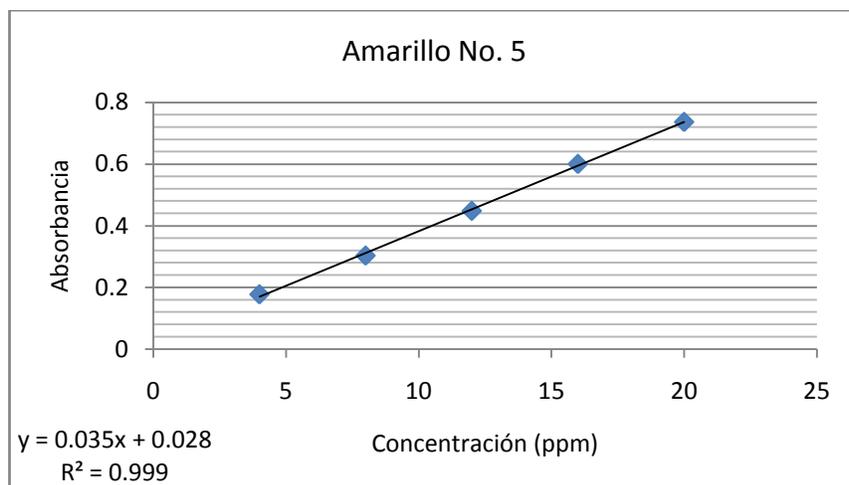
7.5. Buffer pH7:

Muestra	Peso de muestra	Volumen de reconstitución*	Dilución empleada	Longitud de onda	Absorbancia máxima
<i>H. sabdariffa</i>	1.0064 g	10 ml	0.15:25	525	0.16485
<i>S. domingensis</i>	1.0428 g	10 ml	0.02:25	206	2.24260
				282	0.38549
				322	0.21482
<i>R. mangle</i>	1.0586 g	10 ml	0.02:25	205	1.47510
				279	0.21089
				320	0.091309
Rojo No. 40	50 mg	50 ml	0.125/125	506	0.051270
				243	0.039318
				217	0.034965
Amarillo No. 5	50 mg	50 ml	0.125/125	258	0.046839
				424	0.045870
				213	0.016388
Amarillo No. 6	50 mg	50 ml	0.125/125	484	0.046180
				240	0.044977
				262	0.030553

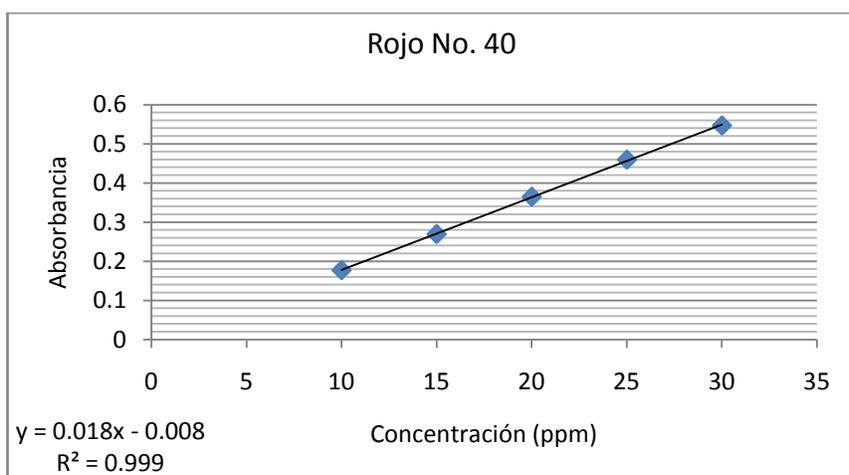
8. Curvas de calibración de los colorantes artificiales a diferentes pH.

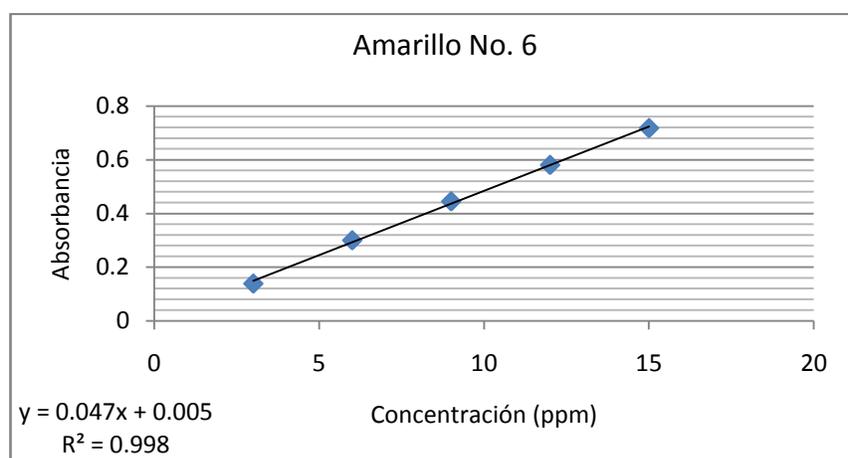
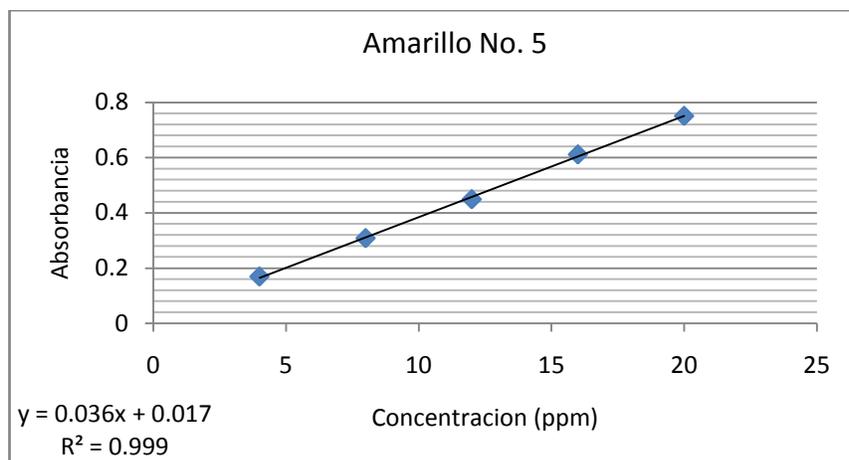
8.1 Medio: Etanol al 95%/HCl 0.1 N (85:15)



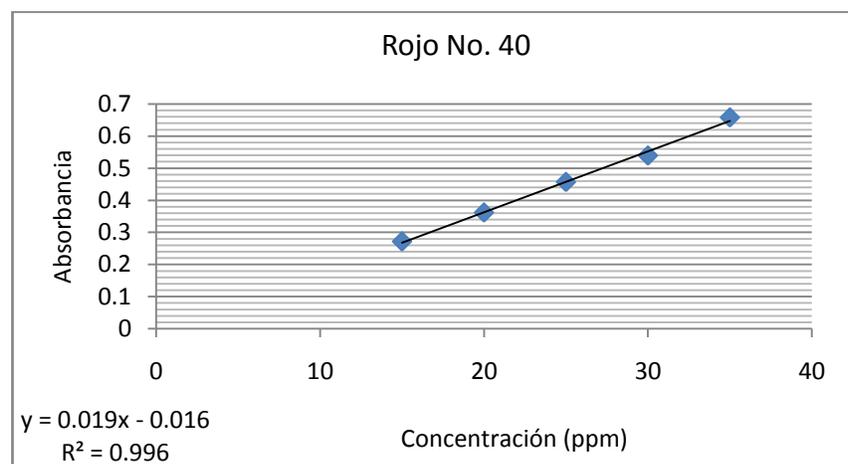


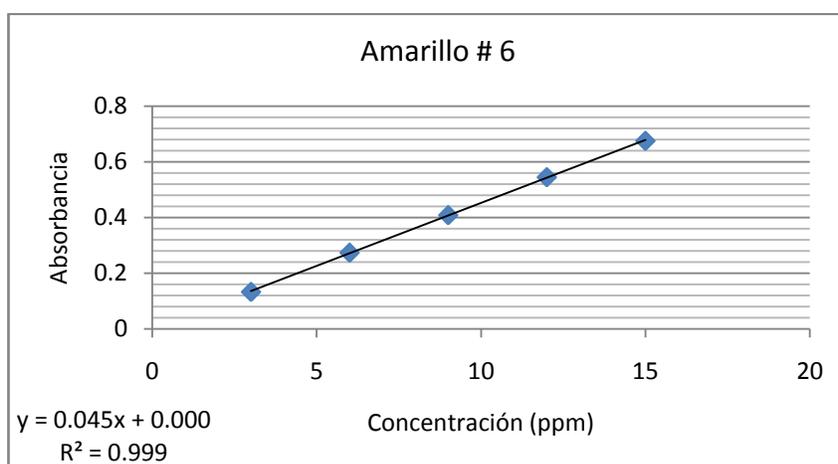
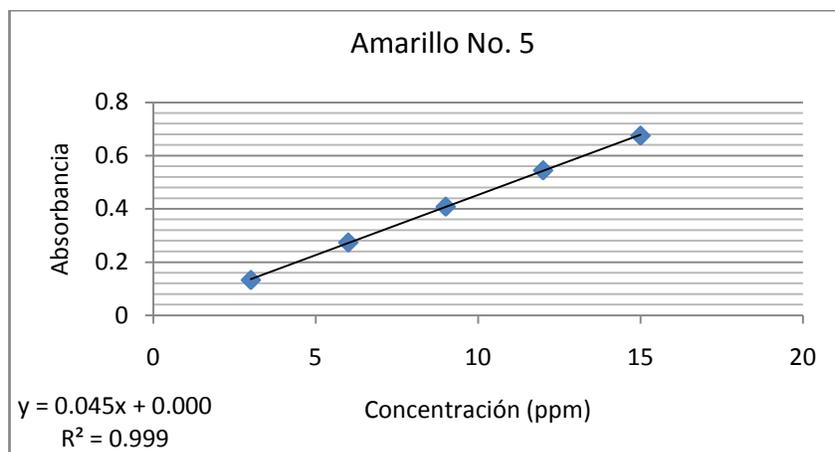
8.2. Medio: Buffer pH3



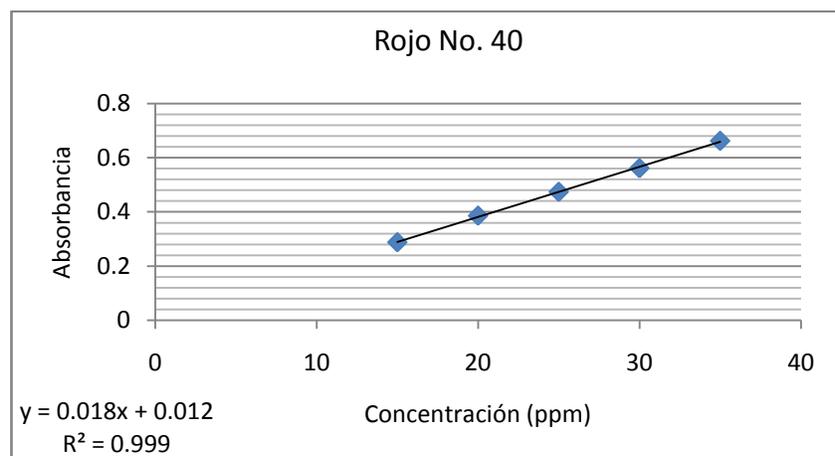


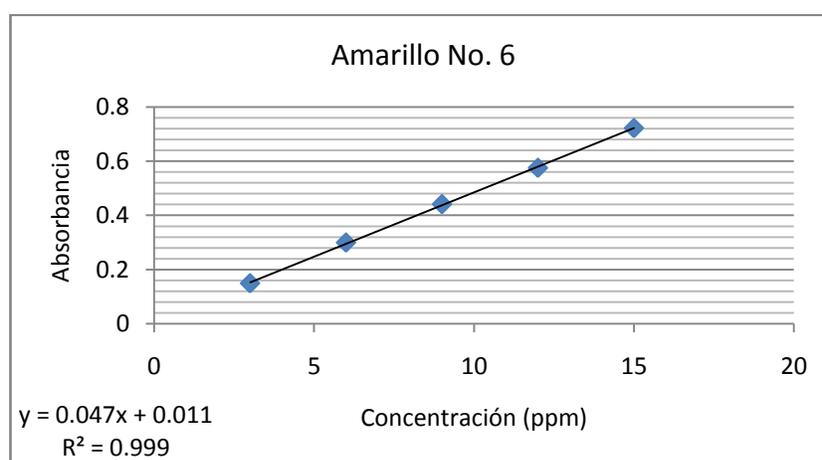
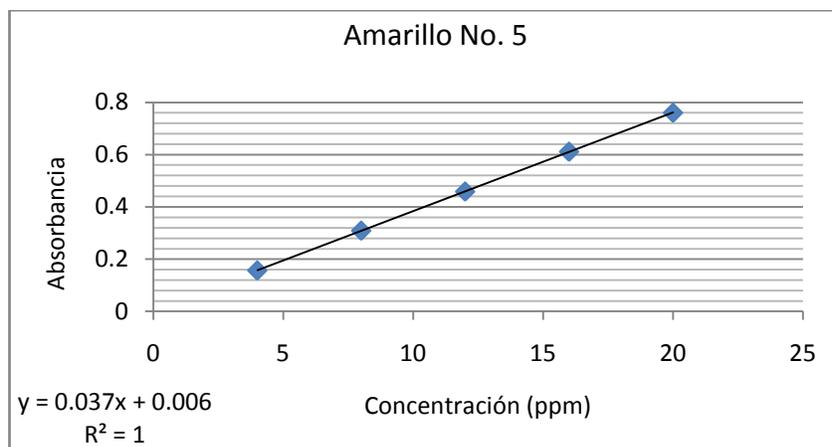
8.3. Medio: Buffer pH4



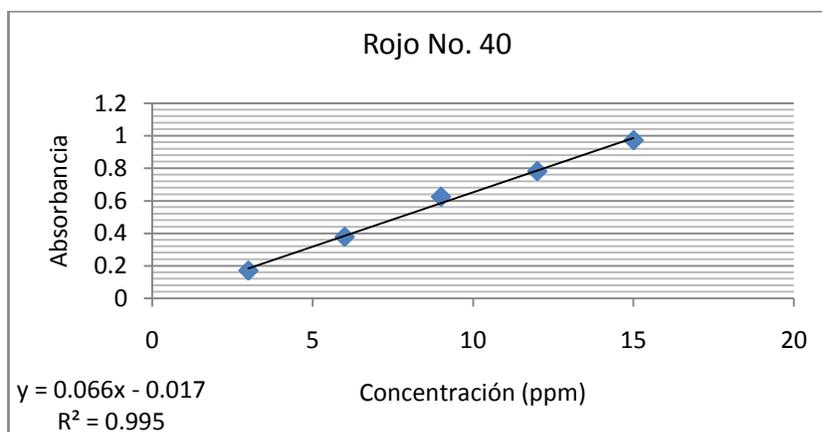


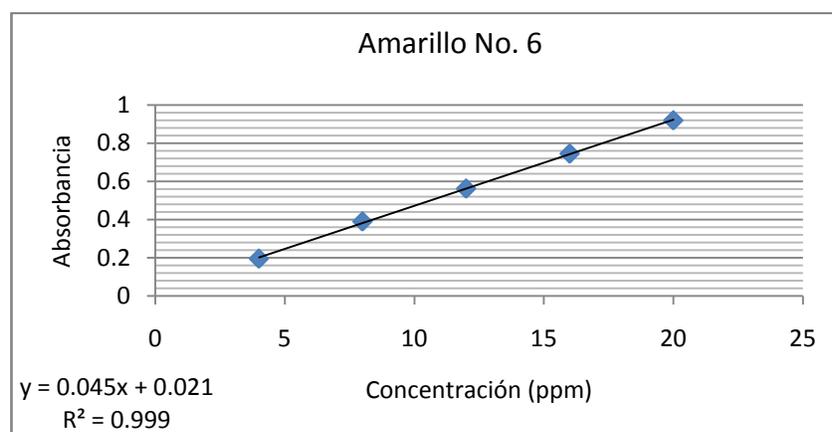
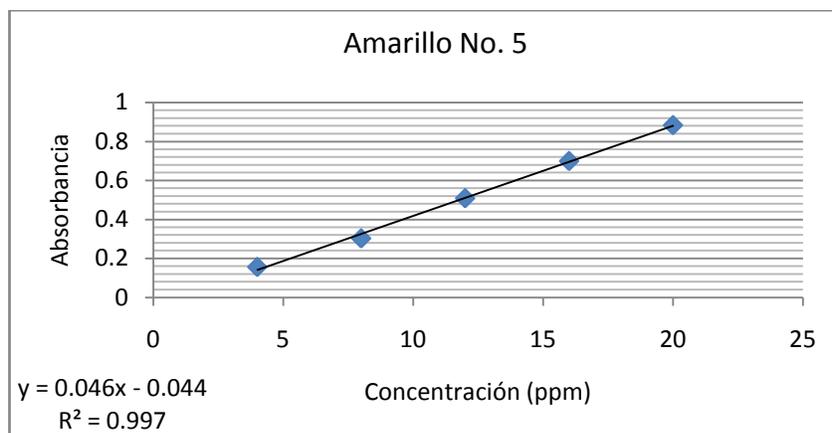
8.4. Medio: Buffer pH5



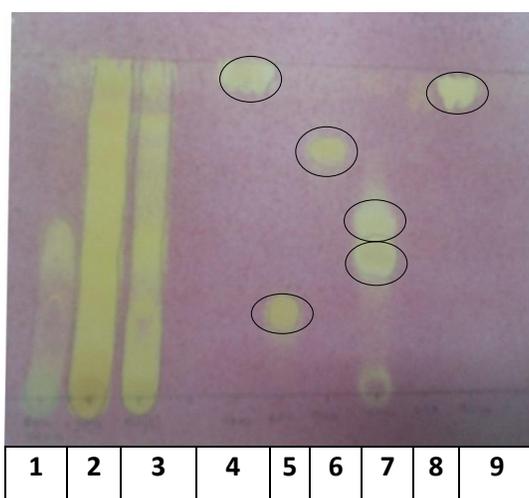


8.5. Medio: Buffer pH7





9. Cromatografía en capa fina (TLC) de actividad antioxidante de los extractos de estudio:



1. Rosa de Jamaica, 2. Zarzaparrilla, 3. Mangle, 4. TBHQ, 5. Rutina, 6. Quercetina, 7. Vitamina C, 8. Vitamina A, 9. Trolox

10. Fotografías del procedimiento de cuantificación de la actividad antioxidante por DPPH:

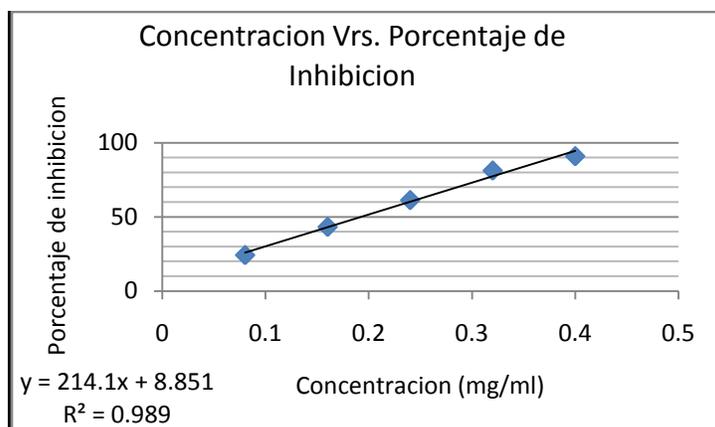


11. Fotografías del procedimiento de cuantificación de la actividad antioxidante por ABTS:

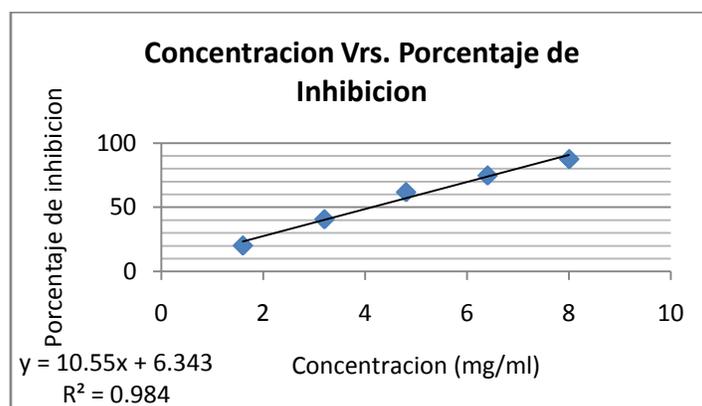


12. Curvas de calibración de las muestras y estándares, usadas en la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH:

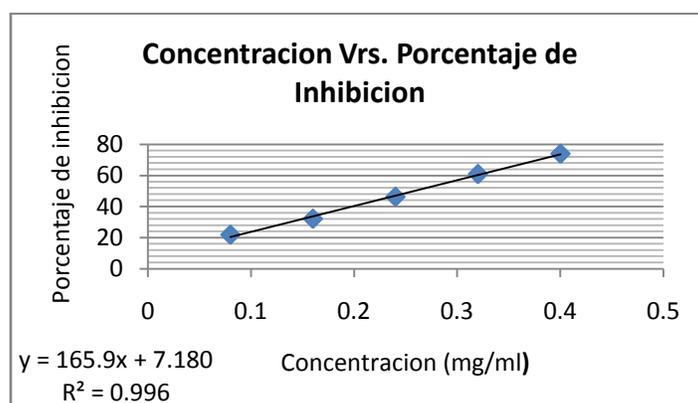
12.1. *S. domingensis*:



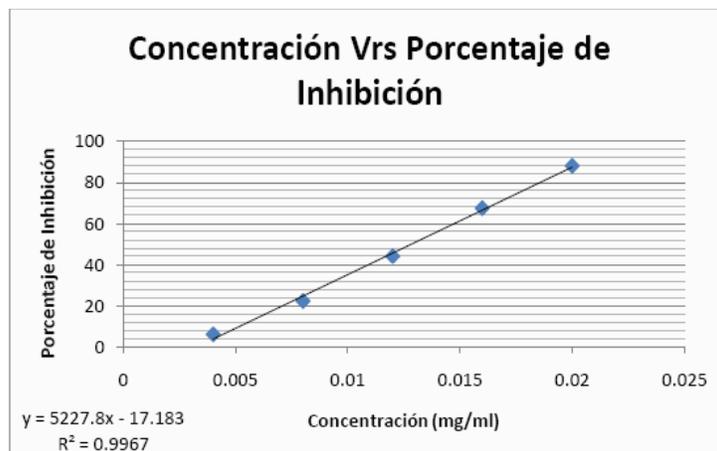
12.2. *H. sabdariffa*:



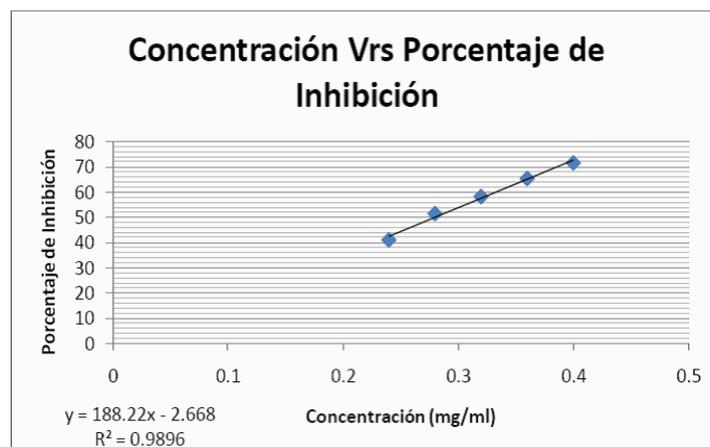
12.3. *R. mangle*:



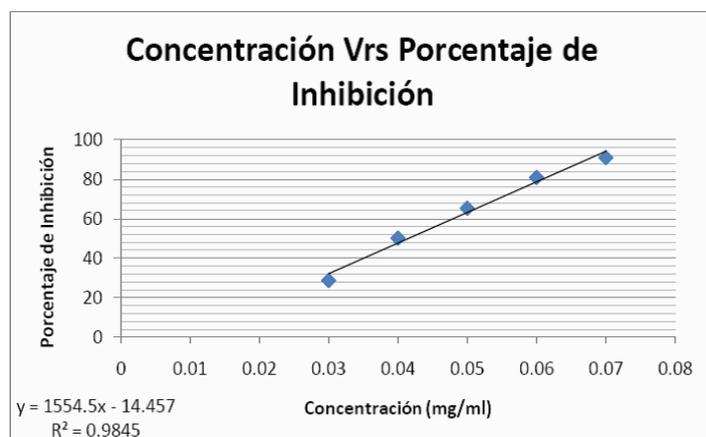
12.4. Vitamina C:



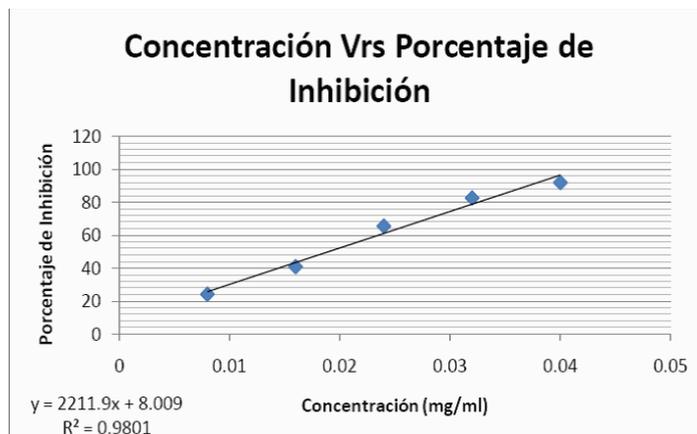
12.5. Vitamina E:



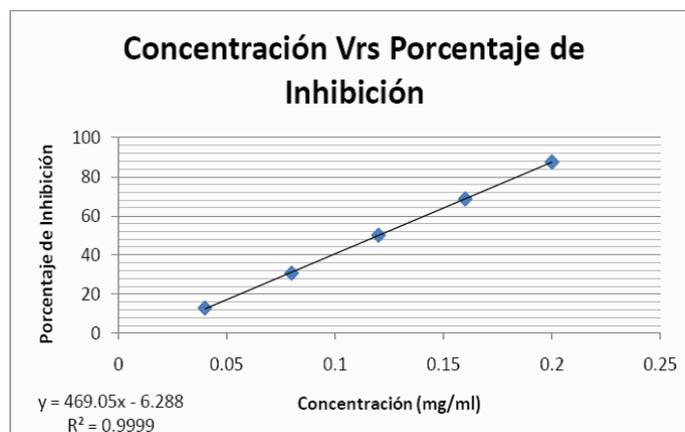
12.6. Quercetina:



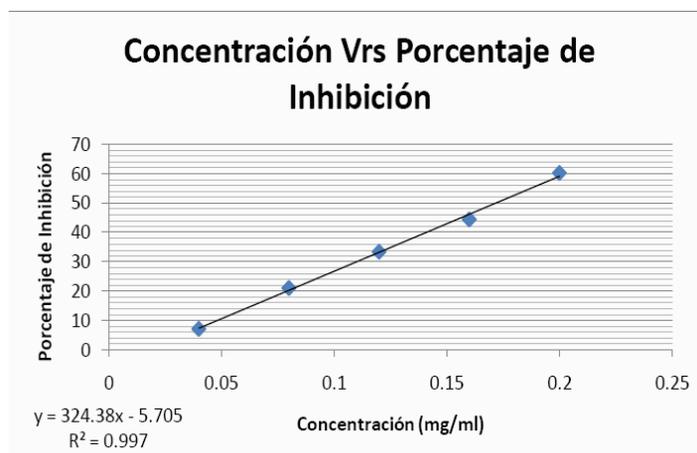
12.7. Rutina:



12.8. Ter-butil-hidroquinona (TBHQ):

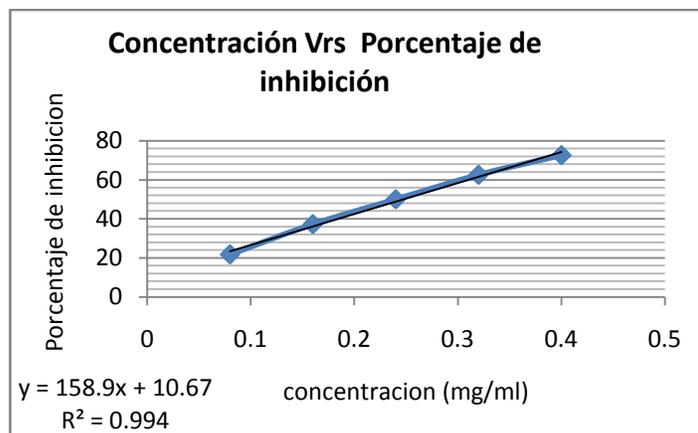


12.9. Trolox:

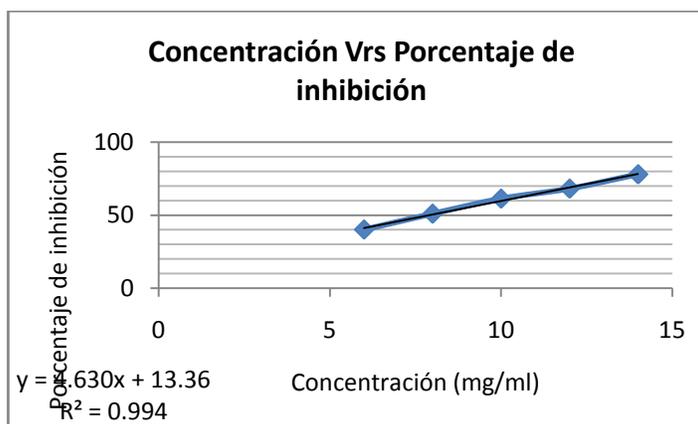


13. Curvas de calibración de las muestras y estándares usadas en la determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS:

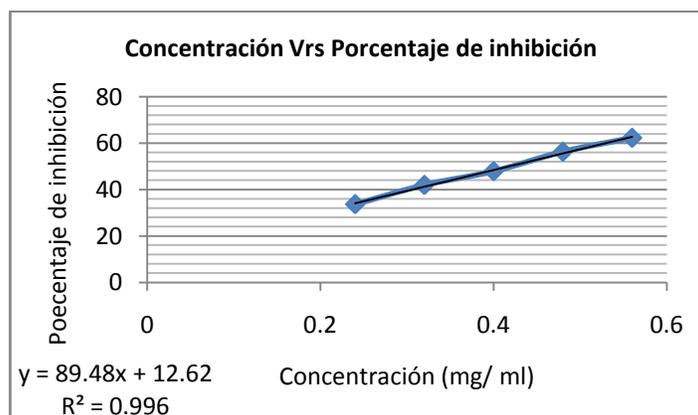
13.1. *S. domingensis*:



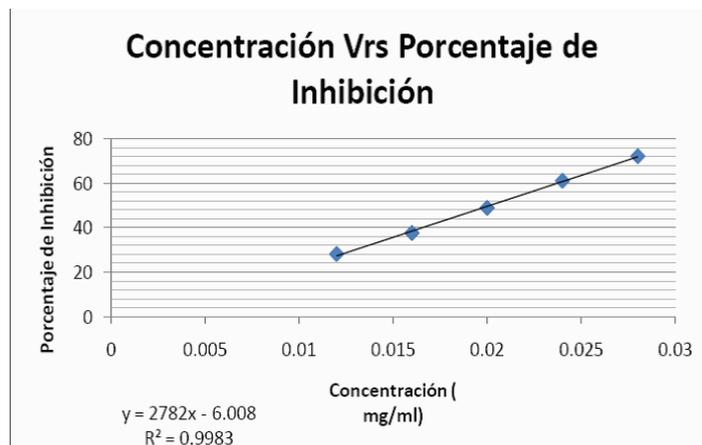
13.2. *H. sabdariffa*:



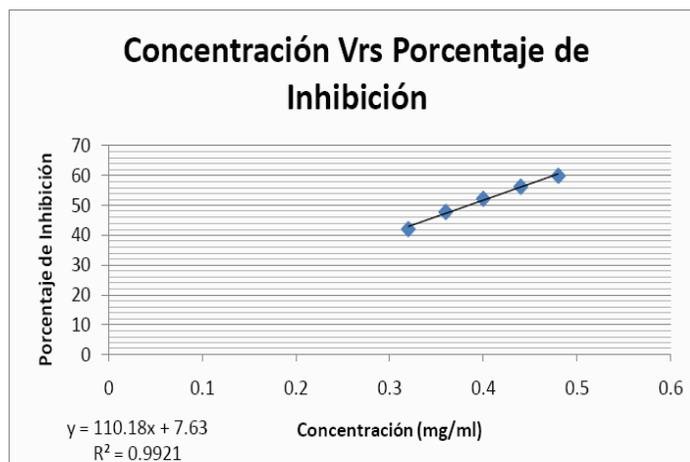
13.3. *R. mangle*:



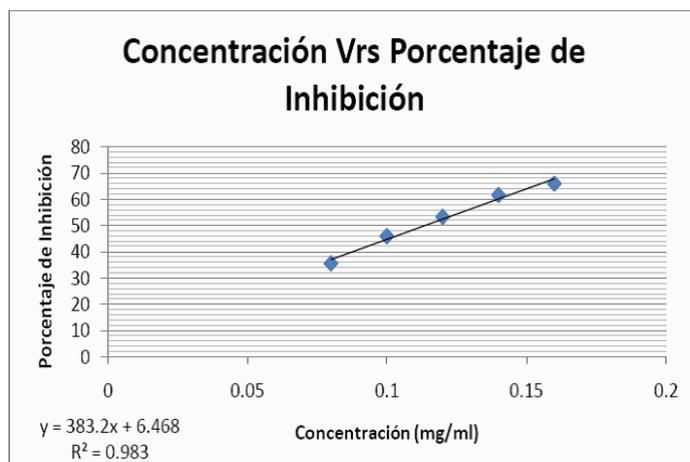
13.4. Vitamina C:



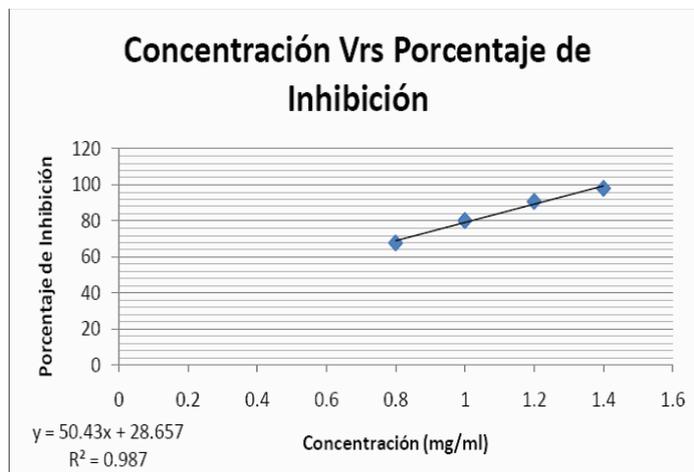
13.5. Vitamina E:



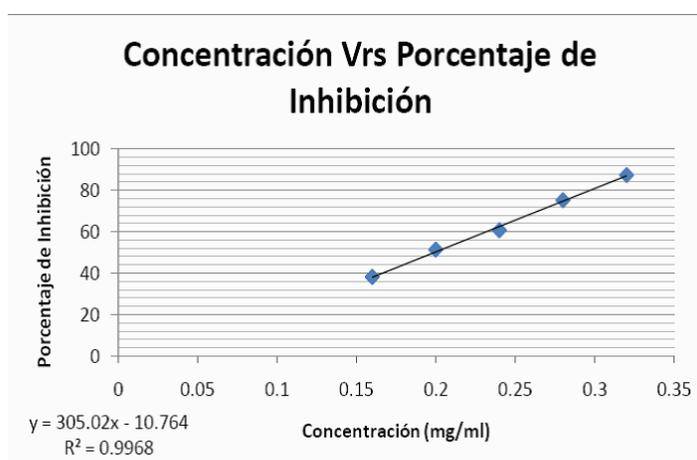
13.6. Quercetina:



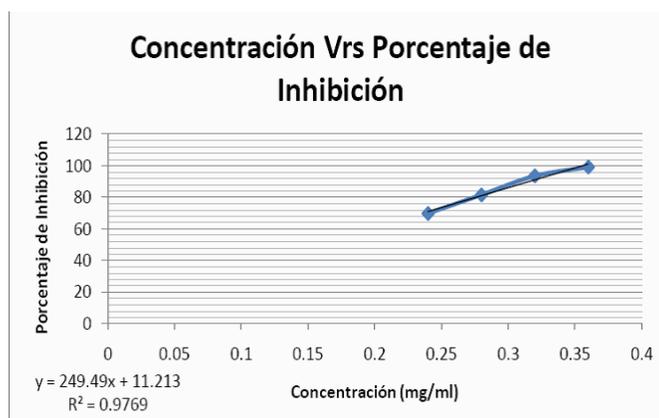
13.7. Rutina:

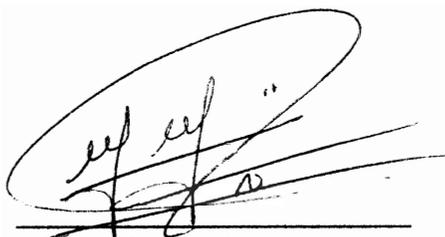


13.8. Ter-butil-hidroquinona (TBHQ):

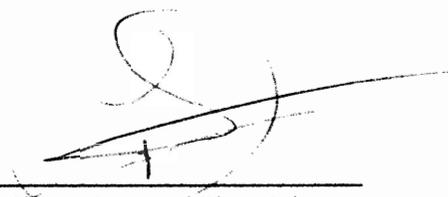


13.9. Trolox:

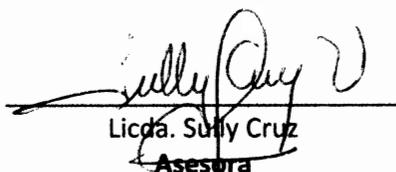




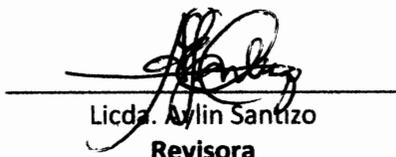
Br. Rudy Daniel Toc Noriega
Autor



Br. Elmer Geovany Oliva Palencia
Autor



Licda. Sully Cruz
Asesora



Licda. Ailyn Santizo
Revisora



Licda. Lucrecia Martínez de Haase
Directora de Escuela



Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto
Decano