



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

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

Carla Sofía Escobar Robles
Asesorado por: Inga. Telma Maricela Cano Morales
Lic. Armando Cáceres

Guatemala, noviembre de 2007

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

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

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA

POR:

CARLA SOFÍA ESCOBAR ROBLES

ASESORADO POR: INGENIERA TELMA MARICELA CANO MORALES
LICENCIADO ARMANDO CÁCERES

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE
INGENIERA QUÍMICA

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2007

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
VOCAL I	Inga. Glenda Patricia García Soria
VOCAL II	Inga. Alba Maritza Guerrero de López
VOCAL III	Ing. Miguel Ángel Dávila Calderón
VOCAL IV	Br. Kenneth Issur Estrada Ruiz
SECRETÁRIA	Inga. Marcia Ivónne Véliz Vargas

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO


DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
EXAMINADORA	Inga. Rosa María Girón Ruiz
EXAMINADOR	Ing. Francisco Aben Rosales Cerezo
EXAMINADOR	Ing. Víctor Herbert de León Morales
SECRETARIA	Inga. Marcia Ivónne Véliz Vargas

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

Cumpliendo con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

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,

tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, el 5 de abril de 2007.


Carla Sofia Escobar Robles

Mis amigos y amigas

Mi asesora, coasesor y revisor de trabajo de graduación

El personal de FARMAYA, S. A.

LIPRONAT

La Facultad de Ingeniería

La Universidad de San Carlos de Guatemala

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	VII
LISTA DE SÍMBOLOS	XI
GLOSARIO	XIII
RESUMEN	XXI
JUSTIFICACIÓN	XXIII
OBJETIVOS	XXV
INTRODUCCIÓN	XXVII
1. ANTECEDENTES	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. <i>S. domingensis</i> (Zarzaparrilla)	3
2.1.1. Sinónimos	3
2.1.1. Descripción botánica	3
2.1.3. Hábitat	4
2.1.4. Historia	4
2.1.5. Agricultura	4
2.1.6. Usos medicinales atribuidos	6
2.1.7. Farmacología	6
2.1.7.1. Experimental	6
2.1.7.2. Clínica	7
2.1.8. Composición química	7
2.1.9. Farmacognosia	7
2.1.10. Toxicología	7
2.1.11. Indicaciones terapéuticas	8

2.2. Producto fitoterapéutico	8
2.2.1. Extractos botánicos	8
2.2.2. Tipos de extractos botánicos	8
2.2.2.1. Fluidos	9
2.2.2.2. Extractos semisólidos o blandos	9
2.2.2.3. Secos	9
2.2.2.4. Extracto pilular o firme	10
2.2.2.5. Extractos hidroglicólicos	10
2.2.2.6. Consideraciones finales	10
2.3. Operaciones que influyen en la fabricación de un producto fitoterapéutico	11
2.3.1. Molienda	11
2.3.2. Extracción	12
2.3.2.1. Variables del proceso extractivo	14
2.3.2.2. División de la droga	14
2.3.2.3. Agitación	15
2.3.2.4. Temperatura	15
2.3.2.5. pH	15
2.3.2.6. Naturaleza del solvente	16
2.3.2.7. Tiempo	16
2.3.3. Métodos de extracción	17
2.3.3.1. Maceración	18
2.3.3.2. Percolación	18
2.3.4. Clarificación de los extractos	19
2.3.5. Concentración	19
2.3.6. Secado	20
2.4. Caracterización química	20
2.4.1. Características organolépticas	20
2.4.2. Características fitoquímicas	20

2.4.3. Constituyentes primarios y secundarios	21
2.4.4. Identificación química	22
2.4.4.1. Principios activos	22
2.4.4.2. Marcadores activos	22
2.4.4.3. Marcadores analíticos	23
2.4.4.4. Marcadores negativos	23
2.4.5. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios	24
2.4.5.1 Cromatografía en capa fina	24
2.4.6. Determinación cuantitativa de los principios activos	24
2.4.7. Flavonoides	25
2.4.7.1. Actividad biológica de los flavonoides	25
2.4.8. Saponinas	26
2.5. Control de calidad materia prima	28
2.5.1. Estudio de estabilidad	27
3. METODOLOGÍA	29
3.1. Localización	30
3.2. Recursos humanos	30
3.3. Recursos materiales	30
3.3.1. Equipo	30
3.3.2. Cristalería	31
3.3.3. Reactivos	32
3.4. Metodología experimental	33
3.4.1. Diseño de repeticiones	33
3.4.2. Manejo experimental	33
3.4.2.1. Preparación de la muestra	33
3.4.2.2. Determinación del porcentaje de humedad	34
3.4.2.3. Determinación de cenizas totales	34
3.4.2.4. Preparación de extractos	35

3.4.2.5. Análisis microbiológico	36
3.4.2.6. Determinación de coliformes totales	39
3.4.2.7. Determinación de coliformes fecales	40
3.4.2.8. Determinación de <i>Escherichia coli</i>	41
3.4.2.9. Conteo aeróbico en placa: mohos y levaduras	42
3.4.2.10. Conteo aeróbico en placa: bacterias mesófilas	43
3.4.2.11. Determinación de sólidos totales extraíbles	44
3.4.2.12. Determinación de densidad	45
3.4.2.13. Determinación de pH	46
3.4.2.14. Determinación de viscosidad	46
3.4.2.15. Determinación de solubilidad	46
3.4.2.16. Determinación cualitativa de saponinas	47
3.4.2.17. Determinación cualitativa de flavonoides	48
3.4.2.18. Cuantificación de saponinas	49
3.4.2.19. Cuantificación de flavonoides	49
3.4.2.20. Tamizaje microbiológico	51
3.4.2.21. Tamizaje de la actividad antibacteriana	52
3.4.2.22. Tamizaje de la actividad antilevadura	53
3.4.2.23. Concentración inhibitoria mínima (MIC)	54
3.4.3. Análisis estadístico	55
4. RESULTADOS	57
4.1. Identificación botánica del rizoma <i>S. domingensis</i>	57
4.2. Evaluación preliminar del rizoma seco de <i>S. domingensis</i>	57
4.3. Análisis fisicoquímicos de los extractos de <i>S. domingensis</i>	58
4.4. Análisis Fitoquímico de los extractos de <i>S. domingensis</i>	59
4.4.1. Investigación de saponinas presentes en los extractos etanólicos del rizoma de <i>S. domingensis</i> por el método de la prueba de espuma y por cromatografía en capa fina	59

4.4.2. Investigación de flavonoides en los extractos etanólicos del rizoma de <i>S. domingensis</i> por método cualitativo de tubos (reacciones acompañadas de cambios de color y/o formación de precipitado) y cromatografía en capa fina	61
4.5. Cuantificación de saponinas totales en los extractos etanólicos del rizoma de <i>S. domingensis</i>	63
4.6. Cuantificación de flavonoides totales en los extractos etanólicos del rizoma de <i>S. domingensis</i>	63
4.7. Ensayos biológicos	64
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	69
5.1. Análisis de humedad	69
5.2. Análisis de cenizas	68
5.3. Análisis de sólidos totales	68
5.4. Análisis de solubilidad	68
5.5. Análisis de pH	69
5.6. Análisis de densidad	69
5.7. Análisis de viscosidad	69
5.8. Análisis identificación de saponinas	69
5.9. Análisis identificación de flavonoides	70
5.10. Análisis cuantificación de saponinas	70
5.11. Análisis cuantificación de flavonoides	71
5.12. Análisis microbiológico	71
5.13. Análisis de concentración inhibidora mínima	71
CONCLUSIONES	75
RECOMENDACIONES	77

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
BIBLIOGRAFÍA	83
Apéndice A: datos originales	85
Apéndice B: muestra de cálculo	91
Apéndice C: datos calculados	95

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1	Hoja y flor de zarzaparrilla (<i>S. domingensis</i>)	3
2	Rizoma recién extraído de zarzaparrilla (<i>S. domingensis</i>)	5
3	Rizoma seco de zarzaparrilla (<i>S. domingensis</i>)	5
4	Prueba de espuma para saponinas	59
5	CCF para determinar saponinas en los extractos de <i>S. domingensis</i>	60
6	CCF para determinar flavonoides en los extractos de <i>S. domingensis</i>	62
7	Determinación de CIM para <i>E. coli</i>	66
8	Modelo matemático que representa el comportamiento de absorbancia frente a concentración del estándar saponina	98

TABLAS

I.	Categorías de drogas crudas vegetales según tenor microbiano de acuerdo con los criterios de la OMS.	37
II.	Datos para calcular el número más probable -NMP-	38
III.	Expresión de resultados para la presencia de coliformes totales	40
IV.	Expresión de resultados para la presencia de coliformes fecales	41
V.	Presentación de resultados para presencia de <i>E. coli</i> .	42
VI.	Presentación de resultados conteo aeróbico en placa: mohos y levadura.	43

VII.	Presentación de resultados conteo aeróbico en placa: bacterias mesófilas	44
VIII.	Evaluación macroscópica del rizoma seco <i>S. domingensis</i>	56
IX.	Evaluación microscópica del rizoma seco de <i>S. domingensis</i>	56
X.	Análisis fisicoquímicos del rizoma seco de <i>S. domingensis</i>	57
XI.	Análisis microbiológico del rizoma seco de <i>S. domingensis</i>	57
XII.	Análisis fisicoquímicos de extractos	58
XIII.	Investigación de saponinas: ensayo macro	59
XIV.	Verificación de la presencia de saponinas en extractos etanólicos del rizoma de <i>S. domingensis</i> por cromatografía en capa fina CCF	60
XV.	Investigación de flavonoides: ensayo macro	61
XVI.	Verificación de la presencia de flavonoides en los extractos etanólicos del rizoma de <i>S. domingensis</i> por cromatografía en capa fina CCF	62
XVII.	Cuantificación de saponinas	63
XVIII.	Cuantificación de flavonoides	63
XIXa.	Análisis microbiológico extractos etanólicos del rizoma de <i>S. domingensis</i>	64
XIXb.	Análisis microbiológico extractos etanólicos del rizoma de <i>S. domingensis</i>	64
XX.	Tamizaje antimicrobiano de extractos etanólicos del rizoma de <i>S. domingensis</i> a una concentración inicial de 1 mg/mL.	65
XXI.	Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos etanólicos del rizoma de <i>S. domingensis</i> con actividad en la fase de tamizaje.	66
XXII.	Datos originales para la obtención de porcentaje en peso de humedad en la materia prima.	83

XXIII.	Datos originales para la obtención del porcentaje en peso de cenizas totales en la materia prima.	83
XXIV.	Datos originales para la obtención del porcentaje en peso de sólidos totales extraíbles.	83
XXV.	Datos originales para la obtención de densidad	84
XXVI.	Datos originales para la obtención de pH.	84
XXVII.	Datos originales para la obtención de porcentaje en peso de humedad	84
XXVIII.	Datos originales para la determinación de constantes A y B del viscosímetro de Ostwald tomando como referencia el agua	85
XXIX.	Datos originales para la obtención de viscosidad	85
XXX.	Datos originales para la determinación de solubilidad	85
XXXI.	Datos originales para los <i>R_f</i> s Cromatografía de Capa Fina CCF para saponinas.	86
XXXII.	Datos originales para los <i>R_f</i> s Cromatografía de Capa Fina CCF para flavonoides	86
XXXIII.	Datos originales para el tamizaje antimicrobiano de extractos etanólicos del rizoma de <i>S. domingensis</i> a una concentración inicial de 1 mg/mL.	87
XXXIV.	Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos etanólicos del rizoma de <i>S. domingensis</i> con actividad en la fase de tamizaje, para <i>Escherichia coli</i> .	87
XXXV.	Datos originales para la absorbancia de los extractos <i>S. domingensis</i> para la cuantificación de saponinas.	88
XXXVI.	Datos originales para la absorbancia de los extractos <i>S. domingensis</i> para la cuantificación de flavonoides.	88
XXXVII.	Porcentaje en peso de humedad para rizoma de <i>S. domingensis</i>	93

XXXVIII.	Porcentaje en peso de cenizas para rizoma de <i>S.domingensis</i>	93
XXXIX.	Valores para la obtención del porcentaje en peso de sólidos totales para extractos fluidos.	94
XL.	Valores de densidad	94
XLI.	Valores de pH	95
XLII.	Determinación de las constantes A y B del viscosímetro de Ostwald.	95
XLII.	Viscosidades de extractos etanólicos de <i>S. domingensis</i> a 26°C.	95
XLIV.	Porcentaje en peso de humedad para extracto seco	96
XLV.	Solubilidad de extractos etanólicos de <i>S. domingensis</i> a 26°C	96
XLVI.	Valores de <i>Rfs</i> para saponinas	97
XLVII.	Valores de <i>Rfs</i> para flavonoides	97
XLVIII.	Cálculo de las concentraciones del estándar saponina	98
XLIX.	Concentración de saponinas en los extractos <i>S. domingensis</i> calculados en base al estándar saponina	99
L.	Porcentaje de flavonoides totales en los extractos <i>S. domingensis</i> expresados como % de quercetina	99
LI.	Análisis realizados para el extracto 1:1 de <i>S. domingensis</i>	102
LII.	Análisis realizados para el extracto 1:4 de <i>S domingensis</i>	102

LISTA DE SÍMBOLOS

SÍMBOLO	SIGNIFICADO
cp	Centipoise
cm	Centímetros
(ϵ)	Constante dieléctrica
DL ₅₀	Dosis letal en 50 pacientes
ρ	Densidad
°C	Grados de temperatura Celsius
g	Gramos
h	Horas
kg	Kilogramos
mL	Mililitros
msnm	Metros sobre el nivel del mar
μ L	Microlitros
mm	Milímetros
mg	Miligramos
min.	Minutos
nm	Nanómetros
NMP	Número más probable
%	Porcentaje
t	Tiempo
s	Segundos
η	Viscosidad

GLOSARIO

Alcaloide	Grupo de compuestos débilmente alcalinos que contienen nitrógeno, y son en su mayoría de origen vegetal; poseen una complejidad molecular moderada que produce varios efectos fisiológicos en el cuerpo.
Alcohol	Derivado hidroxilado de un hidrocarburo parafínico o ciclo parafínico, en donde el grupo -OH está ligado a un átomo de carbono saturado.
Antifúngico	Relativo a una sustancia que destruye los hongos o inhibe su crecimiento y reproducción.
Antiprurítico	Que evita picores en la piel.
Antiséptico	Sustancia germicida para la desinfección de los tejidos vivos, es también una sustancia que hace inocuos a los micro-organismos.

Bactericida	Que destruye bacterias.
Condensación	Fenómeno en el que se pasa del estado gaseoso a líquido.
Decocción	Proceso por el cual la planta se hierve en agua durante un período de tiempo determinado. Se usa este procedimiento con las partes más duras, como corteza, hojas coriáceas, raíces, tallos y semillas.
Dextrina	Hidrato de carbono soluble y amorfo, $(C_6H_{10}O_5)_n$, que se forma en la pasta de almidón por la acción de los ácidos, del calor o de enzimas como la diastasa.
Difusión	Mezcla gradual de las moléculas en virtud de sus propiedades cinéticas.
Diurética	Que tiene virtud para aumentar la excreción de la orina.

Droga vegetal	Son las plantas, partes de las plantas, algas, hongos o líquenes enteros, fragmentados o cortados sin procesar, generalmente desecados.
Extracción	Separación de los componentes de cualquier sustancia por el contacto con un líquido.
Extractos	Preparaciones concentradas de consistencia líquida, sólida o intermedia obtenida normalmente de materia vegetal.
Evaporación	Proceso en el que un líquido se transforma en gas.
Farmacopea	Relación de fármacos con instrucciones para su elaboración.

Flavonoides

Son los pigmentos virtualmente universales en las plantas. Casi siempre solubles en agua y son responsables del color de las flores, frutos y algunas veces, de las hojas; están también universalmente presentes en la cutícula de la hoja y células epidérmicas donde aseguran protección contra el efecto de la radiación ultravioleta.

Humedad

Contenido de agua en un material.

Infusión

Procedimiento que consiste en calentar agua y añadir la parte de la planta necesaria en el primer hervor. Seguidamente se aparta del fuego, se tapa y se deja reposar unos minutos.

Lepra

Enfermedad infecciosa crónica del hombre que afecta sobre todo a la piel, membranas mucosas y nervios.

Macrobióticas

Disciplina que trata sobre un régimen alimenticio en el que los alimentos de origen vegetal tienen preferencia sobre el resto, los alimentos tienen que ser naturales, es decir, que no contengan ningún tipo de abono químico, herbicida o pesticida y no procedan de cría o cultivos artificiales.

Malaria

Enfermedad humana y también de las aves y monos, causada por la infección de un protozoo del género *Plasmodium*, transmitida por un vector caracterizada por escalofríos y fiebre intermitente.

Maceración

Este método expone la droga a un determinado disolvente en frío o a temperatura ambiente durante días o semanas, con agitación ocasional, se utiliza cuando la droga no puede exponerse al calentado por ser termolábil.

Metabolito

Sustancia originada por la transformación metabólica de los alimentos en el interior de las células o de los seres vivos.

Percolación	Consiste en hacer pasar el disolvente a través de la droga, hasta su extracción exhaustiva completa.
pH	Valor que representa convencionalmente el potencial de los iones hidrógeno de una disolución acuosa.
Picnómetro	Recipiente calibrado para la determinación de densidades mediante pesado.
Pie de atleta	Micosis cutánea del pie, los síntomas son enrojecimiento de la piel seguido de la aparición de grietas entre los dedos y secreción acuosa, acompañados de prurito (picazón) en todas las fases.
Principios activos	Son constituyentes que tienen actividad clínica probada.
Psoriasis	Erupción cutánea en forma de placas rojas cubiertas de escamas.

Quimiotaxonomía	Es la clasificación de plantas basadas en sus constituyentes químicos y ésta puede ser de utilidad en la identificación del material vegetal.
Reumatismo	Se aplica a diversos trastornos caracterizados por rigidez, dolor e hipersensibilidad de las articulaciones y de los músculos; abarca la gota, la fiebre reumática, la osteo-artritis, la miositis, la bursitis, y la artritis reumatoide.
Rizomas	Tallo horizontal y subterráneo que por un lado hecha ramas aéreas verticales y por el otro, raíces.
Saponinas	Son derivados terpénicos que agitados en el agua producen espuma semejante al jabón, así reducen la tensión superficial del agua.
Termolábiles	Que se deteriora con los cambios de temperatura.
Tintura	Es la maceración o percolación hecha en alcohol y normalmente lleva una parte de la planta por cinco de alcohol.

RESUMEN

En la presente investigación se realizó la estandarización de un extracto fluido y un extracto seco del rizoma de *S. domingensis* (Zarzaparrilla) a nivel laboratorio por el método de percolación de lecho estático con 24 horas de reposo.

Para ello se utilizó rizoma de *S. domingensis* proveniente del departamento de Santa Rosa. Para la elaboración de los extractos se procedió a verificar que la materia prima cumpliera con normas de calidad; luego se efectuaron las respectivas percolaciones utilizando como disolvente etanol al 70 % v/v, y al final se concentraron hasta llegar a 1:1 (1 mL de extracto corresponde a 1 g de la droga seca) para extracto fluido y 1:4 (1 mL de extracto corresponde a 4 g de la droga seca) para extracto seco.

Habiendo elaborado de esta manera los extractos se procedió a evaluar propiedades fisicoquímicas, determinar la presencia de saponinas y flavonoides por el método de cromatografía en capa fina y al mismo tiempo cuantificar estos metabolitos secundarios por métodos espectrofotométricos.

Para extracto fluido de concentración 1:1 se determinó; el % sólidos totales extraíbles, densidad, pH, viscosidad, solubilidad y para el extracto seco de concentración 1:4 se determinó; pH, solubilidad, y % de humedad.

El análisis de cromatografía en capa fina evidenció la presencia de saponina y flavonoides del tipo quercetina, ácido clorogénico e hiperósido; no se evidenció la presencia de rutina.

Se determinó que la concentración de saponina presente en el extracto fluido es: $(6.847E-2 \pm 2.14E-3)$ 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 como quercetina (%) siendo éste 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.

JUSTIFICACIÓN

El estudio de esta planta es de gran interés por sus propiedades curativas entre las cuales están: antiinflamatoria, antifúngica, antiprurítica, antirreumática, antiséptica, cicatrizante, desinflamante, estimulante, diurética, diaforética, depurativa, sudorífica y tónica ².

En Guatemala, el uso de esta planta es en forma de cocción e infusiones por lo que al elaborar extractos y estandarizarlos es posible obtener una mayor eficacia, seguridad y calidad.

En la actualidad, en el país se comercializan extractos (tinturas) de zarzaparrilla, sin tener un parámetro fisicoquímico que los identifique, por lo que al estandarizar estas propiedades fisicoquímicas los proveedores tendrán una confiabilidad de estos productos en el momento de su adquisición. En el país aun no se tienen estudios sobre estandarización de extractos de esta especie, por lo que los resultados aquí obtenidos serán de mucha importancia para generar un manejo sostenible de esta planta.

La finalidad de este estudio también es el de elaborar productos fitofarmacéuticos a precios más bajos que los medicamentos convencionales, a manera de estar disponibles a grupos de la población menos favorecida.

La obtención de los resultados servirá de parámetros en el momento de efectuar una producción a nivel de planta piloto.

OBJETIVOS

- **Generales:**

Estandarizar dos extractos del rizoma de la planta zarzaparrilla (***S. 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.

- **Específicos:**

1. Elaborar extractos de concentración 1:1 (1 mL de extracto corresponde a 1 g de droga seca) y 1:4 (1 mL de extracto corresponden a cuatro g de la droga seca), a partir del rizoma de la planta zarzaparrilla (***S. domingensis***) utilizando la extracción por percolación de lecho estático con 24 horas de reposo; y como disolvente la mezcla etanol 70% v/v; agua 30% v/v con (ϕ) = 40.5
2. Determinar propiedades fisicoquímicas (pH, densidad, sólidos totales, viscosidad, solubilidad), de los dos extractos vegetales referidos, con potencial de desarrollo fitofarmacéutico.
3. Identificar las saponinas y flavonoides totales presentes en los extractos referidos, utilizando métodos macro y semimicro (cromatografía en capa fina).
4. Cuantificar el contenido de saponinas totales presentes en los extractos referidos, utilizando método espectrofotométrico.

5. Cuantificar el contenido de flavonoides totales presentes en los extractos referidos, utilizando método espectrofotométrico.

6. Determinar la concentración inhibidora mínima de los extractos referidos, para evaluar su bioactividad, utilizando el método de diluciones múltiples de Mitscher en los microorganismos:
Staphylococcus aureus, *Salmonella Typhi*, *Mycobacterium smegmatis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *E. coli*.

INTRODUCCIÓN

La tendencia actual de volver a lo natural para llevar una vida más sana, induce a quienes se dedican a la tecnología farmacéutica a investigar y desarrollar formulaciones innovadoras que permitan el empleo de productos naturales de origen vegetal.

Numerosas son las investigaciones que se realizan encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales. Los extractos de plantas debido a su contenido exclusivamente natural, sin agregados químicos, son imprescindibles como coadyuvantes de las dietas naturistas, macrobióticas, etc., y conducen a una sabia utilización de los recursos de la naturaleza.

El presente trabajo tiende a aportar un estudio sobre la estandarización de extractos fluido y seco del rizoma de zarzaparrilla (*S. domingensis*) para la producción de productos fitofarmacéuticos; ya que esta planta es conocida por las propiedades curativas del extracto y el cocimiento de la raíz; por vía oral para tratar anemia, afecciones gastrointestinales, hinchazón, malaria, dolor de riñones, enfermedades de la sangre y venéreas, hepatitis, reumatismo y tumores; tópicamente para tratar afecciones dermatomucosas (alergias, eczema, liquen plano, tinea, psoriasis) ².

El estudio será de mucha utilidad en la industria fitofarmacéutica guatemalteca, ya que promueve una mejor utilización, aprovechamiento, de esta planta y también contribuye al aumento de la explotación de recursos naturales del país.

En este trabajo, para cada uno de los extractos se determinaron ensayos tales como sólidos totales extraíbles, densidad, pH, viscosidad, solubilidad y % humedad; se realizó un tamizaje fitoquímico, lo cual indica la presencia de saponina y flavonoides del tipo quercetina, ácido clorogénico e hiperósido.

Se determinó la concentración de saponina presente en el extracto fluido que 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 y para la cuantificación de flavonoides totales el resultado se expresó como (%) quercetina, siendo éste para el extracto fluido 0.028 ± 0.001 y para el extracto seco 0.177 ± 0.009 . Se encontró acción antibacteriana solamente del extracto seco para bacterias de *E.coli* a una concentración de 1mg/mL.

1. ANTECEDENTES

Ensayos biológicos:

En un estudio sobre ACCIÓN DIURÉTICA Y ANTIMICROBIANA DE ALGUNOS VEGETALES DEL GÉNERO SMILAX, realizado por Damilia Arriaza y Armando Cáceres. Las especies: *S. spinosa*, *lundellii* y *regellii* demostraron tener acción diurética menor que el fármaco de referencia (hidroclorotiazida) aunque mayor que el agua utilizada como blanco. *S. lundellii* mostró acción antibacteriana *in vitro* inhibiendo cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. disenteriae*; acción antimicótica *in vitro* inhibiendo cepas de *T. mentagrophytes var. granulosa* y *E. floccosum*, se determinó que la DL₅₀ del cocimiento de la raíz de estas especies por vía oral en ratas es de 30g/Kg de peso. (Facultad de CCQQ y Farmacia. USAC 1983).

Silvia Alvarado y Armando Cáceres en un estudio sobre CONFIRMACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE ALGUNOS EXTRACTOS VEGETALES; determinó que extractos etanólicos *in vitro* de *S. lundelli* mostraron tener actividad inhibitoria ante *Salmonella typhi*, *Shigella flexnerii* y *Proteus vulgaris*. (Facultad de CCQQ y Farmacia. USAC 1986).

Un estudio sobre ESPECTRO DE INHIBICIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS POR EXTRACTOS VEGETALES. Olvi Ramirez y Armando Cáceres demostró que extractos metanólicos de zarzaparrilla (*S. lundelli*) poseen acción inhibitoria cuando se enfrentan a cepas de *S. aureus*, *S. Typhi* y *P. aeruginosa*. (Facultad de CCQQ y Farmacia. USAC 1988).

Lucrecia Arriola y Armando Cáceres realizaron un estudio sobre INHIBICIÓN DE LEVADURAS PATÓGENAS AL HOMBRE POR *Rizophora Mangle* y *Smilax lundelli* lo cual demostró que las maceraciones etanólicas vegetales de *S. lundelli* presentan actividad fungicida *in vitro* contra *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. parapsilosis* y *C. neoformans*. (Facultad de CCQQ y Farmacia. USAC 1993).

Un estudio reportado por NAPRALERT (Sep. 1997); en Alemania con material de México, se encontró actividad antibacteriana (*Bacillus subtilis* 1,0 µg/disco, *Micrococcus luteus*, 10,0 µg/disco, *Escherichia coli*, 20 µg/disco).

Caracterización:

Iris Reyes y Héctor Garrido en un estudio sobre OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SAPONINAS DE LA RAIZ SECA DE *Smilax lundelli* y *Smilax regelli* (Zarzaparrilla) A NIVEL DE PLANTA PILOTO, UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN determinó que de tres métodos ensayados: maceración, circulación en frío y agitación en frío; el método de circulación en frío es el que presenta el rendimiento más alto para la obtención de extractos blandos; y en el tamizaje fitoquímico se identificaron componentes activos como lo son flavonoides y saponinas estando presente como sarsapogenina a una concentración de 0.15% . (Facultad de Ingeniería USAC 1992).

Brenda de la Cruz y Armando Cáceres, en un estudio sobre caracterización de esta especie determinó que el mejor disolvente para la extracción de los componentes de la planta es etanol a una concentración del 70% v/v y la apariencia física de extracto 1:1 es líquida y para extracto 1:4 es sólida. (Facultad de CCQQ y Farmacia. USAC 2005).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. *S. domingensis* (Zarzaparrilla)

Más comúnmente conocida como zarzaparrilla, a continuación se describen elementos que caracterizan a *S. domingensis*.

2.1.1. Sinónimos

S. caudata Lundell, *S. lundellii* Killip & Morton, *S. lanceolata* auct., non, Linneo, *S. microscola* Robinson Killip et C. Morton.

2.1.1. 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 brevispidado, la base aguda, el margen entero; peciolo 0.5-2 cm. Umbelas estaminadas solidarias; pedúnculo 1-5 mm, más corto que el peciolo subyacente, subterete. Tépalos de las flores postiladas 4 mm. Bayas 7-10 mm, rojas, purpúreas o negras.¹³

Figura 1 hoja y flor de Zarzaparrilla (*S. domingensis*)



2.1.3. Hábitat

Crece en bosques o matorrales húmedos o secos de latifoliadas, en laderas, hondonadas y orillas de quebradas trepando sobre las ramas de los árboles. Distribuida en México y Centro América a una altitud desde los 200 hasta 1.800 msnm se ha descrito en Alta Verapaz, Escuintla, Izabal, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa ¹³.

2.1.4. 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 1536. Gerard (1633) las menciona como “un remedio contra los dolores crónicos de las articulaciones y la cabeza y contra los resfrios” Ximenez se refiere a esta planta como “una de las cosas en que la Divina Omnipotencia parece que más se esmeró en comunicarle virtudes...”

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 1850 vuelve a tener importancia al incorporarse a la U.S. Pharmacopoeia donde permanece para tratar sífilis hasta 1950. 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 ⁴.

2.1.5. Agricultura

Este cultivo puede considerarse como orgánico ya que se recomienda sembrarlas en bosques y su manejo no requiere utilización de productos químicos. La siembra se recomienda en bosques, latifoliadas junto a árboles que le servirán de sostén y tengan una arquitectura que facilite que los tallos trepen y los zarcillos se enrollen en ramas delgadas.

La cosecha bajo manejo puede llevarse a cabo a partir de siete años contados a partir del momento en que se produjeron las plantas de almácigo. La cosecha consiste en extraer los rizomas del suelo. Una forma que se plantea para no hacer una extracción destructiva es cosechar los rizomas secundarios, dejando el rizoma principal para mantener la planta madre. Para su cultivo se requiere suelo bien drenado, caliente a media sombra, abundante humedad y condiciones boscosas para la enredadera. La propagación puede hacerse por semillas, estacas de madera o divisiones del rizoma; El rizoma se colecta al final de las lluvias y se seca al sol ^{4,13}.

Figura 2 Rizoma recién extraído de Zarzaparrilla (*S. domingensis*)



Figura 3 Rizoma seco de Zarzaparrilla (*S. domingensis*)



2.1.6. Usos medicinales atribuidos

El cocimiento del rizoma es de uso medicinal en la región. Por vía oral para tratar anemia, afecciones gastrointestinales, hinchazón, malaria, dolor de riñones, enfermedades de la sangre y venéreas, hepatitis, reumatismo y tumores; tópicamente para tratar afecciones dermatomucosas (alergias, eczema, liquen plano, tinea, psoriasis).

Se le atribuye propiedad antirreumática, antiinflamatoria y diurética, está indicado su uso oral en el tratamiento de artritis reumatoidea, reumatismo crónico, lepra y disuria ¹³.

2.1.7. Farmacología

A continuación se presentan los dos tipos:

2.1.7.1. Experimental

En 1997 Oscar Castro, comprobó la actividad antihemorrágica de *Smilax spp* ya que la investigación demostró que los extractos crudos hidroalcohólicos derivados de una muestra de 400g de rizoma, anulaba el efecto hemorrágico provocado por una dosis controlada de veneno de terciopelo inyectado intradermicamente en la piel del ratón. La decocción y extracto metabólico son activos contra *C. albicans* ⁵.

La tintura es activa contra bacterias gramnegativo y grampositivo, pero inactiva contra *Vibrio cholerae* y causales de infecciones de la piel (*E.coli*) ³. La decocción y extracto metabólico son activos contra *C. albicans* ⁹. La decocción es diurética en ratas comparable a hidroclorotiazida ⁴. La infusión no es espasmolítica, pero tiene actividad hepatoprotectora ¹⁵. La decocción tiene cierta actividad inmunomoduladora en ratones medida por un aumento de la población de linfocitos y en los títulos de anticuerpos séricos ⁹.

En un estudio realizado en Alemania con material de México, se encontró actividad antibacteriana (*Bacillus subtilis* 1,0 µg/disco, *Micrococcus luteus*, 10,0 µg/disco, *Escherichia coli*, 20 µg/disco).

2.1.7.2. Clínica

Estudios clínicos con 50 Pacientes con vaginitis por *C. albicans* demuestran que los óvulos de tintura se comportan en forma similar a Nystatina¹⁸. En otro ensayo se probó una crema a base de tintura en 76 trabajadores de dos industrias de alimentos con pie de atleta, se confirmó la infección dermatofítica demostró mejoría clínica similar a Tolnaftalato después de 15 días de tratamiento, aunque no se demostró negativización ⁴.

2.1.8. Composición química

El tamizaje fitoquímico indica la presencia de alcaloides, aceite esencial, esteroides insaturados, glucósidos esferoidales (saponinas, cardenólidos, bufadienólicos), flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles, resinas, azúcares y grasas ². Se han aislado agliconas esteroidales (parillina, sarsasapogenina, smilagenina), beta-sitosterol, stigmasterol, ácido sarsápico ¹³.

2.1.9. Farmacognosia:

La actividad antimicrobiana se le atribuye a las saponinas; la parillina es antimicótico y antitumoral ¹². La sarsapogenina tiene actividad antiinflamatoria ¹⁰.

2.1.10. Toxicología:

La decocción tiene una DL₅₀ por vía oral en ratones mayor de 30 g/kg ⁴. La administración aguda del extracto no tiene efectos tóxicos en ratones; la crónica no produce ni síntomas, ni cambios sanguíneos sugestivos de toxicidad. La DL₅₀ del extracto de la parillina cristalizada en ratones es de 10 mg/kg administrada por vía intraperitoneal y 30 mg/kg por vía oral ⁴.

2.1.11. Indicaciones terapéuticas

Se usa por vía oral para el tratamiento de anemia, afecciones gastrointestinales (diarreas, dolor de estómago, inapetencia) ^{4,11} hinchazón, malaria ⁴, dolor de riñones, enfermedades de la sangre y venéreas, hepatitis reumatismo ⁴, y tumores ⁸. La decocción se aplica tópicamente para tratar afecciones dermatomucosas (alergias, eczema, liquen plano, tinea, psoriasis) ⁴.

2.2 Producto fitoterapéutico

Es un producto técnicamente obtenido y elaborado, usando exclusivamente materias primas activas vegetales, con finalidad profiláctica, curativa o para fines de diagnóstico con beneficio para el usuario. Esta clase de medicamentos se caracteriza por el conocimiento que se tiene sobre su eficacia y sobre los riesgos de su utilización, así como, por la reproducibilidad y su calidad constante; se presentan como un producto final acabado, empaquetado y etiquetado.

2.2.1. Extractos botánicos

Involucran la remoción del componente deseado del material vegetal con un menstuo apropiado, evaporación de casi todo el disolvente y ajuste de los fluidos residuales, masas o polvos a los estándares prescritos. Sustancias inertes apropiadas pueden ser añadidas vehículos o diluyentes para mejorar las características físicas. Se pueden añadir antimicrobianos y otros preservativos apropiados para mantener la integridad. Los extractos bien preparados por lo general son de color oscuro y de aspecto fino, liso y transparente. Sólo cuando son preparados al vacío presentan una coloración más clara.

2.2.2. Tipos de extractos botánicos

A continuación se presentan cinco tipos:

2.2.2.1. Fluidos

Los extractos fluidos son preparaciones de material vegetal que contienen alcohol como disolvente o como preservante, o ambos; preparados de tal manera que en general corresponden a la droga seca en una proporción de 1:1 (1 mL de extracto corresponde a 1 g de la droga seca), también se les conoce como extractos líquidos. Son preparados por percolación, generalmente después de un periodo de maceración. El procedimiento de manufactura más común incluye la concentración de la porción más diluida del percolado por evaporación o destilación al vacío a temperaturas por debajo de los 60°C.

La tasa de flujo del percolado puede ser lenta, moderada o rápida. En referencia a la extracción de 1,000 g de material original, a una tasa lenta, no más de 1 mL del percolado es producido por minuto: a una tasa moderada entre 1 y 3 mL/min y a una tasa rápida, entre 3 y 5 mL/min. Un extracto fluido que tienda a depositar sedimento puede estar viejo, se debe filtrar o decantar la porción clara, siempre y cuando el resultante líquido clarificado cumpla con los estándares farmacopéicos.

Las ventajas de los extractos fluidos se centran en la relación ponderal simple entre la droga y el extracto, facilitando la posología y la prescripción. Entre las desventajas figuran sus características organolépticas algo desagradables y la conservación difícil.

2.2.2.2. Extractos semisólidos o blandos

Son poco empleados, tienen consistencias entre aquellas de los extractos fluidos y los extractos pulverizados (miel espesa), son obtenidos por evaporación parcial del disolvente (agua, alcohol o mezcla hidroalcohólica) utilizado en la extracción. Pueden contener algún antimicrobiano apropiado u otro preservante. Un extracto semisólido y un extracto pulverizado obtenido a través del mismo material son intercambiables como drogas o como suplementos, pero cada uno tiene sus propias ventajas.

La mayoría de los Códex les permiten un tenor de agua entre 12- 15% aunque en muchas ocasiones se lo lleva hasta un 20-25%.

2.2.2.3. Secos

Son preparaciones sólidas con consistencia de polvo o granulados, son obtenidas por la evaporación del disolvente utilizado para la extracción. Presentan una fácil manipulación y dosificación y una menor carga bacteriana en relación con los otros tipos de extractos, pudiendo ser esterilizados por radiación gama.

Pueden contener sustancias apropiadas añadidas, tales como excipientes, estabilizantes y preservantes. Otra particularidad radica en su alta concentración, activa en pequeños volúmenes, sin embargo, presentan menor solubilidad, debido a materias que se forman en los últimos estados de evaporación, contienen un 5-8% de agua o humedad residual, son recomendables para la elaboración de otras formas farmacéuticas, como tinturas, lociones, cápsulas y jarabes, suelen ser muy higroscópicos, y la conservación es algo dificultosa y al resguardo de la luz. Presentan algunas ventajas como la de concentrar una alta actividad con un peso pequeño, el poder incorporarlas a las formas secas (cápsulas por ejemplo) y la posibilidad de conservar la actividad de la droga de origen.

2.2.2.4. Extracto pilular o firme

Es aquel que tiene la consistencia de una píldora (de ahí pilular). No debe adherirse a los dedos. El Codex le autoriza un tenor de agua de 12 y 15%.

2.2.2.5. Extractos hidroglicólicos

Contienen intactas las fracciones aromáticas (aceites esenciales) y las hidrosolubles (taninos, aminoácidos, etc.) de manera perfectamente asimilable. Contiene titulaciones cercanas al 50% del peso de la planta fresca.

2.2.2.6. Consideraciones finales

Los extractos acuosos son solubles en agua y producen una solución transparente, o ligeramente turbia si fue preparado con mucha antelación. No se conservan tanto como los extractos secos o pilulares. Los extractos alcohólicos son parcial o totalmente insolubles en agua, y tienen un excelente índice de solución.

En los casos de falsificaciones, suelen reemplazar un extracto alcohólico por uno acuoso; o reemplazar las materias primas por otras de inferior calidad. Algunas adulteraciones presentan glicerina, fécula, goma o dextrina a efectos de obtener extractos secos con finas escamas que realzan su aspecto.

Los extractos, deben conservarse al abrigo de la luz, en envases oscuros, ambiente seco y correctamente tapado a fin de evitar la penetración de humedad.

2.3. Operaciones que influyen en la fabricación de un producto fitoterapéutico

La fabricación de un producto fitoterapéutico o el aislamiento de un constituyente químico a partir de la materia prima vegetal comprenden las operaciones de molienda, extracción, concentración, purificación y secado.

2.3.1. Molienda

La molienda tiene como objetivo la disminución del tamaño de las partículas de la droga vegetal para adecuarla a la etapa siguiente del proceso de extracción. La extracción de una droga entera o dividida en fragmentos gruesos sería incompleta, debido a la pobre penetración del disolvente en el tejido vegetal, y sería igualmente muy lenta.

La molienda del material vegetal, independientemente de su naturaleza y del tipo de molino usado, da como resultado la producción de una cierta cantidad de partículas muy finas, las cuales deben ser separadas, por lo cual la operación de molienda debe ser seguida por el tamizaje del material obtenido. Las partículas que exceden el tamaño adecuado deben retornar al molino para ser reducidas aún más, descartándose también el polvo muy fino.

La Farmacopea Brasileña recomienda que cuando el material vegetal tiene como destino la producción industrial de extractos y tinturas se usa, en general, el polvo clasificado como “moderadamente grueso” (pasa en su totalidad 60% por el tamiz No. 22).

La selección del equipo para la molienda está en función de la naturaleza de la droga vegetal y del tamaño de partícula del polvo que se pretende obtener. La reducción del tamaño de las partículas se consigue básicamente, utilizando dos mecanismos: el corte y la trituración.

Los molinos de cuchillas se utilizan para el corte (hojas, tallos, cortezas y raíces, y para la trituración (drogas desmenuzables y para las que contienen resinas) se utilizan los molinos de martillos que al igual que el de cuchillas el tamaño de partícula de la droga molida está en función de la abertura de la malla adaptada al molino; el material que va a ser molido es triturado contra las paredes del molino y empujado a través de las aberturas de la malla.

2.3.2. Extracción

Antes de empezar un proceso extractivo se debe definir la selectividad del disolvente a ser usado en el proceso. Dependiendo el proceso al que se destine, se puede obtener un extracto de composición química con mayor parte de los constituyentes químicos de la planta, o un extracto que contiene solamente constituyentes químicos con determinadas características.

En el primer caso, normalmente se usa un solvente de naturaleza general, de alta polaridad, como el alcohol etílico o el metanol. En el segundo caso se emplea un solvente selectivo, de menor polaridad, como el hexano que solo extrae de la planta las grasas vegetales y otros componentes apolares.

La escogencia del disolvente de extracción, así como la permanencia en la composición química de la materia vegetal, representan dos aspectos de suma importancia, en cualquier proceso de fabricación, bien sea de productos fitoterapéuticos o bien sea de sustancias naturales aisladas.

La penetración del solvente en la célula induce un momento dipolar en las moléculas de los compuestos que van a ser extraídos. Es de esta manera como las sustancias extraíbles se adhieren a las moléculas del solvente. La capacidad de asociación puede expresarse en términos de (ϕ) . Cuanto más polar sea un disolvente mayor será su (ϕ) . Compuestos ionizables y/o altamente polares se disuelven en disolventes de elevada (ϕ) ; al igual que compuestos apolares se disolverán en disolventes de baja (ϕ) .

La capacidad de una mezcla de disolventes de inducir un momento dipolar puede ser calculada. La (ϕ) del sistema depende de la constante de cada uno de ellos y de su respectivo porcentaje en la mezcla. Siendo así, se puede calcular (ϕ) del sistema a través de la fórmula:

$$(\phi) = \frac{\phi A * \%A + \phi B * \%B + \dots \phi n * \%n}{100} \quad (\text{Ec.1})$$

Un sistema constituido por 50% de agua, 30% de alcohol etílico y 20% glicerina, posee una constante dieléctrica de:

$$(\phi) = \frac{(78.3 * 50) + (24.3 * 30) + (43 * 20)}{100} = 56.09$$

Los disolventes más usados en las industrias de productos fitoterapéuticos son el agua, alcohol etílico, glicerina, el propilenglicol y mezclas de estos líquidos.

En el proceso de escogencia de un disolvente determinado es necesario considerar aspectos relacionados con la selectividad, la facilidad de manipulación, el precio, la seguridad, la seguridad y los riesgos en cuanto a una posible contaminación ambiental. Sin embargo, el aspecto más importante a ser considerado es el grado de toxicidad del solvente. En el supuesto caso en que parte del solvente permanezca en el producto acabado, el solvente debe ser aprobado por el órgano nacional responsable del registro del producto fitoterapéutico. Por esta razón, los productos fitoterapéuticos son elaborados, principalmente, con mezclas hidroalcohólicas.

El agua utilizada en los procesos extractivos no necesita ser desmineralizada o destilada, puesto que la materia prima vegetal contiene sustancias minerales en diferentes concentraciones. Por consiguiente, es suficiente que el agua sea potable, y será utilizada siempre y cuando no posea dureza excesiva y tenga pureza microbiológica compatible.

2.3.2.1. Variables del proceso extractivo

Las variables que interfieren en el proceso de extracción, independientemente de la escala de producción o del tipo de producto final, son: el estado de división de la droga, la agitación, la temperatura, el pH, la naturaleza del solvente y el tiempo de extracción.

2.3.2.2. División de la droga

Una subdivisión demasiado fina puede dar como resultado que se apelmacen los sólidos durante la extracción e impidan, por consiguiente, el movimiento del disolvente sobre la superficie.

La extracción es difícil cuando los sólidos finamente divididos se tratan como carga estacionaria no agitada, o pasan por la extracción continua sin agitación. Es probable que se produzcan canales preferenciales y que una buena parte de la superficie no este suficientemente expuesta al disolvente en movimiento. Por otro lado, la penetración del disolvente en fragmentos mayores de la droga es lenta y la salida de las sustancias extraíbles es difícil. Por esta razón, se recomienda la utilización de polvos moderadamente gruesos para la gran mayoría de drogas.

Lo que se necesita para muchos métodos de extracción es el uso de sólidos con estructura porosa y abierta o preparados en tamaños y formas que proporcionen gran superficie para que el disolvente se mueva libremente. Esto es mejor que una subdivisión excesiva.

2.3.2.3. Agitación

La dispersión de las partículas en la solución líquida por agitación o por una circulación continua y vigorosa del líquido permite un contacto minucioso entre la superficie y el disolvente en movimiento. Esas operaciones, aunque dan una buena extracción, ocasionan a veces la suspensión de partículas finas en el líquido saliente y pueden exigir la aplicación de métodos difíciles de filtración y de clarificación.

2.3.2.4. Temperatura

La disolución de las sustancias extraíbles es facilitada por el aumento de la temperatura; la temperatura contribuye al desplazamiento de la constante de equilibrio de saturación y aumenta la eficiencia del proceso. Sin embargo, muchos principios activos son termolábiles y pueden ser destruidos, total o parcialmente, a temperaturas elevadas, puede causar la pérdida de sustancias volátiles, como por ejemplo, los componentes de aceites esenciales. La viscosidad del disolvente, como propiedad específica del líquido, es función de la temperatura, y, con la variación que experimenta al disolverse el soluto, influye en la rapidez y la perfección de la extracción.

2.3.2.5. pH

El pH influye en la solubilidad de diversos compuestos ya que permite la posibilidad de formación de sales.

2.3.2.6. Naturaleza del disolvente

Los líquidos poco viscosos facilitan la extracción y dan velocidades de difusión mayores para la transferencia del soluto. Los disolventes usados para la extracción son volátiles con el fin de que sea posible recuperar fácilmente los productos vaporizando el disolvente.

Entre los solventes generales, los más utilizados son los alcoholes alifáticos de hasta tres carbonos o mezclas de estos con el agua. Estos solventes logran extraer la gran mayoría de las sustancias naturales de interés como los alcaloides, los flavonoides, los glicósidos cardiotónicos y los terpenos y son los indicados para los casos en que los constituyentes activos de las plantas no son bien conocidos, siendo necesario agotar completamente la droga. El alcohol etílico y sus mezclas con agua es el solvente por excelencia para la obtención de extractos y tintura.

Cuando no existen estudios específicos, se recomienda utilizar una mezcla de alcohol: agua 7:3 u 8:2 para la extracción de las partes leñosas de la planta, raíces y semillas, mientras la proporción de 1:1 es recomendada para extraer las hojas o las partes aéreas verdes.

El costo del disolvente, su inflamabilidad y su toxicidad son a menudo los factores que deciden su elección. A veces, para evitar costosas operaciones subsiguientes de purificación, se elige un disolvente menos eficaz, pero más selectivo, prefiriéndolo a otro de una potencia disolvente mayor que disuelve también impurezas de los sólidos.

2.3.2.7. Tiempo

El tiempo de extracción se determina experimentalmente en función del disolvente y del equipo seleccionado. Éste debe ser suficiente para permitir la separación de los compuestos de interés, aunque se debe prestar cuidado para que no sea excesivo. Prolongar el tiempo de extracción más allá del estrictamente necesario, no influye en el proceso negativamente, pero sí influye en los costos del consumo de energía y de mano de obra necesaria, lo que acarrea un encarecimiento del proceso.

2.3.3. Métodos de extracción

La extracción de sólidos por medio de disolventes, o sea, la extracción líquido-sólido, es una operación en la cual se separan componentes de sólidos disolviéndolos en líquidos. Esta operación se designa en las diferentes industrias por diversos nombres, como lavado, lixiviación, elusión, elutriación, difusión, percolación, decocción, decantación, infusión, maceración, digestión y disolución; todas ellas designan algún modo de transferencia de materiales solubles desde sólidos al agua u otros disolventes.

El material soluble, llamado soluto, puede ser un sólido o un líquido dispersado por los sólidos insolubles, cuyas superficies reviste, disuelto en un líquido adherido a los sólidos o arrastrado por ellos, o, en muchos casos, de materias animales o vegetales, ocluido en la estructura celular. Los sólidos sufren, por lo general, un tratamiento mecánico y a menudo térmico antes de la extracción, a fin de hacer el soluto accesible a la acción disolvente por medio de una o varias operaciones de preparación o acondicionamiento, como trituración, tostado, laminación, pulverización, compresión, escamación, calentamiento, tratamiento con vapor o humedecimiento. Las operaciones de extracción se usan mucho en las industrias químicas.

Esta operación se aplica mucho en la fabricación de productos farmacéuticos, en la cual casi todos los productos de origen animal o vegetal sufren una o varias extracciones con disolventes para su obtención y purificación. Son del trabajo ordinario las extracciones con agua, alcoholes concentrados o diluidos y acetona.

2.3.3.1. Maceración

Este método expone la droga a un determinado disolvente en frío o a temperatura ambiente durante días o semanas, con agitación ocasional. Se utiliza cuando la droga no puede exponerse al calentado por ser termosensible. Pueden ser hechas en agua (maceración acuosa) o en alcohol (maceración alcohólica).

Las grandes desventajas del proceso de maceración son la lentitud del proceso y el hecho de no ser posible alcanzar la extracción completa de la droga.

2.3.3.2. Percolación

Consiste en hacer pasar el solvente a través de la droga, hasta su extracción exhaustiva completa. En la manufactura de los extractos la percolación es el método más común. La percolación a pequeña escala o en escala industrial, comprende una etapa preliminar de humedecimiento de la droga, se deja reposar por 15 minutos fuera del percolador. Este procedimiento tiene como objetivo aumentar el contacto, facilitando el paso del disolvente y no permitiendo la formación de falsas vías, que perjudican la eficiencia del proceso. El humedecimiento de la droga aumenta la porosidad de la pared celular y facilita la difusión de las sustancias extraíbles hacia el exterior de las células, y debe ser realizado fuera del percolador, ya que la droga puede hincharse excesivamente, principalmente cuando el disolvente es acuoso, y comprimirse contra las paredes del percolador, no permitiendo el paso del disolvente.

En pequeña escala, la percolación se realiza en aparatos denominados percoladores, de cuerpo cilíndrico o cónico, provistos de un grifo en la parte inferior, para regular el flujo del disolvente, la capa de la droga debe ser igual a 5 veces el diámetro medio del equipo. La parte inferior del percolador se cubre con un material filtrante. La carga y la descarga se hacen a menudo a mano. La carga del material sólido puede ser de unos cuantos kilogramos hasta varias toneladas.

2.3.4. Clarificación de los extractos

El objetivo de esta etapa es retirar el residuo de droga que a veces queda presente en los extractos, así como el material indeseable formado durante el proceso de concentración. Mientras la percolación da como resultados generalmente extractos límpidos, el proceso de maceración frecuentemente involucra el paso de partículas finas de la droga al extracto. Por lo cual, los extractos concentrados, al enfriarse, presentan frecuentemente precipitados floculentos, constituidos generalmente por material inerte.

La manera más simple de separar los sólidos indeseables del extracto es la sedimentación o decantación, que consiste en dejar la suspensión en reposo hasta que las partículas sólidas se depositen en el fondo del recipiente. El sobrenadante límpido se separa haciendo sifón. Industrialmente la clarificación puede obtenerse a través de la centrifugación o a través de la filtración, en un filtro-prensa. Los filtros-prensas son equipos versátiles y la superficie filtrante puede estar constituida por papel de filtro, telas o tejidos sintéticos.

2.3.5. Concentración

La concentración representa la etapa siguiente al proceso de extracción. El proceso de concentración busca aumentar el contenido de sólidos en el extracto con la finalidad de:

- a) alcanzar un determinado contenido del residuo seco.
- b) fabricar extractos blandos.
- c) como etapa preliminar en la producción de extractos secos.

La mayoría de los extractos deben ser evaporados a temperaturas bastante bajas en la medida de lo posible, así como al vacío.

El equipo necesario para la concentración con recuperación de disolvente es el evaporador rotatorio, cuyo funcionamiento se basa en los siguientes principios: (1) se coloca la muestra en un balón de evaporación a 40°C que rota a una velocidad constante produciendo una película que aumenta la superficie de evaporación; (2) con la ayuda de una bomba se genera un vacío entre 30 y 300 mbar que facilita la evaporación sin necesidad de aumentar la temperatura; (3) el vapor del disolvente es condensado en el refrigerante que está conectado a un sistema de enfriamiento que luego se colecta en un balón.

2.3.6. Secado

La operación de secado consiste en retirar el agua u otro disolvente y se lleva a cabo cuando se quiere obtener extractos secos, que ofrecen ventajas particulares, como la estabilidad química y mayor facilidad de almacenamiento y transporte. Al igual que en la operación de concentración de los extractos, las sustancias termolábiles pueden ser destruidas durante el proceso; por consiguiente las condiciones de secado deben ser establecidas teniendo en cuenta la naturaleza de sus constituyentes.

2.4. Caracterización química

Entre los procedimientos utilizados se tiene:

2.4.1. Características organolépticas

Dentro de los procesos directos de identificación de la materia prima están las características organolépticas, aquellas que pueden ser definidas por nuestros sentidos. Es de importancia el registro de éstas en los tejidos botánicos, así como la presencia o ausencia de olor.

La monografía individual puede incluir información botánica sobre posibles especies adulterantes para ayudar a garantizar su ausencia en el material crudo.

2.4.2. Características fitoquímicas

Aunado al examen botánico está el análisis fitoquímico que ayuda a autenticar la identidad del material vegetal. La identificación química generalmente utiliza procedimientos cromatográficos para detectar la presencia de compuestos marcadores. Los perfiles cromatográficos o espectroscópicos pueden ser usados para obtener la identificación química comparando siempre contra un estándar o muestra de referencia. Algunos ejemplos de métodos espectroscópicos son: el Ultravioleta-visible (UV-Vis), Infrarrojo (IR) e infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). Los ejemplos de métodos cromatográficos incluyen: Cromatografía Líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés), Cromatografía de capa fina (TLC), TLC bidimensional y cromatografía de gas (GC).

2.4.3. Constituyentes primarios y secundarios

La quimiotaxonomía puede ser de utilidad en la identificación de material vegetal. Los compuestos metabólicos encontrados en los tejidos vegetales pueden ser divididos en dos grandes categorías basadas en sus funciones. La primera categoría comprende los metabolitos primarios que son los involucrados en los procesos fisiológicos de la planta, absolutamente necesarios para la vida y son omnipresentes en el reino vegetal; estos procesos incluyen, la fotosíntesis, respiración y metabolismo del ácido nucléico, proteínas, carbohidratos y lípidos. La segunda comprende los metabolitos secundarios, compuestos que se cree que no son absolutamente necesarios para los procesos de la vida, aunque pueden tener funciones importantes en las interacciones de la planta con otros organismos, tales como interacciones alelopáticas, defensa química contra herbívoros y patógenos y atracción para la polinización y animales dispersadores de semilla.

Muchos metabolitos secundarios son conocidos por tener actividad farmacológica y, además, son la base para la quimiotaxonomía de las plantas. Los metabolitos secundarios pueden ser clasificados en diferentes clases químicas, tales como: Aminoácidos no proteicos, flavonoides, xantonas, cumarinas, poliacetilenos, policétidos cíclicos, monoterpenos, sesquiterpenos, iridoides, triterpenos, esteroides, terpenos que contienen nitrógeno y alcaloides. Estas clases químicas no son omnipresentes en el reino vegetal, pero tienden a ser específicas de ciertas clases botánicas, órdenes y familias. Además, muchas subclases químicas y compuestos secundarios individuales son específicos para ciertas subfamilias, géneros y especies. Son estas subclases químicas y compuestos individuales los que pueden ser usados como compuestos marcadores para ayudar en la identificación apropiada del material vegetal.

2.4.4. Identificación química

Para la identificación química de artículos botánicos se preparan extractos, que en su mayoría no se conoce con certeza cuál de los componentes es el responsable del efecto farmacológico reportado. Generalmente se cree que varios constituyentes actúan sinérgicamente para proveer el efecto reportado.

Para el material vegetal que posee una monografía, ciertos constituyentes químicos son elegidos y se describen ensayos cuantitativos para evaluar su contenido. La elección de tales componentes, generalmente conocidos como marcadores, esta basada en ciertas consideraciones. Actualmente, los siguientes tipos de marcadores son especificados en las monografías y pueden ser identificados en la materia prima.

2.4.4.1. Principios activos

Son constituyentes que tienen actividad clínica probada.

El contenido mínimo o rango para los principios activos es especificado usualmente en la monografía individual.

Una determinación cuantitativa de los principios activos durante los estudios de estabilidad de las formas de dosificación botánica proporciona la información necesaria para llegar a la fecha de vencimiento conveniente.

2.4.4.2. Marcadores activos

Son compuestos que tienen actividad farmacológica conocida y contribuyen en cierto grado a la eficacia. Sin embargo, la eficacia clínica para estos constituyentes puede no estar demostrada. Un contenido mínimo o rango de marcadores activos es especificado usualmente en la monografía individual. Una determinación cuantitativa de los marcadores activos durante los estudios de estabilidad de las formas de dosificación botánicas, proporciona la información necesaria para llegar a la fecha de vencimiento conveniente.

2.4.4.3. Marcadores analíticos

Cuando los principios activos ni los marcadores activos son definidos, otros constituyentes son utilizados para la determinación cuantitativa. Estos marcadores ayudan en la identificación del material. Manteniendo un contenido mínimo o rango específico de los marcadores analíticos podemos llevar a cabo la estandarización del extracto vegetal y obtener la fecha de vencimiento conveniente durante los estudios de estabilidad.

2.4.4.4. Marcadores negativos

Son constituyentes que pueden tener propiedades tóxicas o alergénicas, siendo indeseables su presencia en el extracto botánico. Ejemplo de estos son los ácidos ginkgólicos del ginkgo. Un límite riguroso de estos marcadores puede ser especificado en la monografía individual.

2.4.5. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios

El cribado fitoquímico tiene como objetivo general la determinación cualitativa de los principales grupos químicos presentes en el material vegetal y que por lo general son los grupos responsables de la actividad farmacológica. Estos ensayos son simples y pueden utilizarse de forma general para la caracterización de extractos obtenidos de material vegetal pero no son ensayos cuantitativos, por lo tanto, no indican por sí solos la calidad del material vegetal.

Las técnicas de determinación cualitativa más corrientemente utilizadas incluyen la determinación de la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, antracenos, esteroides insaturados, saponinas, glicósidos cardioactivos, taninos y otros grupos fenólicos.

2.4.5.1 Cromatografía en capa fina

Este método sirve para identificar las drogas vegetales, sus extractos y tinturas e igualmente para que en una formulación farmacéutica sea posible identificar la presencia de una droga o de sus extractos.

La cromatografía de capa fina es una técnica de separación en la cual la fase estacionaria es esparcida sobre un soporte (placa) de vidrio, metal o plástico, como una capa delgada y uniforme. Las soluciones de los analitos son depositadas sobre la placa y luego corridas. La separación se basa en adsorción, partición, intercambio iónico o en combinaciones de estos mecanismos y se lleva a cabo por la migración a través de la fase estacionaria de los solutos en un disolvente o mezcla apropiada de disolventes. Inicialmente, es necesario precondicionar las placas cromatográficas, lo cual se puede realizar corriéndolas en un disolvente apropiado y, al momento del uso, calentándolas en un horno de 100 a 105⁰C por una hora. En capa fina las fases estacionarias pueden ser: sílicagel 60F₂₅₄, óxido de aluminio y celulosa.

2.4.6 Determinación cuantitativa de los principios activos

La escogencia del método para la determinación cuantitativa de los principios activos depende de la monografía, que debe ser considerada en su totalidad, para poder garantizar una adecuada calidad del producto. Muchas veces la selección recae en un método no específico, de elevada precisión y fácil ejecución. Es el caso de la determinación de alcaloides por el método volumétrico ácido-base o por la titulación en un medio no acuoso. Esta decisión es influenciada por las impurezas presentes en la droga. Aunque la determinación de las impurezas puede ser realizada por medio de ensayos cromatográficos, la utilización de un método menos específico, pero preciso, debe ser preferida. En los casos en que las impurezas no sean determinadas con facilidad, los métodos más indicados son la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) o la cromatografía de gases, estos métodos generalmente exigen un mayor trabajo y equipos sofisticados y de alto costo.

2.3.7. Flavonoides

Son los pigmentos virtualmente universales en las plantas. Casi siempre solubles en agua y son responsables por el color de flores, frutos y algunas veces las hojas. Los flavonoides están también universalmente presentes en la cutícula de la hoja y células epidérmicas donde ellos aseguran protección contra el efecto de la radiación ultravioleta.

Todos los flavonoides aproximadamente 3,000 tienen en común el origen biosintético, y por ende posee la misma estructura básica, denominada 2-fenilcromano. La migración del anillo de fenilo a la posición 3 resulta en un esqueleto de 3-fenilcromano, dando origen a los isoflavonoides. Cuando es un esqueleto de 4-fenilcromano se llaman neoflavonoides.

Los flavonoides propiamente dichos pueden ser clasificados de acuerdo al estado de oxidación del anillo del pirano central en al menos 12 grupos, como flavonas, flavonoles, flavamonas, dihidroflavonoles, flavan-3-oles, flavan-3-dioles, chalconas, auronas y antocianidinas.

Además de los OH en las posición, n3, 5, 7 y 4 pueden encontrarse en formas diméricas unidas a través de enlaces C-C de las posiciones 8 y 6 reactivas. También estos OH, pueden estar unidos por enlaces O-glicósidos los C-glicósidos aparecen unidos por las posiciones 6 y 8.

2.4.7.1. Actividad biológica de los flavonoides

La principal propiedad de los flavonoides es una actividad vitamina P, potencialmente activa sobre las venas, estas disminuyen la fragilidad y permeabilidad capilar. En adición, al hecho de la naturaleza de la vitamina de estos compuestos es cuestionable, ya que no hay prueba que la deficiencia de flavonoides conduzca a algún síndrome, es mejor referirse a estos como factor P o vitamina factor P. La FDA no reconoce ninguna actividad de este grupo de compuestos, sin embargo, en algunos países europeos, estos son ampliamente prescritos, recomendados por los farmacéuticos y comúnmente automedicados para tratar desórdenes circulatorios menores. Adicionalmente algunas moléculas han probado su eficacia en altas dosis.

El concepto de factor P es consecuencia de la observación que ciertos síntomas de escorbuto, curados por la administración de jugo de limón, no son curados por el ácido ascórbico. Por tanto se postula que el ácido ascórbico es solo activo en combinación con el factor P, primero identificado como flavonoides, luego como antocianinas y oligómeros flavonólicos.

Los flavonoides son a menudo antiinflamatorios, interviniendo con el metabolismo del ácido araquidónico, como apigenina, crisina, taxifolina, gopipina, etc. También, puede ser antialérgicos, hepatoprotectores, antiespasmódicos, disminuyen el colesterol, diuréticos, antibacterianos, citostáticos y captadores de radicales libres *in vitro*. La presencia de los flavonoides puede justificar en muchos casos el uso vernáculo para enfermedades relacionadas.

2.4.8. Saponinas

Los glucósidos saponínicos, también llamados saponinas o sapogeninas, son derivados terpénicos que agitados en el agua producen espuma semejante al jabón, así reducen la tensión superficial del agua. Son unos excelentes emulsivos. Se encuentran frecuentemente en las plantas medicinales.

Una de las características de las saponinas es producir la hemólisis de los glóbulos rojos (eritrocitos), por lo cual son muy dañinas si se inyectan directamente en la sangre; a causa de esto algunas plantas no son útiles en medicina; sin embargo, para los animales de sangre caliente apenas tiene toxicidad.

Se han utilizado mucho como agentes limpiadores y como espumantes, especialmente en líquidos de extinción de incendios. La hidrólisis de las saponinas mediante ácidos o enzimas, elabora un azúcar (generalmente una glucosa) y una sapogenina; algunos de estos azúcares son utilizados como materias primas para sintetizar hormonas esteroideas. Algunas plantas con alto contenido de glucósidos saponínicos son: hoja de acacia, hoja de abedul, castaño de indias, ginseng, flor de gordolobo, regaliz, hiedra, primavera, raíz de saponaria o jabonera, violeta y zarzaparrilla.

Medicinalmente, las saponinas relajan el intestino e incrementan las secreciones de las mucosas bronquiales, fluidifican estas y facilitan la expectoración (como la violeta, gordolobo y saponaria). Se emplean también como diuréticos y desinfectantes de las vías urinarias (como zarzaparrilla). En usos externos son analgésicas y cicatrizantes (como la hiedra).

2.5. Control de calidad de una droga vegetal

Aquí se tiene como objetivo asegurar la identidad de la droga, detectar posibles falsificaciones o adulteraciones, determinar el estado de conservación de la droga, determinar posibles contaminantes; valorar el contenido en principios activos o marcadores; esto se lleva a cabo a través de ensayos morfoanatómicos y organolépticos; ensayos fisico-químicos cualitativos y cuantitativos; ensayos biológicos.

2.5.1. Estudio de Estabilidad

El período de vida útil de un extracto o una tintura debe evaluarse en forma particular para cada uno. Los estudios de estabilidad natural surgen de repetir varios ensayos sobre la droga vegetal o el producto fitoterapéutico durante ciertos meses. La fecha de vencimiento de un extracto en general está entre los dos y los cinco años.

3. METODOLOGÍA

3.1. Localización

- El rizoma de la planta a analizar lo proporcionó el Laboratorio de Productos Fitoterapéuticos FARMAYA S.A. con la siguiente información:

Nombre de la planta: zarzaparrilla (*S. domingensis*)

Edad de la planta: 10 años

Proveedor: Eusebio Hernández.

Lugar: Aldea Cerro Gordo, Santa Rosa; altura sobre nivel del mar: 1070 m; latitud. 14° 25' 50"; longitud 90°18'44"

suelos sobre materiales volcánicos mezclados o de color oscuro en terreno casi plano o moderadamente inclinado.

- La obtención de los extractos y análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos FARMAYA S. A. Avenida Centroamérica 18-92, zona 1.
- Los análisis físico-químicos se realizaron en el Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos FARMAYA S.A., en el Laboratorio de la Sección de Química Industrial del Centro de Investigaciones de la Facultad de Ingeniería CII y en el Laboratorio de Físicoquímica de la Escuela de Ingeniería Química.
- Los análisis fitoquímicos se realizaron en el laboratorio LIPRONAT (Laboratorio de Investigación de Productos Naturales) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- El análisis de la concentración inhibitoria mínima se realizó en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

3.2. Recursos humanos

- Investigador: Carla Sofia Escobar Robles
- Asesora: Inga: Telma Maricela Cano Morales
- Coasesor: Lic: Armando Cáceres

3.3 Recursos materiales

3.3.1. Equipo

- Percolador de acero inoxidable
- Percolador de plástico 250 mL
- Molino de martillo marca Micropulverizer serie 66J190
- Rotavapor BÜCHI modelo R- 200/205, incluye condensador vertical de vidrio, con balón concentrador de 1000 mL con juntas 24/40, sistema de vacío con bomba marca BÜCHI modelo R-5000, sistema de enfriamiento con bomba de agua, sistema de baño calefactor que comprende 0-180°C, sistema de rotación con ajuste de 20-280 R/min.
- Potenciómetro HANNA pH 211
- Estufa eléctrica de mesa y dos hornillas marca Toastmaster
- Balanza digital marca Sartorius, precisión de 0.001 g, percibe hasta 400 g.
- Balanza Denver Instrument XE-100; max.100 g; e = 0.0001 g
- Balanza de humedad Sartorius MA45
- Horno Mufla marca Thermolyne 1400 Furnace. capacidad 1100°C.
- Sonificador marca Bransonic modelo 1510R-MT
- Campana bacteriológica con flujo laminar, luz ultravioleta Spectroline
- Espectrofotómetro marca Termo Spectronic modelo Genesis 10 uv de barrido.
- Campana bacteriológica
- Incubadora marca Precision Científico, modelo 368A, serie 22AJ-5, 120 V.

- Refrigeradora marca General Electric de 12 pies, modelo TBFC16SJB, 115V.
- Autoclave Market Jorge modelo STM-EL serie 11/86 230V.
- Estereoscopio marca Nacional 110-120 V.

3.3.2. Cristalería

- Viscosímetro de Ostwald
- Picnómetro de 9,796 mL
- Alcoholímetro 0-100° Gay-Lusac.
- Desecadora de vidrio
- Equipo de extracción Soxhlet marca Corning-Pirex, con condensador, balones esmerilados con capacidad de 250 mL.
- Balón de fondo redondo de 100ml
- Embudo KIMAX 58, vástago largo.
- Tubos con tapón de rosca de 15 mL
- Ampolla de decantación 500 mL
- Balones aforados con capacidades de 10, 50 y 500 mL.
- Beacker con capacidades de 25, 50, 250 mL.
- Tubos de ensayo.
- Varillas de agitación
- Crisoles
- Cápsulas de porcelana
- Cajas de Petri
- Probetas de 100 y 250 mL
- Pipetas de 10, 1, 5 mL
- Galones de plástico 5L de capacidad
- Puntas amarillas de 200 μ L
- Puntas azules de 1000 μ L
- Pipetas automáticas
- Asa de nicromo en argolla aprox. 10 μ L
- Pinzas

- Gradillas
- Algodón
- Papel filtro No. 375
- Mechero Bunsen

3.3.3. Reactivos

- Caldo lactosado Mera
- Agar saboraaud Merck
- Agar Muller Hinton Merck
- Agua desmineralizada Salvavidas®
- Caldo tripticasa soya DIFCO
- Etanol 50%, 70%, 40%, 95% grado industrial
- Metanol 80% grado reactivo
- n-butanol grado reactivo
- Solución salina isotónica
- Ácido clorhídrico
- Ácido sulfúrico concentrado
- Anisaldehído
- Cloruro ferrico al 10 %
- Magnesio metálico
- NaOH
- Microorganismos:
 - Staphylococcus aureus* ATCC 25923
 - Salmonella typhi* ATCC 14028
 - Mycobacterium smegmatis* ATCC 607
 - Bacillus subtilis* (aislada Hospital General San Juan de Dios)
 - Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - Candida albicans* (aislada Hospital General San Juan de Dios)
 - Cryptococcus neoformans* (aislada Hospital General San Juan de Dios)
 - E. coli* ATCC 25922.

3.4. Metodología experimental

3.4.1. Diseño de repeticiones

Para cada extracto la materia prima que se utilizará es el rizoma seco y molido de zarzaparrilla (*S. domingensis*) tomando muestras de 200 g de rizoma para el extracto fluido de concentración 1:1 (1 mL de extracto corresponde a 1 g de droga seca) y 800 g para extracto seco de concentración 1:4 (1 mL de extracto corresponden a 4 g de la droga seca); el extracto fluido como seco se realizarán por triplicado, la extracción se realizará por el método de percolación de lecho estático con 24 horas de reposo; usando como solvente la mezcla etanol 70% v/v; agua 30% v/v, con $(\phi) = 40.5$

3.4.2. Manejo experimental

3.4.2.1. Preparación de la muestra

- Debido a que el rizoma de esta planta se vende en trozos de tamaño variable, se trituran en un molino de martillos con el disco de mayor tamaño, para obtener materia prima que tenga una estructura uniforme y así lograr el mayor aprovechamiento de área para una mejor extracción.
- A continuación se dan los tamaños que se utilizaron:
 - tamiz No. ½ tamaño 0.5 " = 1.49%; (manual)
 - tamiz No. 3/8 tamaño 0.37" = 6.42% (manual)
 - tamiz No. ¼ tamaño 0.25" = 14.76%; (manual)
 - tamiz No. 4 tamaño 0.187" = 7.85%
 - tamiz No. 20 tamaño 0.0331" = 64.44%;
 - tamiz No. 40 tamaño 0.0165" = 3.57%;
 - tamiz No. 50 tamaño 0.0117" = 0.32%
 - tamiz No. 60 tamaño 0.0098" = 0.11%
 - tamiz No. 100 tamaño 0.0059" = 0.25%
 - finos tamaño < 0.0059" = 0.78%

Datos medidos según Standard Sieve series Opening.

3.4.2.2. Determinación de porcentaje de humedad

El exceso de agua en drogas vegetales es el responsable del crecimiento de bacterias y hongos, y también de la hidrólisis de sus constituyentes. Las monografías farmacopéicas limitan el contenido de agua, especialmente en las drogas que tienen la facilidad de absorberla, o en las cuales el exceso de agua causa su deterioro. Con pocas excepciones, el contenido de agua en las drogas vegetales debe variar entre 8 y 14%. El contenido de agua puede ser determinado por el método gravimétrico, proceso mediante el cual la droga se seca hasta un peso constante. En caso de que la droga posea sustancias volátiles se emplea el método azeotrópico.

Procedimiento:

- Tarar un gramo de muestra.
- Colocar este gramo en una cápsula previamente tarada y libre de humedad, se coloca en el horno por 1 hora a 100 °C.
- Transcurrido este tiempo se coloca en una desecadora hasta esperar que enfríe y se tara.
- Determinar el porcentaje de humedad con la siguiente fórmula:

$$100 - \left[\frac{\text{Tara total} - \text{Tara cápsula}}{\text{Tara muestra}} \right] * 100 = \% \text{ humedad (Ec.2)}$$

3.4.2.3. Determinación de cenizas totales

El proceso consiste en determinar la cantidad de residuo no volátil después de la calcinación de la droga. La ceniza resultante de la incineración del material vegetal puede ser fisiológica y no fisiológica. Se denomina “ceniza fisiológica” aquella derivada de los componentes minerales de la propia planta. La que se deriva de materia extraña, principalmente suelo y arena que se adhieren a la superficie de la droga, se denomina “ceniza no fisiológica”.

Un contenido de cenizas superior al permitido, indica generalmente un procedimiento de recolección y almacenamiento inadecuado.

Procedimiento:

- Incinerar un gramo de polvo del material vegetal en un plato tarado de sílica o platino, a una temperatura no mayor de 450°C. hasta que este libre de carbón, enfriar y pesar. Se aplica la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Tara del crisol} + \text{Muestra}) - (\text{Tara Crisol})}{\text{Tara Muestra}} * 100 = \% \text{ cenizas (Ec. 3)}$$

3.4.2.4. Preparación de extractos

Procedimiento:

1. Pesar muestras de 200 g para extracto fluido de concentración 1:1 (1 mL de extracto corresponde a 1 g de droga seca) y 800 g para extracto seco de concentración 1:4 (1 mL de extracto corresponden a 4 g de la droga seca) ambos se prepararán del rizoma molido y seco. Humedecer con el disolvente la materia prima y luego adicionar en el percolador y agregar más disolvente hasta cubrir toda la planta.
2. Realizar la percolación durante 24 horas a temperatura ambiente de 26 °C.
3. Recuperar el primer percolado y guardarlo.
4. Efectuar más percolaciones hasta lograr que la diferencia de solutos extraíbles sea de un 10% y pueda ser así económicamente rentable.
5. La segunda percolación y así sucesivamente se llevan al rotavapor donde se separará el disolvente, y ya cuando el volumen de concentrado de estas percolaciones sea poco adicionar el primer percolado y rotavaporar hasta llegar al volumen establecido.
6. Los extractos fluidos así obtenidos son almacenados en frascos ámbar y refrigerados para su conservación, para obtener los extractos secos

4:1, se elimina totalmente el disolvente y posteriormente se secan en una desecadora y se guardan en frascos plásticos herméticos.

3.4.2.5. Análisis microbiológico

La contaminación microbiana del material vegetal envuelve serios riesgos para los usuarios de drogas vegetales, debido a que puede abarcar la contaminación por gérmenes patógenos, la producción de endotoxinas bacterianas, micotoxinas y transformaciones microbianas de los constituyentes botánicos en compuestos tóxicos. El conteo microbiano total aeróbico se puede efectuar a través del método de cajas o el método de los tubos múltiples. A continuación se presentan los límites de contaminación microbiana en materiales de plantas medicinales:

A. Material crudo de plantas para ser procesado posteriormente (incluyendo procedimiento de contaminación fisicoquímico).

Los límites son determinados para material de plantas cosechadas bajo condiciones higiénicas aceptables y que no han recibido tratamiento. Por gramo máximo 10^4 *Escherichia coli*

B. Material de plantas que serán pretratadas (por ej. con agua hirviendo como infusión) o si el material será usado tópicamente.

por gramo máximo 10^7 bacterias aeróbicas

máximo 10^4 mohos y levaduras

máximo 10^2 *Escherichia coli*

máximo 10^4 otras enterobacterias

negativo *salmonella*.

C. Otros materiales de plantas para uso interno

(polvos para cápsulas y tabletas).

Por gramo máximo 10^5 bacterias aeróbicas

máximo 10^3 mohos y levaduras

máximo 10 *Escherichia coli*

máximo 10^3 otras enterobacterias

negativo *Salmonella*

Limite de contaminación microbiana aceptado para material fito según LUCAM:

100 NMP/g..... aceptable

100-460 NMP/g..... regularmente aceptable

Mayor de 460 NMP/g.....inaceptable o rechazado.

Tabla I. Categorías de drogas crudas vegetales según tenor microbiano de acuerdo con los criterios de la OMS.

CATEGORIA	COLIFORMES TOTALES	COLIFORMES FECALES	E. COLI	USO
A	1+Max 100 NP mLg 1000 UFC/g	+ Max 10 NMP/g 10 UFC/g	Negativo	Polvos (cápsulas)
B	1+Max 460 NP mLg 1000 UFC/g	+ Max 10 NMP/g 100 UFC/g	Negativo	Infusiones
C	1+Max 460 NP mLg 1000 UFC/g	+ Max 10 NMP/g 1000 UFC/g	Negativo	Tinturas y elixires

Fuente: Laboratorio de productos fitofarmacéuticos FARMAYA

Tabla II. Datos para calcular el número más probable -NMP-

Combinación de tubos positivos	NMP/g o mL
0-0-0	<3
0-0-1	3
0-1-0	3
0-2-0	3
1-0-0	4
1-0-1	7
1-1-0	7
1-1-1	11
1-2-0	11
2-0-0	9
2-0-1	14
2-1-0	15
2-1-1	20
2-2-0	21
2-2-1	28
2-3-0	12
3-0-0	23
3-0-1	39
3-0-2	64
3-1-0	43
3-1-1	75
3-1-2	120
3-2-0	93
3-2-1	150
3-2-2	210
3-3-0	240
3-3-1	460
3-3-2	1100
3-3-3	2400

Fuente: Laboratorio de productos fitofarmacéuticos FARMAYA.

3.4.2.6. Determinación de coliformes totales

Los coliformes totales son un grupo de bacterias que habitan en el intestino, tanto de humanos como de animales, también pueden ser encontradas en la tierra, restos vegetales y cualquier otro tipo de medio que les proporcione nutrientes para su viabilidad. Este grupo ha sido empleado como un indicador de contaminación fecal y de calidad sanitaria, es decir, su presencia sugiere la de otros microorganismos patógenos presentes en las heces. Estos microorganismos son más resistentes a las condiciones ambientales que otros, por lo que si los coliformes están ausentes, la muestra analizada es bacteriológicamente aceptable.

Procedimiento

- Preparar el caldo lactosado según las instrucciones del envase.
- Agregar 9 mL de caldo lactosado en un tubo de 20 mL con tapón rosca, introducir una campana de Durham, y preparar 9 tubos de esta forma.
- Esterilizar los tubos en la autoclave, por 15 min, a 250°C y 15 psi de presión; dejar enfriar.
- Pesar 2 g de material y agregarles 18 mL de agua estéril a 18 mL de solución salina al 0.85% p/v.
- Agitar de tal manera que el agua entre en contacto con toda la superficie de la muestra. Dejar reposar por 1 hora exacta (medir con cronómetro), tapar con papel aluminio para evitar contaminación.
- Filtrar la solución con un embudo de vidrio y algodón previamente esterilizados.
- En la campana limpia y sanitizada con anterioridad inocular, a los tres primeros tubos de caldo lactosado agregar 1 mL del filtrado, a los siguientes 3, 0.1 mL y los últimos 3, 0.01 mL del filtrado.
- Incubar de 24 a 48 horas en la incubadora a 35-37°C.
- Verificar crecimiento bacteriano con producción de gas (burbuja de aire en la campana Durham), formación de turbidez y precipitado.

- Interpretar resultados respecto a la tabla de NMP.
- A los tubos que den positivo hacerle análisis de coliformes fecales.

Expresión de resultados

La presencia de coliformes totales indica que la contaminación de la muestra se debe al proceso que ha llevado desde el inicio, como malas condiciones de secado, almacenamiento, aire, humedad así contaminación por animales, insectos y agua.

Tabla III. Expresión de resultados para la presencia de coniformes totales

Muestra	1:100	1:1000	1:10000	Resultado (NMP/g-mL)
XX	x	x	x	xx

Fuente: Laboratorio de productos fitofarmacéuticos FARMAYA.

3.4.2.7. Determinación de coliformes fecales

Procedimiento:

- Preparar el caldo Bilis Verde Brillante (BVB) según las instrucciones del envase.
- Agregar 9 mL de caldo BVB en un tubo de 20 mL con tapón rosca, introducir una campana de Durham.
- Prepara de esta forma los tubos a utilizar.
- Esterilizar los tubos en la autoclave, por 15 min, a 250 °C y 15 psi de presión.
- Dejar enfriar los tubos.
- En la campana limpia y sanitizada con anterioridad (según PEO de limpieza y sanitización de la campana) inocular los tubos de BVB tomando una asada de cada tubo de caldo lactosado que presentó gas.
- Incubar de 24 a 48 horas en incubadora a 42-44 °C.

- Verificar crecimiento bacteriano con producción de gas (burbuja de aire en la campana de Durham) formación de turbidez y precipitado.
- Interpretar resultados respecto tabla de NMP.
- Tubos que den positivo hacerle análisis de *Escherichia coli*.

Expresión de resultados

La presencia de coliformes fecales indica contaminación fecal proveniente del riego con aguas negras y puede haber potencialmente la presencia de microorganismos patógenos.

Tabla IV. Expresión de resultados para la presencia de coliformes fecales

Muestra	1:100	1:1000	1:10000	Resultado (NMP/g-mL)
XX	x	x	x	xx

Fuente: Laboratorio de productos fitofarmacéuticos FARMAYA.

3.4.2.8. Determinación de *E. coli*

Procedimiento:

- Preparar el caldo EC según la instrucción del envase.
- Agregar 10 mL de caldo EC en un tubo de 20 mL con tapón rosca, introducir una campana Durham, y preparar el resto de tubos de la misma forma.
- Esterilizar tubos en autoclave, por 15 min, a 250 °C y 15 psi de presión.
- Dejar enfriar tubos.
- En la campana limpia y sanitizada previamente, inocular los tubos de EC tomando una asada de cada tubo de caldo BVB que presento gas.
- Incubar de 24 a 48 horas en la incubadora a 35-37 °C.
- Verificar crecimiento bacteriano con producción de gas (burbuja de aire en la campana Durham), formación de turbidez y precipitado.

- A los tubos que den positivo inocular en placas de agar MacConkey.
- Incubar las cajas a 43-45 °C durante 18-24 horas.
- El crecimiento de colonias rojas, umblicadas, generalmente no mucosas, indican la posible presencia de *E. coli*.
- Si desea confirmarse utilizar reacciones bioquímicas o una bacteria.
- Tomar una colonia típica del crecimiento en MacConkey e inocular en agar TSI y LIA
- Las reacciones bioquímicas para este microorganismo son las siguientes:

TSI alcalino-ácido/ácido (rojo-amarillo), con gas sulfhídrico,

LIA alcalino/alcalino (violeta/violeta) con gas, sin ácido sulfhídrico.

Expresión de resultados:

E. coli se presenta como un microorganismo entero patógeno. El producto es aceptado cuando no presenta crecimiento microbiológico.

Tabla V. Presentación de resultados para presencia de *Esherichia coli*.

Muestra	Resultado
XX	Positivo o negativo

Fuente: Laboratorio de productos fitofarmacéuticos FARMAYA.

3.4.2.9. Conteo aeróbico en placa: Mohos y levaduras

Junto con las bacterias, los hongos son los causantes de la putrefacción y descomposición de toda la materia orgánica. Hay hongos en cualquier parte en que existan otras formas de vida. Algunos son parásitos de organismos vivos y producen graves enfermedades en plantas y animales.

1. Pesar o medir 1g o mL de la muestra y adicionar 9 mL de agua peptonada o solución salina al 0.85% p/v, agitar o licuar para obtener una mezcla homogénea.

2. Hacer diluciones a partir del paso anterior los cuales dependen del No. Sospechado de microorganismos presentes: 1:100, 1:1000, 1:10000.
3. Tomar 1 mL de la solución 1:10 del paso 1 y agregarla a 9 mL de agua peptonada o solución salina al 85 % p/v (esta será una dilución 1:100)
4. Tomar 1 mL de la dilución anterior y proceder conforme lo descrito anteriormente hasta llegar a la dilución 1: 10000.
5. Colocar 0.1 mL de cada de las diluciones 1:100, 1:1000, 1:10000 en tres cajas de Petri estéril de 9 a 10 cm de diámetro previamente preparadas e incubadas con agar sabouraud.
6. Incubar a 20-25 °C durante 3 días en la incubadora.

Interpretación de los resultados en conteo aeróbico en placa:

1. Cajas sin crecimiento bacteriano el resultado se expresa como menor de la dilución más baja sembrada Ejemplo:

**Tabla VI. Presentación de resultados Conteo aeróbico en placa:
Mohos y levaduras**

1:100	1:1000	1:10000	Resultado
0	0	0	10 UFC/g o mL
0	0	0	10 UFC/g o mL

3.4.2.10. Conteo aeróbico en placa: Bacterias Mesófilas

Procedimiento:

1. Pesar o medir 1 g o mL de la muestra y adicionar 9 mL de agua peptonada o solución salina al 0.85% p/v, agitar o licuar para obtener una mezcla homogénea.
2. Hacer diluciones a partir del paso anterior los cuales dependen del No. Sospechado de microorganismos presentes: 1:100, 1:1000, 1:10000.

3. Tomar 1 mL de la solución 1:10 del paso 1 y agregarla a 9 mL de agua peptonada o solución salina al 85 % p/v (esta será una dilución 1:100).
4. Tomar 1 mL de la dilución anterior y proceder conforme lo descrito anteriormente hasta llegar a la dilución 1: 10000.
5. Colocar 0.1 mL de cada de las diluciones 1:100, 1:1000, 1:10000 en tres cajas de Petri estéril de 9 a 10 cm de diámetro previamente preparadas e incubadas con agar platecount.
6. Incubar a 20-25 °C durante 3 días en la incubadora.

Interpretación de los resultados en conteo aeróbico en placa:

Cajas sin crecimiento bacteriano el resultado se expresa como menor de la dilución más baja sembrada Ejemplo:

**Tabla VII. Presentación de resultados conteo aeróbico en placa:
Bacterias Mesófilas**

1:100	1:1000	1:10000	Resultado
0	0	0	<10 UFC/g o mL
0	0	0	<10 UFC/g o mL

3.4.2.11. Determinación de sólidos totales extraíbles

Consiste en desecar en un horno, un determinado volumen de extracto durante un tiempo, y a continuación se deje enfriar en un desecador.

Procedimiento:

- En una cápsula de fondo plano de 50 mm de diámetro y 30 mm de altura, introducir 25 mL del extracto a examinar.
- Evaporar a sequedad en baño María y secar en un horno a 100°C durante 6 horas.

- Dejar enfriar en un desecador sobre gel de sílice anhidro R y pesar. Calcular el resultado como porcentaje en g/mL de la manera siguiente:

1. Determinar la cantidad de sólidos depositados en la cápsula:
Tara de cápsula con depósito de sólidos -Tara de cápsula vacía = Cantidad de sólidos depositados.
2. Determinar una media de la cantidad de sólidos por triplicado:

$$\frac{\sum(\text{sólidos depositados})}{3} = \text{promedio de sólidos} \quad (\text{Ec. 4})$$

Determinar el % de sólidos:

$$\frac{\text{Promedio de sólidos}}{25 \text{ mL}} * 100 = \% \text{ sólidos g/mL} \quad (\text{Ec. 5})$$

3.4.2.12 Determinación de densidad

Es la masa de una sustancia dividida por su volumen, es una propiedad intensiva: su valor solo depende de variables tales como la temperatura, presión, pero no de la cantidad de sustancia elegida. La densidad y el peso específico se encuentran entre los caracteres físicos más utilizados para el ensayo de drogas.

Procedimiento:

1. Tarar el picnómetro perfectamente limpio y seco.
2. Llevar el picnómetro hasta el borde con la solución y colocar el termómetro tapadera.
3. Secar perfectamente y tarar en una balanza analítica.
- 4 Determinar la densidad de la siguiente forma:

$$\frac{(\text{Tara Picnómetro vacío} - \text{Tara Muestra})}{9,796 \text{ mL}} = \text{densidad} \quad (\text{Ec. 6})$$

3.4.2.13. Determinación de pH

El pH determina la concentración de iones hidrógeno de una solución acuosa, esta asociado con el grado de acidez o basicidad de las sustancias.

Procedimiento:

- Pesar 10 g de extracto seco y disolverlos en 25 mL de agua destilada.
- Verificar que el instrumento esté calibrado.
- Determinar pH de la solución.
- Lavar con agua destilada el sensor a cada lectura.

3.4.2.14. Determinación de viscosidad

Esta propiedad está relacionada con el movimiento de las moléculas de los fluidos. La viscosidad de un fluido mide la resistencia que éste ofrece por fricción ante una fuerza de corte que se le aplica. Con frecuencia para medir la viscosidad de un fluido se emplea el viscosímetro de Ostwald o viscosímetro.

Procedimiento:

- Colocar 10 mL de agua para calibrarlo.
- Vaciar viscosímetro, secarlo y colocar 10 mL del extracto.
- Succionar por medio de una perilla el extracto a una altura determinada y dejarlo fluir, anotando el tiempo que tarda en pasar sobre las marcas.

3.4.2.15. Determinación de solubilidad

La solubilidad es la capacidad de una sustancia de disolver a otra. Hay factores que intervienen aumentando o disminuyendo esta capacidad, la presión es la menos importante, otros tienen más trascendencia como: Afinidad entre las dos sustancias, concentración del soluto, tipos de enlace, grado de división del soluto, temperatura.

Procedimiento: Método de extracción en caliente:

- Transferir aproximadamente 4 g, de extracto a un matraz Erlenmeyer con tapón de vidrio.
- Agregar 100 mL de alcohol y pesar el matraz.
- Agitar y dejar en reposo durante 1 hora.
- Acoplar un condensador de reflujo al matraz y calentar a ebullición moderada durante 1 hora enfriar y pesar.
- Volver a ajustar al peso original con alcohol, agitar y filtrar rápidamente a través de un filtro seco.
- Transferir 25 mL de filtrado a una cápsula tarada de fondo plano y evaporar en un baño de agua hasta sequedad.
- Secar a 105°C durante 6 horas, enfriar en un desecador durante 30 minutos y pesar sin demora. Calcular el contenido, en mg por g, de materia extraíble en alcohol en la muestra de prueba.

3.4.2.16. Determinación cualitativa de saponinas

Ensayo Macro

Prueba de espuma:

Tubo 1: 0.25 mg de extracto.

Tubo 2: 2 mL de control de saponinas (0.5%).

Tubo 3: 2 mL de agua.

A cada tubo se le adiciona 10 mL de agua destilada. Calentar en baño maría (60 °C) durante 30 min. Enfriar, tapar los tubos, agitar vigorosamente 30 a 40 seg. Dejar reposar los tubos durante 30 min, observar la formación de capa de espuma. Si una capa de espuma mayor de 3 cm persiste en la superficie líquida después de 30 min, se presume la presencia de saponinas.

Ensayo semimicro: Cromatografía en capa fina: 0.25 mg de extracto diluir en 10 mL de metanol al 80% filtrar y proceder a aplicar 25-40 μ L en una cromatoplaqueta de silicagel 60 F₂₅₄. Estándar de saponinas al 0.1% en metanol (10 μ L); colesterol, ergosterol y β -sitosterol.

Fase móvil: n-butanol-ácido acético-agua (25:5:20)

Detección:

Anisaldehído-ácido sulfúrico: UV-365nm: zonas azules, violetas, amarillentas.

3.4.2.17 Determinación cualitativa de flavonoides

Ensayo Macro: 0.25 mg de extracto diluir en 10 mL de metanol al 80% filtrar y dividir en 6 tubos:

Tubo 1: agregar 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

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

Tubo 3: agregar 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño María por 5 min, (prueba para leucoantocianinas).

Tubo4: 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.

Ensayo Semimicro: Cromatografía en capa fina

Cromatografía en capa fina: 0.25 mg de extracto diluir en 10 mL de metanol al 80% filtrar, y aplicar 25-40 μ L en una cromatoplaca de silicagel 60 F₂₅₄; como estándar emplear 10 μ de quercetina, rutina, ácido clorogénico y hiperósido. Fase móvil: n-butanol-ácido acético-agua (25:5:20)

Detección: Sin tratamiento químico: UV 254 nm fluorescencia, zonas azules o amarillas. UV 365 nm, dependiendo la estructura fluorescen amarillo, azul o verde. Reactivo de productos naturales (NP/PEG). Fluorescencia intensiva en UV-365 nm.

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

Solución 2: Solución etanólica al 5% de polietilenglicol 40000 (PEG).

Aplicar a la placa vapores de amoníaco para intensificar el color de las manchas.

3.4.2.18. Cuantificación de saponinas

Procedimiento en espectrofotometría:

- Pesar exactamente 0.500 g de material vegetal o 0.2500 g de extracto y añadir 50 mL de etanol al 95%.
- Agitar y calentar en baño María a 60°C por 20 min, luego filtrar.
- Transferir una alícuota de 4 mL en un beaker y evaporar a sequedad en baño maría.
- Enfriar a temperatura ambiente y añadir: 2 mL de acetato de etilo; 1 mL de reactivo A; 1 mL de reactivo B
- Agitar y calentar a 60°C en baño maría durante 5 minutos.
- Enfriar y leer a 430 nm
- Preparación de reactivo A: 0.5 mL de anisaldehído + 99.5 mL de acetato de etilo.
- Preparación de reactivo B: ácido sulfúrico [] en acetato de etilo para llegar al 50%.
- Preparación de blanco: 3 mL de acetato de etilo, 1 mL de reactivo A y 3 mL de reactivo B.
- Preparación del estándar: A cada estándar pesar 0.0400 g en balón de 10 mL, disolver con etanol 95% luego añadir los reactivos: 2 mL de acetato de etilo; 1 mL de reactivo A ; 1 mL de reactivo B
- Disolver en sonificador:
- Agregar: 1 mL de acetato de etilo; 2 mL de reactivo B; aforar con etanol al 95°.
- Diluciones de 1/10, 2/10, 3/10, 4/10 mL: se afora con etanol 95°.

3.4.2.19. Cuantificación de flavonoides

Procedimiento en espectrofotometría:

- Pesar exactamente 0.4 g de extracto seco o 10 mL extracto fluido.
- Colocar la muestra en un balón de fondo redondo de 100 mL para reflujo.
- Añadir 1 mL de solución acuosa de Metenamina SR, 20 mL de acetona y 2 mL de Ácido Clorhídrico.
- Calentar en baño María (55°C – 62°C), bajo reflujo durante 30 minutos.
- Filtrar la mezcla con algodón en balón volumétrico de 100 mL.
- Regresar el residuo y el algodón al balón de fondo redondo y adicionar 20 mL de Acetona.
- Calentar hasta ebullición bajo reflujo durante 10 minutos, filtrar con algodón nuevamente en el mismo balón volumétrico de 100 mL (donde se recibió el primer filtrado).
- Repetir la operación nuevamente colocando el residuo de extracto y el algodón en el balón de fondo redondo para reflujo y adicionar 20 mL de Acetona.
- Calentar nuevamente bajo reflujo por 10 minutos.
- Filtrar de nuevo recibiendo el filtrado en el mismo balón volumétrico de 100 mL (junto con los demás filtrados).
- Llevar estos filtrados a temperatura ambiente y ajustar el volumen hasta 100 mL con Acetona. (solución A)
- En una ampolla de decantación tratar 20 mL de la solución A con 20 mL de agua y extraer con 15 mL de acetato de etilo.
- Extraer 3 veces más con porciones de 10 mL de Acetato de Etilo.
- Reunir las porciones de Acetato de Etilo y lavarlas con 2 porciones de 50 mL de agua fría.
- Transferir las porciones de Acetato de Etilo a un balón aforado de 50 mL y llevar hasta el volumen con Acetato de Etilo (Solución Madre).
- Solución acuosa de Metenamina (0.5 %).

- Pesar 5 g de Metenamina y disolver en 1 litro de agua.
- Solución de Ácido Acético en Metanol (5%). Añadir 5 mL de Ácido acético a 95 mL de Metanol.
- Solución de Cloruro de Aluminio SR (2%). Disolver 2 g de cloruro de Aluminio en 100 mL de una solución de Ácido Acético en Metanol.

Preparación de la muestra:

- Transferir 10 mL de solución madre a un balón aforado de 25 mL.
- Adicionar 1 mL solución metanólica de cloruro de aluminio SR y completar el volumen con solución metanólica de Ácido Acético SR.

Preparación solución blanco:

- Transferir 10 mL de la solución madre a un balón aforado de 25 mL y llevar a volumen con solución metanólica de Ácido Acético SR.

Medir la absorbancia de la solución muestra a 425 nm 30 minutos después de su preparación, utilizando la solución blanco para ajuste de cero. Calcular el contenido de flavonoides totales, según la ecuación:

$$Q = \frac{A * 62500}{500 * m * (100 - Pd)} \quad (\text{Ec. 7})$$

donde:

Q = Flavonoides totales, expresados en quercetina (%).

A = Absorbancia de la solución muestra.

m = Peso de la droga vegetal.

Pd = Determinación de agua (%)

3.4.2.20. Tamizaje microbiano

Comprende un tamizaje de actividad antibacteriana y un tamizaje de actividad antilevadadura.

3.4.2.21. Tamizaje de la actividad antibacteriana

Las bacterias son organismos de vida libre que tienen curvas de crecimiento máximo de 24-48 horas en medios artificiales específicamente diseñados. El tamizaje de la actividad antibacteriana consiste en poner de manifiesto la inhibición del crecimiento de una bacteria determinada en condiciones estándar con una concentración previamente determinada como punto de corte (500-1000 mg/mL) de un extracto, fracción o compuesto obtenidos de una droga vegetal.

Procedimiento:

- Prepara tubos con 9 mL de agar Mueller Hinton.
- Esterilizar a 121°C durante 15 min, dejar enfriar a 50°C y agregar 1 mL de la solución del extracto disuelto; éste debe tener una concentración de 10 mg/mL. La concentración final que se tiene es de 1 mg/mL.
- Agitar y verter en cajas Petri estériles, dejar solidificar, e incubar a 36 °C por 24 h para verificar esterilidad.
- Guardar en refrigeración hasta el momento de uso

Preparación del inóculo

- Purificar el microorganismo a ensayar inoculándolo en un tubo con 8 mL de agar Muller Hinton inclinado, incubar a 36°C durante 24 h.
- Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5 mL de caldo Trypticase soya, incubar a 36°C durante 48 h.
- Diluir 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de agua de solución salina estéril (dilución 1:100).
- Sembrar en caja de Petri según la Plantilla a utilizar.

Demostración de la actividad antibacteriana

- Inocular en las cajas con agar-planta una asada de cada uno de los microorganismos siguiendo el patrón de la plantilla. Hacer cuatro repeticiones por microorganismo. Dejar reposar durante 5-10 min, e incubar a 36°C durante 24 h.
- Utilizar como control negativo 9 mL de agar Muller Hinton mezclándole 1 mL de etanol al 50%.

Lectura e interpretación de los resultados

- Actividad negativa: crecimiento a lo largo del inóculo.
- Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

3.4.2.22. Tamizaje de la actividad antilevadura

Las levaduras son organismos de vida libre que tienen curvas de crecimiento máximo de 48-72 horas en medios artificiales específicamente diseñados. El tamizaje de la actividad antilevadura consiste en poner de manifiesto la inhibición del crecimiento de una levadura determinada en condiciones estándar con una concentración previamente determinada como punto de corte (500-1000 mg/mL) de un extracto, fracción o compuesto obtenidos de una droga vegetal.

Procedimiento:

- Preparar el agar
- Preparar tubos con 9 mL de agar Mueller Hinton.
- Esterilizar a 121°C durante 15 min, dejar enfriar a 50°C y agregar 1 mL de extracto de la planta a probar (dilución 1:10).
- Agitar la concentración final que se tiene es de 1mg/mL.
- Verter en cajas Petri estériles, dejar solidificar, e incubar a 36°C por 24 h para verificar esterilidad.
- Guardar en refrigeración hasta el momento de uso

Preparación del inóculo

- Sembrar la cepa en una caja con agar Sabouraud e incubar a 36 °C por 48 h.
- Tomar un inóculo del cultivo fresco, sembrar en 5 mL de caldo Tripticasa Soya e incubar 24-48 h. Tomar con una pipeta estéril 0.5 mL y suspender en 4.5 mL de solución salina estéril (dilución 1:10).

Inoculación de levaduras en placa

- Inocular con asa la suspensión de levadura en cada sección según plantilla.
- Incubar a 36 °C durante 48 h.
- Para el control negativo, sembrar por estrías la levadura en una caja con agar Sabouraud.

Lectura e interpretación de los resultados

- Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

3.4.2.23. Concentración Inhibitoria mínima (MIC)

Consiste en cuantificar la concentración mínima de un extracto, fracción o compuestos obtenidos de una droga vegetal que ha demostrado actividad en una prueba de tamizaje previo. El método que se empleará es el de diluciones seriadas del extracto y concentraciones constantes del microorganismo y se evalúa el crecimiento del microorganismo en un ensayo estandarizado similar al que sirvió de tamizaje.

Procedimiento:

- Preparar el agar planta.
- Preparar tubos con 3.6, 3.8, 3.9, y 4 mL de agar Muller Hinton.

- Esterilizar a 121 °C durante 15 min, dejar enfriar a 50 °C y agregar solución del extracto disuelto (concentración de 10 mg/mL) en una caja cuadrilátera de la siguiente manera:
 - 3.6 mL de agar + 0.4 mL de la solución de extracto = 1 mg/ mL
 - 3.8 mL de agar + 0.2 mL de la solución de extracto = 0.5 mg/mL
 - 3.9 mL de agar + 0.1 mL de la solución de extracto = 0.25 mg/mL
- Un cuadrante con 4 mL de agar como control negativo.
- Dejar solidificar e incubar a 36 °C por 24 h, para comprobar esterilidad.
- Guardar en refrigeración hasta el momento de usar.

Preparación del inóculo

- Purificar el microorganismo a ensayar inoculándolo en un tubo con 8 mL de agar Muller Hinton inclinado, incubar a 36 °C durante 24 h.
- Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5 mL de caldo Tripticasa soya, incubar a 36 °C durante 48 horas.
- Diluir 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de agua solución salina estéril (dilución 1:100).

Demostración de la concentración inhibidora mínima

- Inocular tres estrías en cada uno de los cuadrantes de la caja e incubar a 36 °C por 24 h. Dejar reposar durante 5-10 min e incubar a 36 °C durante 24 h.

Interpretación de los resultados

- Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

3.4.3. Análisis estadístico

Se describirán los datos por medio de medidas de tendencia central y dispersión en tablas.

4. RESULTADOS

4.1. Identificación botánica del rizoma *S. domingensis*

Tabla VIII. Evaluación macroscópica del rizoma seco *S. domingensis*.

Superficie	Fibrosa con puntos brillantes en forma de cristales; regiones más claras o más oscuras, se pueden observar conductos de transporte: xilema y floema dispuestos en forma irregular.
Color	Café rojizo.
Sabor y olor	Característicos a la especie.

Tabla XI. Evaluación microscópica del rizoma seco de *S. domingensis*

Corte transversal circular	Parénquima cortical: Sus células son alargadas y se disponen tangencialmente, en ellas se observan idioblastos con rafidios de oxalato de calcio y mucílagos, mientras que en la zona más interna las células del parénquima también prosénquima ticas se disponen radialmente. Estas células poseen paredes no muy engrosadas y una gran vacuola repleta de almidón, los granos individuales son poliédricos, más bien con hilo céntrico. Dispersos en el parénquima se encuentran los haces colaterales cerrados cuya vaina de fibras es poco desarrollada.
	Epidermis: constituida por paredes sinuosas engrosadas.

4.2. Evaluación preliminar del rizoma seco de *S. domingensis*

Tabla X. Análisis fisicoquímicos del rizoma seco de *S. domingensis*

Prueba	Porcentaje en peso %
Humedad	10.56 ± 0.123
Cenizas	2.52 ± 0.836

Fuente: Datos calculados

Tabla XI. Análisis microbiológico del rizoma seco de *S. domingensis*

Muestra	Microorganismo	1 mL	0.1 mL	0.001 mL	Resultado	Observación
Rizoma <i>S. domingensis</i>	Coliformes totales	1	0	0	4 NMP/g	Aceptado
	Coliformes fecales	0	0	0	< 3 NMP/g	Aceptado
	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	< 3 NMP/g	Aceptado

Muestra	Microorganismo	1:100	1:1000	1:10000	Resultado del Conteo	Observación
Rizoma <i>S. domingensis</i>	Mohos y levaduras	0	0	0	< 10 UFC/g	Aceptado
	Bacterias mesófilas	0	0	0	< 10 UFC/g	Aceptado

Fuente: Datos originales

4.3. Análisis fisicoquímicos del los extractos

Tabla XII. Análisis fisicoquímico de extractos

Extracto		Sólidos totales extraíbles (%)	Densidad (g/mL)	pH	Viscosidad (cp)	Solubilidad en etanol al 70% (mg/g)	Humedad (%)
<i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	16.15	0.963	1.94	6.109	180	
	R ₂	16.54	0.957	4.96	6.124	186	
	R ₃	17.23	0.963	4.89	6.115	183	
	Media	16.54	0.961	4.93	6.116	183	
	Desviación	± 0.44	± 0.003	± 0.03	± 0.006	± 1.73	
<i>S.domingensis</i> seco (1:4)	R ₁			4.32		1,099	6.86
	R ₂			4.23		1,138	5.72
	R ₃			4.22		1,031	6.00
	Media			4.26		1,089	6.19
	Desviación			± 0.05		± 44	± 0.49

4.4. Análisis Fitoquímico

4.4.1. Investigación de saponinas presentes en los extractos etanólicos del rizoma de *S. domingensis* por el método de prueba de espuma y por cromatografía en capa fina.

Tabla XIII. Investigación de saponinas: ensayo macro

Muestra		Prueba de espuma
Extracto <i>S. domingensis</i> fluido (1:1)	R1	++
	R2	++
	R3	++
Extracto <i>S. domingensis</i> seco (1:4)	R1	+
	R2	++
	R3	++

+: poco ++: medio +++: abundante

Figura 4 Prueba de espuma para saponinas



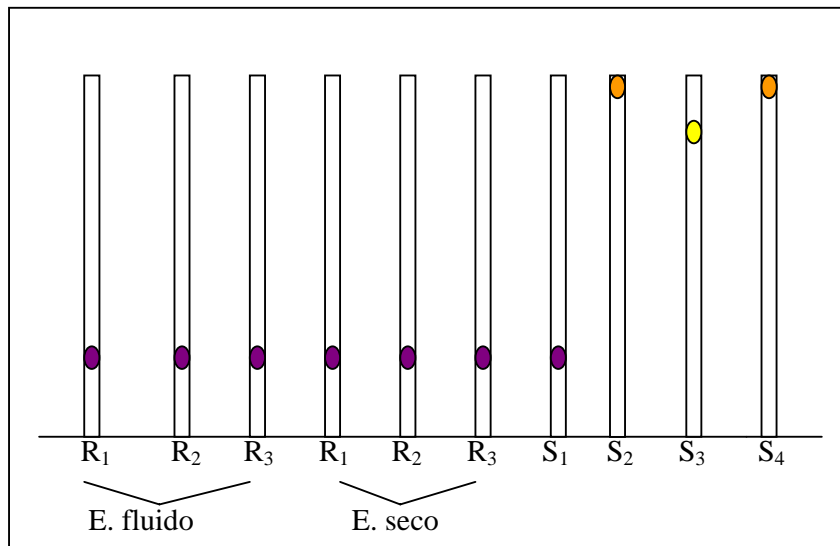
Figura 4 .Prueba de espuma realizada para los extractos; de izquierda a derecha: agua destilada, estándar de saponina (Merck) y extractos.

Tabla XIV. Verificación de la presencia de saponinas en extractos etanólicos del rizoma de *S. domingensis* por cromatografía en capa fina CCF

Muestra	CCF	No. Bandas	Rf	
Extracto <i>S. domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	+	1	0.17
	R ₂	+	1	0.17
	R ₃	+	1	0.17
Extracto <i>S. domingensis</i> seco (1:4)	R ₁	+	1	0.17
	R ₂	+	1	0.17
	R ₃	+	1	0.17
estándar saponina	+	1	0.17	
estándar colesterol	+	1	0.99	
estándar ergosterol	+	1	0.97	
estándar β-sitosterol	+	1	0.99	

Fuente: Datos originales

Figura 5 Verificación de la presencia de saponinas en los extractos etanólicos del rizoma de *S. domingensis* por cromatografía en capa fina (CCF)



S1 = estándar saponina

S2 = estándar colesterol

S3 = estándar ergosterol

S4 = estándar β-sitosterol

Los valores de Rf de los extractos coincide con el Rf del estándar saponinas esto viene a confirmar la presencia de saponinas y la ausencia de colesterol, ergosterol y β-sitosterol en los extractos.

4.4.2. Investigación de flavonoides en los extractos etanólicos del rizoma de *S. domingensis* por método cualitativo de tubos (reacciones acompañadas de cambios de color y/o formación de precipitado) y por cromatografía en capa fina.

Tabla XV. Investigación de flavonoides: ensayo macro

Muestra		Ácido sulfúrico concentrado	cloruro férrico al 10%	Ácido clorhídrico concentrado	Magnesio metálico y ácido clorhídrico concentrado	álcali
extracto <i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R1	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+
	R3	+	+	+	+	+
extracto <i>S.domingensis</i> seco (1:4)	R1	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+
	R3	+	+	+	+	+

Fuente: Datos originales

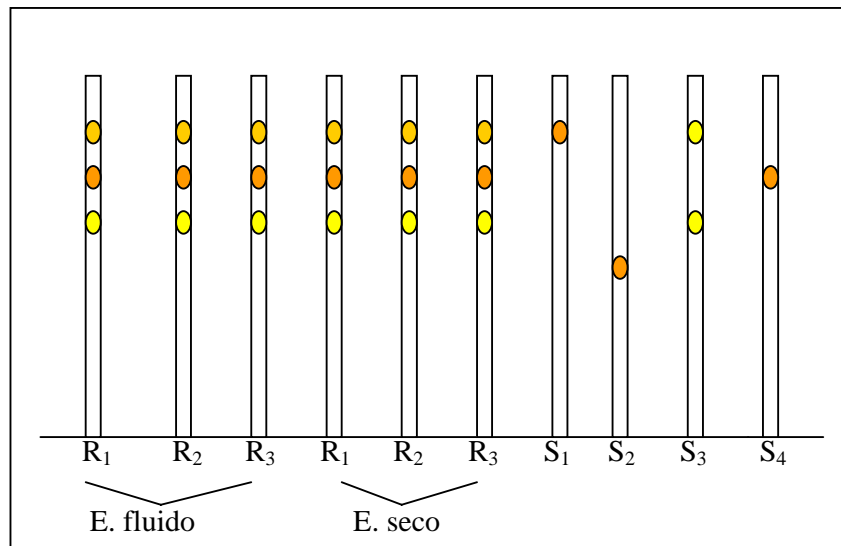
+ Presencia -: Ausencia

Tabla XVI. Verificación de la presencia de flavonoides en los extractos etanólicos del rizoma de *S. domingensis* por cromatografía en capa fina CCF

Muestra	CCF	No. Bandas	R _f	
Extracto <i>S. domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	+	3	0.88;0.68;0.79
	R ₂	+	3	0.88;0.68;0.79
	R ₃	+	3	0.88;0.68;0.79
Extracto <i>S. domingensis</i> seco (1:4)	R ₁	+	3	0.88;0.68;0.79
	R ₂	+	3	0.88;0.68;0.79
	R ₃	+	3	0.88;0.68;0.79
estándar quercetina	+	1	0.88	
estándar rutina	+	1	0.56	
estándar ácido clorogénico	+	2	0.68, 0.88	
estándar hiperósido	+	1	0.79	

Fuente: Datos originales

Figura 6 Verificación de la presencia de flavonoides en los extractos etanólicos del rizoma de *S. domingensis* por cromatografía en capa fina (CCF)



S1 = estándar quercetina

S2 = estándar rutina

S3 = estándar ácido clorogénico

S4 = estándar hiperósido

Los valores de Rf de los extractos coinciden únicamente con los valores de Rf de los estándares: quercetina, ácido clorogénico e hiperósido.

4.5. Cuantificación de saponinas totales en los extractos etanólicos del rizoma de *S. domingensis*

Tabla XVII. Cuantificación de saponinas

Extracto		Absorbancia (nm)	Saponinas (g/dL)
Extracto <i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	1.029	6.59E-02
	R ₂	1.077	7.11E-02
	R ₃	1.13	6.84E-02
	Media	6.847E-2	
	Desviación	± 2.14E-3	
Extracto <i>S. domingensis</i> seco (1:4)	R ₁	2.06	1.19E-01
	R ₂	1.97	1.15E-01
	R ₃	2.15	1.12E-01
	Media	1.155E-1	
	Desviación	± 2.59E-3	

Fuente: datos originales

4.6. Cuantificación de flavonoides totales en los extractos etanólicos del rizoma de *S. domingensis*

Tabla XVIII. Cuantificación de flavonoides

Extracto		Absorbancia (nm)	Flavonoides Totales expresados como % quercetina
Extracto <i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	1.029	0.026
	R ₂	1.077	0.028
	R ₃	1.13	0.029
	Media	0.028	
	Desviación	± 0.001	
Extracto <i>S. domingensis</i> seco (1:4)	R ₁	2.06	0.19
	R ₂	1.97	0.17
	R ₃	2.15	0.17
	Media	0.177	
	Desviación	± 0.009	

Fuente: datos originales

4.7. Ensayos biológicos

Tabla XIXa. Análisis microbiológico extractos etanólicos del rizoma de *S. domingensis*

Muestra	Microorganismo	1 mL	0.1 mL	0.01 mL	Resultado	Observación	
Extracto <i>S. domingensis</i> fluido (1:1)	R1	Coliformes Totales	0	0	0	< 3 NMP/g-mL	Aceptado
		Coliformes fecales	0	0	0	< 3 NMP/g-mL	Aceptado
		Escherichia coli	0	0	0	< 3 NMP/g-mL	Aceptado
	R2	Coliformes Totales	0	0	0	< 3 NMP/g-mL	Aceptado
		Coliformes fecales	0	0	0	< 3 NMP/g-mL	Aceptado
		Escherichia coli	0	0	0	< 3 NMP/g-mL	Aceptado
	R3	Coliformes Totales	0	0	0	< 3 NMP/g-mL	Aceptado
		Coliformes fecales	0	0	0	< 3 NMP/g-mL	Aceptado
		Escherichia coli	0	0	0	< 3 NMP/g-mL	Aceptado
Extracto <i>S. domingensis</i> seco (1:4)	R1	Coliformes Totales	0	0	0	< 3 NMP/g-mL	Aceptado
		Coliformes fecales	0	0	0	< 3 NMP/g-mL	Aceptado
		Escherichia coli	0	0	0	< 3 NMP/g-mL	Aceptado
	R2	Coliformes Totales	0	0	0	< 3 NMP/g-mL	Aceptado
		Coliformes fecales	0	0	0	< 3 NMP/g-mL	Aceptado
		Escherichia coli	0	0	0	< 3 NMP/g-mL	Aceptado
	R3	Coliformes Totales	0	0	0	< 3 NMP/g-mL	Aceptado
		Coliformes fecales	0	0	0	< 3 NMP/g-mL	Aceptado
		Escherichia coli	0	0	0	< 3 NMP/g-mL	Aceptado

Tabla XIXa. Análisis microbiológico extractos etanólicos del rizoma de *S. domingensis*

Muestra	Microorganismo	1:100	1:1000	1:10000	Resultado del Conteo	Observación	
Extracto <i>S. domingensis</i> fluido (1:1)	R1	Hongos y levaduras	1	1	0	< 10 UFC/g-mL	Aceptado
		Bacterias mesófilas	0	0	0	< 10 UFC/g-mL	Aceptado
	R2	Hongos y levaduras	0	0	0	< 10 UFC/g-mL	Aceptado
		Bacterias mesófilas	0	0	0	< 10 UFC/g-mL	Aceptado
	R3	Hongos y levaduras	1	0	0	< 10 UFC/g-mL	Aceptado
		Bacterias mesófilas	0	0	0	< 10 UFC/g-mL	Aceptado
Extracto <i>S. domingensis</i> seco (1:4)	R1	Hongos y levaduras	0	0	0	< 10 UFC/g-mL	Aceptado
		Bacterias mesófilas	0	0	0	< 10 UFC/g-mL	Aceptado
	R2	Hongos y levaduras	0	0	0	< 10 UFC/g-mL	Aceptado
		Bacterias mesófilas	0	0	0	< 10 UFC/g-mL	Aceptado
	R3	Hongos y levaduras	0	0	0	< 10 UFC/g-mL	Aceptado
		Bacterias mesófilas	0	0	0	< 10 UFC/g-mL	Aceptado

Fuente datos originales

Tabla XX. Tamizaje antimicrobiano de extractos etanólicos del rizoma de *Smilax domingensis* a la concentración inicial de 1 mg/mL.

Extractos <i>S. domingensis</i>		A	B	C	D	E	F	G	H
Fluido 1:1	R ₁	-	-	-	-	-	-	-	-
	R ₂	-	-	-	-	-	-	-	-
	R ₃	-	-	-	-	-	-	-	-
Seco 1:4	R ₁	-	-	-	-	-	-	-	+
	R ₂	-	-	-	-	-	-	-	+
	R ₃	-	-	-	-	-	-	-	+

Fuente datos originales

(+) Actividad positiva

(-) Actividad negativa

Microorganismo ensayado:

A: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

B: *Salmonella typhi* ATCC 14028

C: *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607

D: *Bacillus subtilis* (aislada Hospital General San Juan de Dios)

E: *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853

F: *Candida albicans* (aislada Hospital General San Juan de Dios)

G: *Cryptococcus neoformans* (aislada Hospital General San Juan de Dios)

H: *Escherichia coli* ATCC 25922

Tabla XXI. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos etanólicos del rizoma de *S. domingensis* con actividad en la fase de tamizaje.

Para *Escherichia coli*

Extracto Seco (4:1)	1	0.5	0.25	CIM
R ₁	+	-	-	1 mg/mL
R ₂	+	-	-	1 mg/mL
R ₃	+	-	-	1 mg/mL

Fuente datos originales

(-) Actividad negativa

(+) Actividad positiva

Figura 7 Determinación de CIM para *E. coli*



En la figura 7 la inhibitoriedad del extracto se lee en el sentido de las agujas del reloj. Para el control: que se identifica con el cuadrante transparente, marcado con la letra "c" y que solo contiene el medio de cultivo se puede observar el crecimiento de *E. coli* con rasgos fuertes y así sucesivamente en el siguiente cuadrante de concentración 0.25 mg/mL se observan los rasgos de sepas de *E. coli* con menor intensidad. Al llegar al cuarto cuadrante que posee una concentración de 1 mg/mL ya no se observan rasgos de sepas de *E. coli*; la cual nos indica que a esta concentración ya no se da el crecimiento de ésta bacteria.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para obtener un producto fitoterapéutico estandarizado y de calidad debe asegurarse uniformidad de todos los lotes de su producción. Para lograr este objetivo es indispensable que cada etapa del proceso de producción sea rígidamente realizada.

La procedencia de la materia prima fue Aldea Cerro Gordo Santa Rosa altura sobre nivel del mar: 1070 m; latitud. 14° 25' 50"; longitud 90°18'44. La materia prima se obtuvo de proveedores que cumplen con especificaciones de análisis microbiológicos, humedad y cenizas requeridos por FARMAYA S. A. Generalmente el rizoma se vende en trozos por lo que se procedió a triturarlos en un molino de discos para reducir el tamaño y así homogenizarlo para obtener una eficiente percolación.

Según el Curso Iberoamericano de Control de Calidad de Medicamentos Fitoterápicos celebrado en San José Costa Rica 19-23 Julio 2004; una de las condiciones que deben reunir los productos fitoterápicos es la calidad. El control de calidad de las drogas vegetales se obtiene mediante ensayos morfoanatómico y organoléptico; ensayos fisicoquímico cualitativo y cuantitativo y ensayos biológicos. A continuación se describen algunas pruebas realizadas tanto para el rizoma como para los extractos.

5.1. Análisis de cenizas

Nos da una referencia acerca del contenido de materia inorgánica (mineralización) que esta presente en la droga vegetal lo cual constituye una posible fuente de adulteración.

El porcentaje de cenizas que se obtuvo 2.52 ± 0.836 está dentro de un nivel bajo; ya que para el género Smilax el nivel aceptable es $> 10 \%$ (British herbal Farmacopoeia. England 1983).

5.2. Análisis de humedad

El exceso de agua en drogas vegetales es el responsable del crecimiento de bacterias y hongos, y también de la hidrólisis de sus constituyentes; es por ello que es muy importante realizar este análisis. El método que se utilizó para determinar la humedad fue el gravimétrico.

Los porcentajes de humedad que se obtuvieron están dentro de los valores permisibles tanto para la materia prima 8% a 12% ; como para los extractos secos 5% a 8% .

5.3. Análisis de sólidos totales extraíbles

Este análisis indica la cantidad de sólidos que pueden ser extraídos en la droga vegetal por medio de un disolvente determinado, agua, alcohol, éter de petróleo, etc. La finalidad por la cual se realiza también; es la de determinar el número de percolaciones por lo cual el proceso de percolación es óptimamente rentable. El número de percolaciones que se le realizó a cada extracto fue de 4; esto se estableció observando que el % de sólidos totales extraíbles en cada percolación no variara hasta $< 10 \%$.

5.4. Análisis de solubilidad

Se analizó la solubilidad de los extractos en etanol al 70% a 26°C ; donde se determinó para el extracto fluido una solubilidad de 183 ± 1.73 mg/g y para el extracto seco $1,089 \pm 44$ mg/g.

Es indispensable realizar estas pruebas ya que los productos fitoterapéuticos poseen cantidades de material secundario (sales orgánicas e inorgánicas, ácidos y bases orgánicas, azúcares, polisacáridos, etc.) que por lo general afectan significativamente la tecnología de fabricación y estabilidad de la forma fitofarmacéutica.

5.5. Análisis de pH

Para los valores de pH tenemos magnitudes de 4.6 para el extracto fluido y 4.2 para el extracto seco. Esto nos indica el grado de acidez de los extractos; si bien en el extracto fluido sus componentes son agua y alcohol lo cual le proporcionan un carácter ligeramente básico debido a los enlaces -OH.

5.6. Análisis de densidad

Constituye información sobre la pureza del extracto; es una propiedad intensiva: su valor solo depende de variables tales como la temperatura, presión, pero no de la cantidad de sustancia elegida y se encuentran entre los caracteres físicos más utilizados para el ensayo de drogas. Se obtuvo una densidad de 0.961 ± 0.003 g/mL para el extracto fluido (1:1); este dato también se puede comparar con el extracto (1:1) de Macuy (*Solanum americanum*), que tiene una densidad de 0.908 g/mL. Estos resultados de densidades van a estar en función del tipo de alcohol y el grado que se utilice para la extracción.

5.7. Análisis de viscosidad

Para el extracto fluido se tiene una viscosidad de 6.116 ± 0.006 cp a una temperatura de 26°C; este dato viene a constituir una información muy importante sobre la pureza del extracto en caso de una posible adulteración en sus formulaciones; también es importante al producir a una escala industrial los extractos; ya que es útil al calcularse el tipo de fluido en un proceso.

5.8. Análisis identificación de saponinas

En el análisis cualitativo preliminar de la prueba de espuma para saponinas se determinó la presencia de saponinas en los extractos; comparándolas con muestra de agua destilada y estándar saponina (Merck). Ver figura 4

Se verificó por medio de cromatografía en capa fina la confirmación de saponinas, en las cuales los valores de Rf's de los extractos coinciden únicamente con el Rf del estándar saponinas. Esto viene a confirmar la presencia de saponinas en los extractos y la ausencia de colesterol, ergosterol y β -sitosterol. Ver figura 5

5.9. Análisis identificación de flavonoides

En el análisis cualitativo por el método de tubos en las cuales se presentan reacciones acompañadas de cambios de color y/o formación de precipitado, se estableció la presencia de flavonoides. Se verificó con cromatografía en capa fina la confirmación de tres flavonoides específicos; los cuales fueron quercetina, ácido clorogénico e hiperósido; no evidenciando así la presencia de rutina.

En el resultado de la cromatografía en capa fina se puede observar mediante la figura 6, en la cual los extractos poseen tres bandas de Rf que coinciden con los valores de Rf de los estándar: quercetina, ácido clorogénico e hiperósido; esto viene a confirmar la presencia de estos flavonoides específicos en los extractos y al mismo tiempo se observa la ausencia de rutina.

5.10. Análisis cuantificación de saponinas

La cuantificación de saponinas indica la concentración de saponinas presentes en cada extracto. La cuantificación esta íntimamente relacionada con la alta o baja calidad de la materia prima; actividad farmacológica de la droga o sus preparados y dosificación.

Se utilizó el estándar saponina como referencia para poder cuantificarlas, y así determinar la concentración de saponinas en cada uno de los extractos, según los resultados obtenidos la concentración de saponina en cada extracto es proporcional; es decir que a menor concentración del extracto menor será la concentración de saponina.

5.11. Análisis cuantificación de flavonoides

La cuantificación de flavonoides totales se expresó en quercetina (%) dando como resultado para el extracto fluido 0.028 ± 0.001 y para el extracto seco 0.177 ± 0.009 . Como se puede observar el % de quercetina es proporcional a la concentración del extracto pero no de forma equivalente. Esto se debe a que en las formulaciones líquidas se forman mezclas de compuestos complejos que hacen que los metabolitos secundarios se degraden más rápido y sean menos estables.

5.12. Análisis microbiológico

De acuerdo a los resultados del análisis microbiológico realizado sobre la materia prima y los extractos estos fueron aceptables < 100 NMP/g y > 10 UFC/g o mL para ambos; estos análisis son primordiales de realizarse ya que la contaminación microbiana del material vegetal envuelve serios riesgos para los usuarios de drogas vegetales, debido a que puede abarcar la contaminación por gérmenes patógenos, la producción de endotoxinas bacterianas y micotoxinas y transformaciones de los constituyentes botánicos en compuestos tóxicos.

5.13. Análisis de concentración inhibitoria mínima

Con estos análisis se logró determinar la actividad antibacteriana de los extractos. Sin embargo se pudo demostrar que solo el extracto etanólico seco (1:4) de *S. domingensis* inhibió sepas de *E. coli* a una concentración de 1mg/mL.

Esto viene a confirmar la justificación del porque se utiliza esta droga para tratar infecciones gastrointestinales y afecciones dermatomucosas.

Estos ensayos pueden variar respecto al lugar donde es cosechada la planta, método de extracción; parte de la planta que se utilice; metodología utilizada para conocer la concentración inhibitoria mínima etc.

CONCLUSIONES

1. Porcentajes de humedad y cenizas presentes en las muestras del rizoma seco de *S. domingensis*, se encuentran entre los rangos permisibles que son 8 -12 % para humedad y < 10 % para cenizas.
2. Para los análisis fisicoquímicos y cuantificación de saponinas y flavonoides de los extractos etanólicos del rizoma de *S. domingensis* véase los resultados en las tablas LI y LII.
3. En los extractos etanólicos del rizoma de *S. domingensis* se identificó la presencia de tres flavonoides específicos, los cuales son quercetina, ácido clorogénico e hiperósido.
4. El extracto etanólico del rizoma de *S. domingensis* de concentración (1:4) presentó acción antibacteriana inhibiendo cepas de *E. coli* a una concentración de 1 mg/mL; a diferencia del extracto fluido (1:1) que no presentó actividad.

RECOMENDACIONES

1. Es indispensable que al momento de elaborar los extractos se trabajen con buenas prácticas de fabricación (BPF o GMP-Good Manufacturing Prácticos), esto nos va a garantizar la calidad en las formulaciones fitoterapéuticas.
2. Al momento de estandarizar un producto fitoterapéutico se deben tomar en cuenta: la identificación botánica de la droga vegetal; origen del material vegetal; condiciones climáticas; edad de la planta; tamaño de la droga; solvente de extracción; método de extracción.
3. Es necesario realizar el tamizaje del rizoma seco de *S. domingensis*. para la elaboración de los extractos. Se utilizaron tamaños pasando 64.44% por el tamiz No. 20. Estos datos son una aproximación a la clasificación de polvos para procesamiento industrial según la farmacopea brasileña: “polvo moderadamente grueso” un 60% pasan por el tamiz No. 22. y 40% por tamiz No. 44.
4. Utilizar los parámetros químicos y fisicoquímicos de este trabajo al momento de realizar un escalamiento a nivel planta piloto de zarzaparrilla (*S. domingensis*).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alonso, Jorge R. **Tratado de Fitomedicina Bases Clínicas y Farmacológicas**. Buenos Aires Argentina: ISIS ediciones S.R.L, 1998 pp 94-96.
2. Arriaza, DA. **Acción diurética y antimicrobiana de algunos vegetales del género *Smilax*** Tesis, Guatemala: Facultad de CCQQ y Farmacia. USAC 1983. pp. 50.
3. Cáceres A., Girón M., Alvarado S., Torres M. **Screening of antimicrobial activity of plants popullary used in Guatemala for the treamente of dermatomucosal diseases. *J. Ethnopharmacol.* 20:223 1,987.**
4. Cáceres, Armando. **Plantas de uso medicinal en Guatemala**. Guatemala: Editorial Universitaria, 1996. pp. 373-376.
5. Cáceres A., López B., Girón M., Logemann H. **Plants, used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections.1. screening for antimycotic activity of 44 plants extracts. *J. Ethnopharmacol* 31 263-276 1,991.**
6. De la Cruz, Brenda. **Caracterización de cinco extractos de uso medicinal en Guatemala**. Tesis, Facultad de CCQQ y Farmacia. USAC 2005. pp. 10-13.

7. Gutiérrez, Y. et. al. **Validación de dos métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en *Psidium guajaba*, L.** Revista Cubana de Farmacia. vol. 34, No. 1. Ciudad de la Habana: Editorial Ciencias Médicas. Ene-abr. 2000.
8. Hartwell, J. Plants used against cancer. Lawrence Quarterman Publications 1982 pp. 144, 338.
9. Lara R., Sandoval H., Jiménez M., de la Roca D., Guzmán A. et al. **Determinación de la actividad inmunomodulatoria de los extractos de zarzaparrilla, quilete y pericón.** *Memorias VI Congreso Nacional Microbiológico.* Guatemala 1991 pp. 88.
10. Lewis D. **Anti-inflammatory Drugs from Plant and Marine Source.** Basel, Birkhauser Verlag. 1989. pp. 358.
11. Logan, M. **Digestive disorders and plant medicinals in Highland Guatemala.** *Anthropos.* 68:537-547 1973.
12. Martindale the Extra Pharmacopeia Launders, James Reynolds 1982 pp. 430.
13. Martínez, J. Bernal H., Cáceres A. **Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales Iberoamericanas**, Santafé de Bogotá, Colombia Editorial Álvaro Campo Cabal & Henry Yesid Bernal, 2000 pp. 433-440.
14. Medinilla, Aldana B. **Manual de Laboratorio de Fitoquímica.** Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC pp. 27.

15. Rafatullah S., Mossa J., Ageel A., Al-Yahya M., Tariq M. **Hepatoprotective and safety evaluation studies on zarzaparrilla.** *Int. J. Pharmacy.* 29:296. 1991.
16. Reyes, Amabilia. **Obtención y caracterización de saponinas de la raíz seca de smilax lundeli & smilax rigelli (zarzaparrilla), a nivel de planta piloto, utilizando diferentes métodos de extracción.** Tesis Guatemala Facultad de Ingeniería USAC 1992.
17. Sharapin, Nikolai. **Fundamentos de Tecnología de productos fitoterapéuticos,** Santafé de Bogotá D. C. Colombia: 2000. pp 27-48.
18. Urizar F. **Ensayo clínico sobre la efectividad de *Smilax lundellii* en el tratamiento de candidiasis vaginal** Tesis, Guatemala Facultad de Ciencias médicas USAC. 1989.
19. Williams, L. The useful plants of central américa. *Ceiba* 24: 51,196,264.

BIBLIOGRAFÍA

1. **British herbal Farmacopoeia.** England 1983.
2. **Curso Iberoamericano de Control de Calidad de Medicamentos Fitoterápicos.** Ciudad de la Investigación, Universidad de Costa Rica. San José Costa Rica, 19 al 23 de Julio 2004.
3. **Extractos vegetales** www.extractosvegetales.com.htm
4. **Real farmacopea española.** Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. Segunda edición 2000.

APÉNDICE A: DATOS ORIGINALES

Tabla XXII. Datos originales para la obtención de porcentaje en peso de humedad en la materia prima.

Tara cápsula (g)	Tara muestra (g)	Tara total (g)
36.032	1.008	36.928
40.691	1.002	41.587
36.002	1.000	36.898

Tabla XXIII. Datos originales para la obtención del porcentaje en peso de cenizas totales en la materia prima.

Tara crisol (g)	Peso muestra (g)	Tara crisol más residuo (g)
19.563	0.924	19.579
18.819	0.911	18.837
19.835	0.911	19.87

Tabla XXIV. Datos originales para la obtención del porcentaje en peso de sólidos totales extraíbles.

Extracto		Tara cápsula vacía (g)	Tara capsula con depósito de sólidos (g)
<i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	36.035	40.053
		32.681	36.737
		40.694	44.733
	R ₂	34.514	38.66
		34.967	39.083
		36.003	40.151
	R ₃	33.095	37.395
		35.11	39.436
		36.317	40.613

Tabla XV. Datos originales para la obtención de densidad

Extracto		Tara picnómetro (g)	Tara muestra (g)
<i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	30.717	40.154
		30.724	40.165
		30.723	40.164
	R ₂	30.733	40.103
		30.737	40.103
		30.733	40.107
	R ₃	30.735	40.181
		30.733	40.183
		30.733	40.184

Tabla XXVI. Datos originales para la obtención de pH.

Extracto		pH
<i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	4.94
	R ₂	4.96
	R ₃	4.89
<i>S.domingensis</i> seco (1:4)	R ₁	4.32
	R ₂	4.23
	R ₃	4.22

Tabla XXVII. Datos originales para la obtención de porcentaje de humedad

Extracto		% humedad
<i>S.domingensis</i> seco (1:4)	R ₁	7.77
		6.53
		6.28
	R ₂	6.26
		5.48
		5.42
	R ₃	6.29
		6.43
		5.28

Tabla XXVIII. Datos originales para la determinación de constantes A y B del viscosímetro de Ostwald tomando como referencia el agua.

Temperatura (°C)	Densidad (g/mL)	Viscosidad (cp)	Tiempo (s)
22	0.9978	0.9579	64.8
35	0.9941	0.7225	53

Tabla XXIX. Datos originales para la obtención de viscosidad

Extracto		Tiempo (s)
<i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	373.8
		372.6
		376.2
	R ₂	375
		381.6
		377.4
	R ₃	372.6
		378
		374.4

Tabla XXX. Datos originales para la determinación de solubilidad

Extracto		Tara cápsula vacía (g)	Tara cápsula con residuos (g)
<i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	75.383	75.563
	R ₂	77.283	77.469
	R ₃	53.718	53.901
<i>S.domingensis</i> seco (1:4)	R ₁	79.7	80.799
	R ₂	115.4	116.538
	R ₃	112.759	113.79

Tabla XXXI. Datos originales para los *R_f*s Cromatografía de Capa Fina CCF para saponinas.

Muestra		Altura (cm)	Altura disolvente (cm)
Extracto <i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	1.2	7.1
	R ₂	1.2	7.1
	R ₃	1.2	7.1
Extracto <i>S.domingensis</i> seco (1:4)	R ₁	1.2	7.1
	R ₂	1.2	7.1
	R ₃	1.2	7.1
estandar saponina		1.2	7.1
colesterol		7	7.1
estandar ergosterol		6.9	7.1
estandar β-sitosterol		7	7.1

Fase móvil: n-butanol; ácido acético; agua (25:5:20)

Detección: anisaldehído-ácido sulfúrico: UV-365nm: zonas azules, violetas, amarillentas.

Tabla XXXII. Datos originales para los *R_f*s Cromatografía de Capa Fina (CCF) para flavonoides

Muestra		Altura (cm)	Altura disolvente (cm)
Extracto <i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	6.3; 4.9; 5.7	7.2
	R ₂	6.3; 4.9; 5.7	7.2
	R ₃	6.3; 4.9; 5.7	7.2
Extracto <i>S.domingensis</i> seco (1:4)	R ₁	6.3; 4.9; 5.7	7.2
	R ₂	6.3; 4.9; 5.7	7.2
	R ₃	6.3; 4.9; 5.7	7.2
estándar quercetina		6.3	7.2
estándar rutina		4	7.2
estándar ácido clorogénico		4.9; 6.3	7.2
estándar hiperósido		5.7	7.2

Fase móvil: acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, agua (100

Detección: reactivo de Productos Naturales (NP/PEG)

Tabla XXXIII. Datos originales para el tamizaje antimicrobiano de extractos etanólicos del rizoma de *Smilax domingensis* W. a una concentración inicial de 1 mg/mL.

Extractos <i>S. domingensis</i>		A	B	C	D	E	F	G	H
Fluido 1:1	R ₁	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
	R ₂	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
	R ₃	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
Seco 1:4	R ₁	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	CIM
	R ₂	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	CIM
	R ₃	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	CIM

>1 = Actividad negativa CIM = Actividad positiva

A: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

B: *Salmonella typhi* ATCC 14028

C: *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607

D: *Bacillus subtilis* (aislada Hospital General San Juan de Dios)

E: *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853

F: *Candida albicans* (aislada Hospital General San Juan de Dios)

G: *Cryptococcus neoformans* (aislada Hospital General San Juan de Dios)

H: *Escherichia . coli* ATCC 25922

Tabla XXXIV. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos etanólicos del rizoma de *S. domingensis* con actividad en la fase de tamizaje. Para *Escherichia coli*.

Extracto <i>S. domingensis</i> Seco (1:4)	1	0.5	0.25	CIM
R ₁	+	-	-	1 mg/mL
R ₂	+	-	-	1 mg/mL
R ₃	+	-	-	1 mg/mL

(-) Actividad negativa (+) Actividad positiva

Tabla XXXV. Datos originales para la absorbancia de los extractos *S.domingensis* para la cuantificación de saponinas.

Extracto		Absorbancia (nm)
<i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	1.029
	R ₂	1.077
	R ₃	1.13
<i>S.domingensis</i> seco (1:4)	R ₁	2.06
	R ₂	1.97
	R ₃	2.15

Tabla XXXVI. Datos originales para la cuantificación de flavonoides en los extractos *S.domingensis*

Extracto		Peso muestra (g)	Determinación de agua (%)	Absorbancia (nm)
<i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	9.862	18.43	0.169
	R ₂	9.815	19.07	0.176
	R ₃	9.652	19.47	0.179
<i>S.domingensis</i> seco (1:4)	R ₁	0.401	9.62	5.781E-2
	R ₂	0.401	8.95	5.037E-2
	R ₃	0.404	8.73	5.024E-2

APÉNDICE B: MUESTRA DE CÁLCULO

1. Porcentaje de humedad

Se procede a determinar el porcentaje de humedad según la ecuación 2:

$$100 - \left\{ \left\{ \frac{\text{Tara total} - \text{Tara cápsula}}{\text{Tara muestra}} \right\} * 100 \right\} = \% \text{ humedad}$$

Para la primera corrida de materia prima se tiene:

$$100 - \left\{ \left\{ \frac{36.010 - 35.110}{1.008} \right\} * 100 \right\} = 10.71 \%$$

2. Porcentaje de cenizas

Se procede a determinar el porcentaje de cenizas según la ecuación 3:

$$\frac{(\text{Tara del crisol con residuo}) - (\text{Tara Crisol})}{\text{Peso Muestra}} * 100 = \% \text{ cenizas}$$

Para la primera corrida de materia prima se tiene:

$$\frac{(19.579) - (19.563)}{0.924} * 100 = 1.73\%$$

3. Determinación de sólidos totales

Se calcula de la manera siguiente:

3.1 Determinar la cantidad de sólidos depositados en la cápsula:

Tara de cápsula con depósito de sólidos - Tara de cápsula

Vacía = Cantidad de sólidos depositados.

Para la primera muestra de extracto se tiene:

$$40.053 \text{ g} - 36.035 \text{ g} = 4.018 \text{ g}$$

3.2. Determinar una media de la cantidad de sólidos por triplicado:

Se procede a determinar la cantidad de sólidos según la ecuación 4:

$$\frac{\sum (\text{sólidos depositados})}{3} = \text{promedio de sólidos}$$

$$\left\{ \frac{4.018 + 4.056 + 4.039}{3} \right\} = 4.037$$

3.3. Determinar el % de sólidos totales extraíbles:

Se procede a determinar el % de sólidos totales extraíbles según la ecuación 5:

$$\frac{\text{Promedio de sólidos}}{25 \text{ mL}} * 100 = \% \text{ sólidos g/mL}$$
$$\frac{4.037}{25} * 100 = 16.148 \%$$

4. Densidad

Se procede a determinar la densidad según la ecuación 6:

$$\frac{(\text{Tara muestra} - \text{Tara picnómetro vacío})}{9,796 \text{ mL}} = \text{densidad}$$

Para el primer extracto se tiene:

$$\frac{(40.154 \text{ g} - 30.717 \text{ g})}{9,796 \text{ mL}} = 0.963 \text{ g/mL}$$

5. Viscosidad

Determinar constantes A y B del viscosímetro de Ostwalt según la ecuación:

$$\mu = \frac{A\rho t}{t} \quad (\text{Ec. 8})$$

Se resuelve esta ecuación simultanea para A y B con T = 22°C y T = 35°C según referencia de datos originales tabla XXI
 Lo cual se obtiene para A = 1.7E-4 y B = 9.32E-2
 Ya conociendo los datos de A y B se sustituyen los datos en la Ec. 8.
 Para el primer extracto fluido (1:1) R₁ se tiene:

$$\mu_1 = \frac{(1.7E-4)(0.963)(373.8) - (9.32E-2)(0.963)}{373.8} = 0.06117 \text{ poise}$$

6. Cálculo de la solubilidad

Se calcula de la siguiente manera:

$$\frac{(\text{Peso cápsula con residuo} - \text{Peso cápsula vacía}) * 4 * 1000}{\text{Peso muestra}}$$

$$= \text{Solubilidad (mg/g)} \quad (\text{Ec. 9})$$

Para el primer extracto fluido (1:1) se tiene:

$$\frac{75.563 \text{ g} - 75.383 \text{ g}}{4 \text{ g}} * 4 * 1000 = 180 \text{ mg/g}$$

7. Cálculo de R_f para Cromatografía de Capa Fina (CCF)

Se calcula de la manera siguiente:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida sustancia}}{\text{distancia recorrida solvente}} \quad (\text{Ec. 10})$$

Para la determinación de saponinas el R_f del primer extracto (1:1) es:

$$R_f = \frac{1.2 \text{ cm}}{7.1 \text{ cm}} = 0.17$$

8. Cuantificación de saponinas

Concentraciones del estándar en 1/10:

$$\begin{aligned}C_1V_1 &= C_2V_2 && \text{(Ec. 11)} \\(0.004 \text{ g/mL})(1 \text{ mL}) &= C_2(10 \text{ mL}) \\C_2 &= 0.0004 \text{ g/mL}\end{aligned}$$

Donde C_1 = Concentración inicial del estándar saponina

V_1 = Volumen inicial del estándar saponina

V_2 = Volumen final del estándar saponina

C_2 = Concentración final del estándar saponina

Por medio de las relaciones entre las absorbancias y concentraciones del estándar saponina se logró determinar el modelo matemático lineal

$$[X = Y/1928.3 + 0.0001253] \quad \text{(Ec. 12)}$$

Donde X = Concentración del estándar saponina en g/mL

Y = Absorbancia del estándar saponina en nm.

Por medio de la ecuación 2 evaluamos las concentraciones de cada una de las muestras de los extractos.

Para la primera corrida se tiene:

$$\begin{aligned}X &= 1.029 / 1928.3 + 0.0001253 \\X &= 0.00065893 \text{ g/mL}\end{aligned}$$

9. Cuantificación de flavonoides

Se calcula el contenido de flavonoides totales según la ecuación 7:

$$Q = \frac{A * 62500}{500 * m * (100 - Pd)}$$

Q = Flavonoides totales, expresados en quercetina (%)

A = Absorbancia de la solución muestra

m = Peso de la droga vegetal

Pd = determinación de agua (%)

APÉNDICE C: DATOS CALCULADOS

1. Humedad

Tabla XXXVII. Porcentaje en peso de humedad para el rizoma de *S.domingensis*

Muestra del rizoma	(%) Humedad
1	10.71
2	10.58
3	10.4
media	10.56
desviación estándar	± 0.1233

Fuente: Datos originales

2. Cenizas

Tabla XXXVIII. Porcentaje en peso de cenizas para el rizoma de *S.domingensis*

Muestra del rizoma	(%) de cenizas
1	1.73
2	1.98
3	3.84
media	2.52
desviación estándar	± 0.8359

Fuente: Datos originales

3. Porcentaje de sólidos totales extraíbles

Tabla XXXIX. Valores para la obtención del porcentaje en peso de sólidos

totales extraíbles para extractos fluidos.

Extracto		Tara cápsula vacía (g)	Tara cápsula con depósito de sólidos (g)	Sólidos totales (g)	(%) Sólidos totales extraíbles
<i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	36.035	40.053	4.018	16.07
		32.681	36.737	4.056	16.22
		40.694	44.733	4.039	16.16
		Media			
	R ₂	34.514	38.66	4.146	16.58
		34.967	40.151	4.116	16.46
		36.003	40.151	4.148	16.59
		Media			
	R ₃	33.095	37.395	4.3	17.20
		35.11	39.436	4.326	17.30
		36.317	40.613	4.296	17.18
		Media			

Fuente: Datos originales

4. Densidad

Tabla XL. Valores de densidad

Extracto		Tara picnómetro (g)	Tara muestra (g)	Densidad (g/mL)
<i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	30.717	40.154	0.963
		30.724	40.165	0.963
		30.723	40.164	0.964
		Media		
	R ₂	30.733	40.103	0.957
		30.737	40.103	0.956
		30.733	40.107	0.957
		Media		
	R ₃	30.735	40.181	0.959
		30.733	40.183	0.965
		30.733	40.184	0.965
		Media		

Fuente: Datos originales

5. pH

Tabla XLI. Valores de pH

Extracto		pH
<i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	4.94
	R ₂	4.96
	R ₃	4.89
	Media	4.93
<i>S.domingensis</i> seco (1:4)	R ₁	4.32
	R ₂	4.23
	R ₃	4.22
	Media	4.26

Fuente: Datos originales

6. Viscosidad

Tabla XLII. Determinación de las constantes A y B del Viscosímetro de Ostwald

Constante	Valor
A	1.70E-04
B	9.32E-02

Fuente: Datos originales

Tabla XLIII. Viscosidades para extractos etanólicos de *S. domingensis* a 26°C.

Extracto		Tiempo (s)	Viscosidad (cp)
<i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	373.8	6.117
		372.6	6.076
		376.2	6.135
		Media	6.109
	R ₂	375	6.076
		381.6	6.180
		377.4	6.116
		Media	6.124
	R ₃	372.6	6.075
		378	6.164
		374.4	6.105
		Media	6.117

Fuente datos originales

Tabla XLIV. Porcentaje de humedad para extracto seco

Extracto		% humedad
<i>S. domingensis</i> seco (1:4)	R ₁	7.77
		6.53
		6.28
		Media 6.86
	R ₂	6.26
		5.48
		5.42
		Media 5.72
	R ₃	6.29
		6.43
		5.28
		Media 6.00

Fuente datos originales

Tabla XLV. Solubilidad para extractos etanólicos de *S. domingensis* a 26°C.

Extracto		Peso cápsula vacía (g)	Peso cápsula con residuo (g)	Solubilidad en etanol 70 % (mg/g)
<i>S. domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	75.383	75.563	180
	R ₂	77.283	77.469	186
	R ₃	53.718	53.901	183
			Media	183
<i>S. domingensis</i> seco (1:4)	R ₁	79.7	80.799	1,099
	R ₂	115.4	116.538	1,138
	R ₃	112.759	113.79	1,031
			Media	1,089

Fuente datos originales

8. Rf

Tabla XLVI. Valores de Rfs para saponinas

Muestra		Altura (cm)	Altura disolvente (cm)	Rfs
Extracto <i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	1.2	7.1	0.17
	R ₂	1.2	7.1	0.17
	R ₃	1.2	7.1	0.17
Extracto <i>S.domingensis</i> seco (1:4)	R ₁	1.2	7.1	0.17
	R ₂	1.2	7.1	0.17
	R ₃	1.2	7.1	0.17
éstandar saponina		1.2	7.1	0.17
colesterol		7	7.1	0.99
éstandar ergosterol		6.9	7.1	0.97
éstandar β-sitosterol		7	7.1	0.99

Fuente datos originales

Tabla XLVII . Valores de Rfs para flavonoides

Muestra		Altura (cm)	Altura disolvente (cm)	Rfs
Extracto <i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	6.3; 4.9; 5.7	7.2	0.88;0.68;0.79
	R ₂	6.3; 4.9; 5.7	7.2	0.88;0.68;0.79
	R ₃	6.3; 4.9; 5.7	7.2	0.88;0.68;0.79
Extracto <i>S.domingensis</i> seco (1:4)	R ₁	6.3; 4.9; 5.7	7.2	0.88;0.68;0.79
	R ₂	6.3; 4.9; 5.7	7.2	0.88;0.68;0.79
	R ₃	6.3; 4.9; 5.7	7.2	0.88;0.68;0.79
estándar quercetina		6.3	7.2	0.88
estándar rutina		4	7.2	0.56
estándar ácido clorogénico		4.9; 6.3	7.2	0.68,0.88
estándar hiperósido		5.7	7.2	0.79

Fuente datos originales

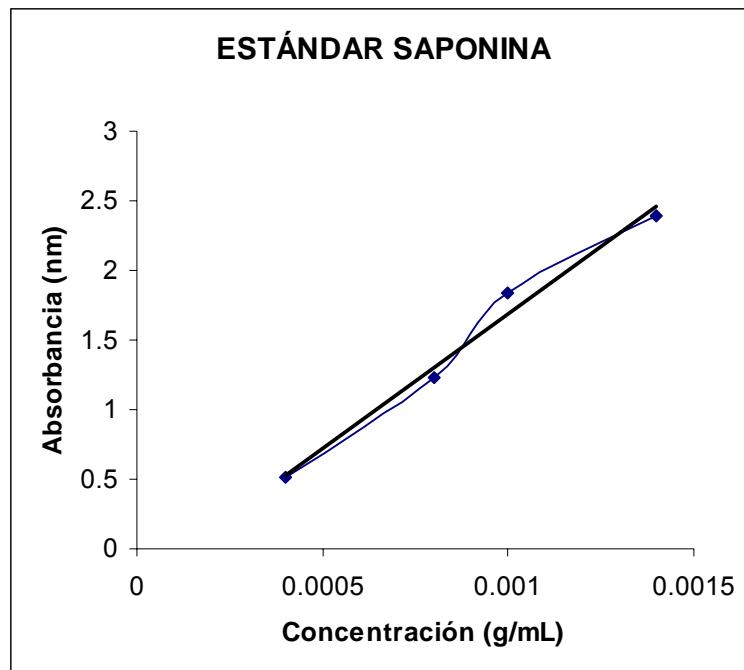
9. Curva de calibración para el estándar saponina

Tabla XLVIII. Cálculo de las concentraciones del estándar saponina

Concentración (g/mL)	0.0004	0.0008	0.001	0.0014
Absorbancia (nm)	0.512	1.230	1.837	2.396

Fuente datos originales

Figura 8 Modelo matemático que representa el comportamiento de Absorbancia frente a concentración del estándar saponina



Fuente: Tabla XLVI

$$X = Y/1928.3 + 0.0001253$$

Tabla XLIX. Concentración de saponina en los extractos *S. domingensis* calculados en base al estándar saponina

Extracto		Absorbancia (nm)	Concentración Saponina (g/dL)
<i>S. domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	1.029	6.59E-02
	R ₂	1.077	7.11E-02
	R ₃	1.13	6.84E-02
	Media		6.847E-2
	Desviación estándar		± 2.14E-3
<i>S. domingensis</i> seco (1:4)	R ₁	2.06	1.19E-01
	R ₂	1.97	1.15E-01
	R ₃	2.15	1.12E-01
	Media		1.155E-1
	Desviación estándar		± 2.59E-3

Fuente: datos originales

Tabla L. Cuantificación de flavonoides totales de los extractos *S. domingensis* expresados en quercetina (%)

Extracto		Absorbancia (nm)	Flavonoides Totales expresados Quercetina (%)
<i>S. domingensis</i> fluido (1:1)	R ₁	0.169	0.026
	R ₂	0.176	0.028
	R ₃	0.179	0.029
	Media		0.028
	Desviación estándar		± 0.001
<i>S. domingensis</i> seco (1:4)	R ₁	5.78E-02	0.19
	R ₂	5.04E-02	0.17
	R ₃	5.02E-02	0.17
	Media		0.177
	Desviación estándar		± 0.009

Fuente datos originales

Tabla LI. Análisis realizados para el extracto 1:1 de *S.domingensis*

Extracto <i>S.domingensis</i> fluido (1:1)	Resultado
Sólidos totales extraíbles (%)	16.54 ± 0.44
Densidad (g/mL)	0.961 ± 0.003
pH	4.93 ± 0.03
Viscosidad (cp) 26°C	6.116 ± 0.006
Solubilidad en etanol 70 % (mg/g) 26°C	18.3 ± 1.73
Concentración de saponina (g/dL)	6.85E-2 ± 2.14E-3
Cuantificación flavonoides totales expresados (%) quercetina	0.028 ± 0.001

Tabla LII. Análisis realizados para el extracto 1:4 de *S.domingensis*

Extracto <i>S. domingensis</i> seco (1:4)	Resultado
pH	4.26 ± 0.05
Solubilidad en etanol 70 % (mg/g) 26°C	1,089 ± 44
Humedad (%)	6.19 ± 0.49
Concentración de saponina (g/dL)	1.555E-1 ± 2.59E-3
Cuantificación flavonoides totales expresados (%) quercetina	0.177 ± 0.009