

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN, CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE
LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS CAROTENOIDES PRESENTES EN
LAS FLORES DE *SENNA MULTIGLANDULOSA* A TRAVÉS DE CUATRO
MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.**

Previa a la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Elaborado por:

David Andrés Cornejo Ojeda.

Sangolquí, 24 Octubre de 2011

Hoja de legalización de firmas

ELABORADO POR

David Andrés Cornejo Ojeda

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Tatiana Páez

SECRETARIO ACADÉMICO

Dr. Marcelo Mejía

Sangolquí, 24 Octubre de2011.

Certificación

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por el señor **David Andrés Cornejo Ojeda** como requerimiento parcial a la obtención del título de **INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**.

Fecha

Ing. Mariela Vera

Directora del proyecto

Msc. Jaime Gia

Codirector del proyecto

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mi familia,

especialmente a mis papás

Pablo y Estrella y a mis

abuelos Francisco, e Hilda.

David Andrés Cornejo Ojeda.

Agradecimiento

Quiero agradecer de manera muy especial a la Dra. Blanquita Naranjo y a Jaime Gia por su invaluable guía y apoyo en esta investigación, sin las cuales no se hubiera podido llevarla a cabo.

También quiero agradecer a mis padres Estrella Ojeda y Pablo Cornejo por su paciencia .y apoyo constante durante el transcurso de este proyecto.

David Andrés Cornejo Ojeda.

Índice de contenidos

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS, P. II.

CERTIFICACIÓN, P. III.

DEDICATORIA, P. IV.

AGRADECIMIENTO, P. V

ÍNDICE DE CONTENIDOS, P. VI.

LISTADO DE TABLAS, P. VII

LISTADO DE CUADROS, P. VIII

LISTADO DE FIGURAS, P. VIV

LISTADO DE ANEXOS, P. X

LISTADO DE ABREBIATURAS XIII

RESUMEN, PXV

ABSTRACT, P XVII

1 INTRODUCCIÓN, p. 1

1.1 Formulación del problema, p. 1

1.2 Justificación del problema, p. 1

1.3 Objetivos de la investigación, p. 3

1.3.1 Objetivo General del proyecto, p. 3

1.3.2 Objetivos específicos, p. 3

1.4 Marco teórico, p. 4

| | |
|---------|-------------------------------------------------------------------|
| 1.4.1 | <i>Senna Multiglandulosa</i> , p. 4 |
| 1.4.2 | Pigmentos naturales: carotenoides, p. 5 |
| 1.4.2.1 | Carotenoides, p. 5 |
| 1.4.2.2 | Nomenclatura, p. 7 |
| 1.4.2.3 | Clasificación, p. 8 |
| 1.4.2.4 | Distribución y estado natural, p. 9 |
| 1.4.2.5 | Función, p. 10 |
| 1.4.2.6 | Extracción y aislamiento, p. 10 |
| 1.4.2.7 | Aplicaciones, p. 12 |
| 1.4.3 | Carotenoides en la industria: antecedentes y usos actuales, p. 15 |
| 1.4.4 | Oxidación y compuestos antioxidantes, p. 16 |
| 1.4.5 | Uso de los carotenoides en medicina, p. 20 |
| 1.5 | Preguntas de investigación, p. 22 |
| 2 | MATERIALES Y MÉTODOS, p. 22 |
| 2.1 | Participantes, p. 22 |
| 2.2 | Zona de estudio, p. 22 |
| 2.3 | Periodo de tiempo de investigación, p. 23 |
| 2.4 | Diseño, p. 23 |
| 2.5 | Instrumentos utilizados, p. 23 |
| 2.5.1 | Equipos, p. 23 |

| | | |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2.5.2 | Reactivos, | p. 25 |
| 2.6 | Procedimientos, | p. 26 |
| 2.6.1 | Recolección de material vegetal, | p. 27 |
| 2.6.2 | Troceado, | p. 28 |
| 2.6.3 | Secado, | p. 28 |
| 2.6.4 | Pulverizado, | p. 29 |
| 2.6.5 | Almacenamiento, | p. 29 |
| 2.6.6 | Pesaje, | p. 30 |
| 2.6.7 | Extracción de carotenoides del material vegetal, | p. 30 |
| 2.6.7.1 | Método No 1, | p. 30 |
| 2.6.7.2 | Método No 2, | p. 31 |
| 2.6.7.3 | Método No 3, | p. 31 |
| 2.6.7.4 | Método No 4, | p. 31 |
| 2.6.8 | Filtrado, | p. 31 |
| 2.6.9 | Mezclado, | p. 32 |
| 2.6.10 | Saponificación, | p. 33 |
| 2.6.10.1 | Filtrado o remoción de compuestos saponificables, | p. 33 |
| 2.6.11 | Cuantificación de los carotenoides presentes por HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia), | p. 34 |
| 2.6.12 | Determinación de la capacidad antioxidante, | p. 34 |

| | | |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2.6.13 | Identificación de los carotenoides presentes mediante T.L.C, | p. 36 |
| 2.7 | Análisis de datos, | p. 36 |
| 3 | RESULTADOS, | p. 38 |
| 3.1 | Obtención de material vegetal seco a partir de los pétalos de <i>Senna Multiglandulosa</i> , | p. 38 |
| 3.2 | Identificación de los carotenoides presentes mediante T.L.C (cromatografía en capa fina), | p. 39 |
| 3.3.1 | Primera réplica, | p. 39 |
| 3.3.2 | Segunda réplica, | p. 44 |
| 3.3 | Cuantificación de los carotinoideos presentes por HPLC, | p. 52 |
| 3.4 | Determinación del potencial antioxidante mediante el reactivo DPPH (2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo, D-9132), | p. 56 |
| 4 | DISCUSIÓN, | p. 58 |
| 5 | CONCLUSIONES, | p. 64 |
| 6 | RECOMENDACIONES, | p. 66 |
| 7 | BIBLIOGRAFÍA, | p. 68 |
| 8 | ANEXOS, | p. 76 |

Listado de tablas

Tabla 2.1.-Detalle de la construcción de las mezclas utilizadas a partir de los extractos originales, p. 32.

Tabla 3.1.- Pesos en gramos del material vegetal usado para la extracción de carotenoides mediante cuatro métodos de extracción, p. 38

Tabla 3.2.- Promedios, desviación estándar y varianza de los pesos del material vegetal obtenido correspondientes a cada método de extracción, p. 38.

Tabla 3.3.- Promedio, desviación estándar y varianza del conjunto de pesos del material vegetal usado en el presente estudio, p. 39.

Tabla 3.4.- Valores de RF calculados y coloración mostrada por las diferentes bandas obtenidas de la cromatografía de los cuatro extractos (correspondientes a cada método de extracción), correspondientes a la primera repetición, p. 41.

Tabla 3.5.- Valores de RF calculados y coloración mostrada por las diferentes bandas obtenidas de la cromatografía de los cuatro extractos (correspondientes a cada método de extracción), correspondientes a la segunda repetición. (Las bandas marcadas con luz U.V larga no fueron visibles a simple vista, si no únicamente mediante luz ultravioleta de longitud larga), p. 43.

Tabla 3.6.- Valores de RF calculados y coloración mostrada por las diferentes bandas obtenidas de la cromatografía de los cuatro extractos (correspondientes a cada método de extracción), correspondientes a la réplica de los cromatogramas. (Las bandas marcadas con luz U.V larga no fueron visibles a simple vista, si no únicamente mediante luz ultravioleta de longitud larga), p. 45

Tabla 3.7.- Identificación inicial de los carotenoides presentes en el extracto 1, p. 46

Tabla 3.8.- Identificación inicial de los carotenoides presentes en el extracto 2, p. 47

Tabla 3.9.- Identificación inicial de los carotenoides presentes en el extracto 3, p. 48

Tabla 3.10.- Identificación inicial de los carotenoides presentes en el extracto 4, p. 49

Tabla 3.11.- Confirmación de los carotenoides presentes en el extracto 1, p. 50

Tabla 3.12.- Confirmación de los carotenoides presentes en el extracto 2, p. 50

Tabla 3.13.- Confirmación de los carotenoides presentes en el extracto 3, p. 51

Tabla 3.14.- Confirmación de los carotenoides presentes en el extracto 4, p. 51

Tabla 3.15.- Tiempo de retención de los carotenoides durante el proceso de HPLC como también altura y área de las curvas obtenidas, p. 53.

Tabla 3.16.-Concentración de los carotenoides presentes en los extractos expresados en ug de betacaroteno/100g de muestra, p.53.

Tabla 3.17.- Análisis de varianza o ANOVA de los datos de concentración de los cuatro métodos de extracción propuestos, p. 54.

Tabla 3.18.-Determinación de diferencias estadísticas de los métodos de extracción mediante la prueba de Fisher LSD, p. 55.

Tabla 3.19.-Determinación de diferencias estadísticas de los métodos de extracción mediante la prueba de Tukey, p. 55.

Tabla 3.20.- Absorbancias de los extractos correspondientes al método de extracción con cloroformo; y su respectivo potencial antioxidante junto con la medida del ácido ascórbico (sustancia patrón), p. 57.

Listado de cuadros

Cuadro3.1-Valores RF estándar de carotenoides y Xantófilas en una fase móvil de éter de petróleo y benceno (proporción 1:9) para carotenoides; y di cloro metano con acetato de etilo (proporción 1:4) para xantofilas, p. 39.

Listado de figuras

Figura 1.1.-*Senna Multiglandulosa* en su estado natural, p. 4.

Figura 1.2.-Ejemplos de carotenoides naturales, p. 7.

Figura 1.3.-Numeración y clave con letras griegas de acuerdo a las estructuras posibles de los extremos del caroteno, p. 8.

Figura 2.1.-Diagrama de bloques general de los procedimientos, p. 26.

Figura 2.2.-Imagen de los datos de posicionamiento global obtenidos mediante GPS (global positioning system), p. 27.

Figura 3.1.- Primeros dos cromatogramas obtenidos para la identificación de carotenoides en los extractos obtenidos. A la izquierda: fase móvil compuesta de Di cloro metano y acetato de etilo (4:1); y a la derecha Éter de petróleo y Benceno (1:9), p. 40.

Figura 3.2.- Primeros dos cromatogramas en la identificación de los carotenoides presentes en los extractos obtenidos. Se puede observar que existen zonas que no son visibles a simple vista pero que son revelados mediante luz ultravioleta de longitud larga, p. 40.

Figura 3.3.- Segunda repetición de los cromatogramas para la identificación de carotenoides en los extractos obtenidos. Se puede observar una mejoría en cuanto a la visibilidad de los compuestos y a la claridad de las bandas formadas, p. 42.

Figura 3.4.- Segunda repetición de los cromatogramas en la identificación de carotenoides; se puede observar una mejoría en cuanto a la claridad de las bandas visibles con luz ultravioleta de longitud larga, p. 42

Figura 3.5.- Segunda sesión de identificación de los carotenoides presentes en los extractos obtenidos; en este caso solamente se utilizó éter de petróleo y benceno (1.9). Se puede ver que existen bandas de color rojo que prácticamente no migraron en los cromatogramas; y existen muchas bandas de compuestos no visibles simple vista, p. 44.

Figura 3.6.-Gráfico de cajas de los datos sometidos a análisis; se puede ver que los únicos dos tratamientos en mostrar diferencias significativas son los correspondientes al Éter etílico y Cloroformo (1:1) o tratamiento numero 2; y al Cloroformo o tratamiento número 3, p.56.

ABREVIATURAS.

HPLC.-Cromatografía líquida de alta eficiencia (high performance liquid chromatography).

TLC.-Cromatografía en capa fina (Thin layer chromatography).

DPPH.- 2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo, D-9132.

IUPAC.-Unión internacional de química aplicada y pura (International Union of Pure and Applied Chemistry).

UV.-Luz ultravioleta

UV Larga.-Luz ultravioleta de longitud de onda larga.

KOH.-Hidróxido de potasio

ADN.-Ácido desoxirribonucleico.

RF.-Factor de retención.

μL.-Microlitros.

mg.L⁻¹.-Miligramos por cada litro.

mL.- Mililitros.

nm.- Nanómetros.

Fisher LSD.- Diferencia mínimamente significativa de Fisher (least significant difference).

Tukey.-Diferencia honestamente significativa de Tukey.

μg/100g.- Microgramos por cada cien gramos.

TRAP.- Parámetro antioxidante de total de captura de radicales (Total radical trapping antioxidant parameter).

ORAC.- Capacidad de absorción de radicales oxigenados (Oxygen radical- absorbance capacity).

TBAR'S.- Método del ácido tiobarbitúrico (tiobarbituric's acid method)

LDL.- Lipoproteínas de baja densidad (low density proteins)

Resumen

Los carotenoides, conocidos también como tetraterpenoides, son pigmentos de cuarenta átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranil-geranil-pirofosfato. Su estructura de enlaces dobles y simples determina que funciones biológicas pueda tener, como absorber excesos de energía de otras moléculas o dar lugar a un efecto antioxidante; mientras que la naturaleza de sus grupos terminales tiene una influencia en su polaridad, determinando su interacción con membranas biológicas (Swaminathan, S. 2008).

En la presente investigación se determinó el mejor método de extracción de carotenoides presentes en los pétalos de *Senna Multiglandulosa*; para posteriormente determinar su capacidad antioxidante. Para esto se secó y pulverizó el material vegetal; se probaron 4 métodos de extracción con solventes orgánicos; la identificación de los mismos fue realizada por medio de T.L.C (cromatografía en capa fina), su cuantificación mediante H.P.L.C (cromatografía líquida de alta eficacia), y finalmente determinó su potencial antioxidante con el uso del reactivo D.P.P.H.

El análisis por T.L.C confirmó la presencia de: α -Caroteno, β -Caroteno, γ -Caroteno; Licopeno y Capsantina, de los cuales el ϵ -Caroteno y la Capsantina presente mostraron un color amarillo; el β -Caroteno, γ -Caroteno no aportaron color, pero fueron detectables mediante luz ultravioleta de longitud de onda larga. El licopeno presente fue el único compuesto en mostrar un color rojizo.

Los resultados del análisis por H.P.L.C indican que el mejor método de extracción en el que se utiliza cloroformo (promedio: 26114,38 μ g/100g de muestra).

La evaluación de la actividad antioxidante efectuada en las muestras de cloroformo dio como resultado un máximo de 54,08%.

Con base a estos resultados, concluimos que la especie *Senna Multiglandulosa* es una fuente natural de carotenoides, con mayor presencia de aquellos que aportan una coloración amarilla; es una fuente de Licopeno y tiene un efecto antioxidante.

Palabras clave: Carotenoides, Senna Multiglandulosa, pétalos, Éter de petróleo, Éter etílico, Cloroformo, Isopropanol, T.L.C, H.P.L.C; potencial antioxidante, D.P.P.H.

Abstract

Carotenoids, also known as tetraterpenoids; are pigments with forty carbon atoms produced from two units of geranyl-geranyl-piropofate. Their biological functions are determined by its structure of double and simple bonds, like the absorption of energy from other molecules or antioxidant effects; while the nature of their terminal bonds influence their polarity thus determining their interaction with biological membranes. (Swaminathan, S. 2008).

In this study the best method for carotenoids extraction from *Senna Multiglandulosa*'s petals is determined, to subsequently determine its antioxidant capacity. For this purpose the samples were dried and pulverized; then four extraction methods were tested using organic solvents; their identification was performed with T.L.C (thin layer chromatography); its quantification with H.P.L.C (High performance liquid chromatography), and finally the determination of their antioxidant potential was done with the D.P.P.H reagent.

The T.L.C analysis confirmed the presence of: ϵ -caroten, β -caroten, γ -caroten; lycopene and Capsanthin; among these the ϵ -caroten and Capsanthin showed yellow color; the β -caroten, γ -caroten didn't show any color at plain sight, but they were revealed with u.v light with wide wavelength. The Lycopene present showed a redish colour; but it was the only compound that presented this coloration.

The results from the H.P.L.C analysis showed that the best extraction method is the chloroform (an average of 26114,38 μ g/100g of sample); followed by ethylic ether and chloroform (an average of: 16479,611 μ g/100g of sample); the Isopropanol (an average of 3639,97 μ g/100g of sample); and finally (the least

efficient method for carotenoid extraction) petroleum ether(an average of 2678,18µg/100g of sample).

The evaluation of the antioxidant activity performed in the chloroform samples showed a maximum of 54,08% from the sample designated M3R2, and a minimum from the sample designated M3R1.

With these results, we can say that *Senna Multiglandulosa* is a natural source of carotenoids; with a higher proportion of the ones that show a yellowish coloration; is also a source of Lycopene; and is able to produce an antioxidant effect.

It is possible to conclude that the best method for carotenoids extraction in our case was the chloroform.

Key words: Carotenoids, *Senna Multiglandulosa*, petals; Petroleum ether, Ethilic ether, Chloroform, Isopropanol, T.L.C, H.P.L.C, antioxidant potential, D.P.P.H

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

Senna Multiglandulosa es una especie conocida por su acervo cultural ancestral como una planta medicinal, sin embargo no existen estudios científicos de su contenido en carotenoides; como tampoco de sus propiedades antioxidantes. La coloración amarilla intensa de sus pétalos puede deberse, como en otras especies vegetales a un elevado contenido de carotenoides lo que puede dar lugar a un efecto antioxidante representativo.

1.2 Justificación del problema

Debido a que el manejo de los carotenoides es una necesidad innegable en el mundo actual, existe una tendencia a enfocarse excesivamente en especies vegetales de las que se conoce su rendimiento, calidad o variedad; que en general son frutas y verduras ya que aportan carotenoides en mayor cantidad.

Esto conlleva a la sobre explotación de estas especies, como de los métodos existentes para aumentar la tasa de producción de carotenoides: mejora genética; diferentes técnicas de cultivo, desarrollo de métodos para síntesis de compuestos conocidos; esto da lugar al no desarrollo de nuevas soluciones en esta problemática.

Realmente se desconoce el potencial real ciertas flores como proveedoras de estos compuestos, en cuanto a calidad, o variedad de carotenoides. (Graham, R.D. 2000).

El manejo de estas sustancias, aunque ya se ha dado por algún tiempo, necesita nuevos descubrimientos y, nuevas opciones que nos permitan utilizar carotenoides con mayor flexibilidad y, ampliar los horizontes sobre esta problemática, que al parecer va a ser imprescindible para el desarrollo de casi todos los aspectos de la sociedad en el futuro.

Uno de los propósitos de este estudio es explorar una tendencia nueva; investigar esta especie poco conocida, seguir líneas no convencionales en el manejo de carotenoides y buscar nuevas soluciones a problemas actuales; aumentando el grado de flexibilidad de nuestros conocimientos en esta área.

En la presente investigación se estudia el uso de *Senna Multiglandulosa* como fuente de carotenoides y su respectivo potencial antioxidante.

Los resultados de esta investigación pueden aportar a la industria farmacéutica y alimenticia, dar lugar a nuevos conocimientos botánicos; y abrir posibilidades para aplicaciones biotecnológicas; debido a que no existen estudios para la especie *Senna Multiglandulosa*; los resultados del contenido y uso de los mismos podrían apoyar de manera significativa a estas áreas por el conocimiento que se logró obtener de esta especie; como de las futuras aplicaciones que esta pueda tener.

La industria farmacéutica tendría la oportunidad de desarrollar una nueva gama de productos con efectos antioxidantes; los biólogos o botánicos obtendrían nuevos criterios sobre la aplicación de la especie en cuestión y los ingenieros en biotecnología podrían desarrollar nuevas tecnologías o estudios complementarios

sobre el mejoramiento genético de la especie; con el fin de mejorar características de interés; o minimizar otras con un efecto indeseable.

También sería favorecido el sector comercial; ya que los consumidores tendrían nuevas alternativas para diferentes tratamientos o consumo de nuevos productos, por lo que puede decirse que se espera influir positivamente en el sector médico e industrial.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General del proyecto

Extraer, identificar, cuantificar y determinar la actividad antioxidante de los carotenoides presentes en las flores de *Senna Multiglandulosa* a través de cuatro métodos de extracción.

1.3.2 Objetivos específicos

- Estandarizar los cuatro métodos propuestos para la extracción de carotenoides.
- Extraer los carotenoides presentes en la flor de *Senna Multiglandulosa*.
- Identificarlos carotenoides de cuatro extractos diferentes mediante un análisis por T.L.C (Thin layer chromatography).

- Cuantificar los carotenoides totales de cada muestra mediante H.P.L.C (cromatografía líquida de alta eficiencia).
- Establecer el mejor método de extracción de carotenoides.
- Determinar la capacidad antioxidante de la muestra con mayor contenido de carotenoides mediante el uso del reactivo DPPH (2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo, D-9132).

1.4 Marco teórico

1.4.1 *Senna Multiglandulosa*



Figura 1.1.-*Senna Multiglandulosa* en su estado natural.

También conocida como Chin Chin Silvestre, es una planta leñosa, de raíz axonomorfa, con inflorescencia en racimo con un infinito número de estambres poliadelfos a manera de brocha, fruto seco en legumbre. (Rueda, D. 2004).

Es nativa de Sud América, pero se la cultiva mundialmente como planta ornamental y, en ciertas áreas se naturalizó como silvestre. Se trata de un arbusto que puede llegar a crecer hasta seis metros en altura asemejándose a un árbol.

Nombre científico: *Senna Multiglandulosa*.

Reino: Plantae.

Clase: Magnoliophyta

Subclase: Dicotiledóneas (Magnoliopsida)

Orden: Fabales

Familia: Caesalpinaceae

Género: *Senna*.

Especie: *Senna Multiglandulosa*.

(Rueda, D. 2004).

1.4.2 Pigmentos naturales: carotenoides

1.4.2.1 Carotenoides

Conocidos también como tetraterpenoides, son pigmentos de 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranyl-geranyl-pirofosfato. Esta cadena puede considerarse el esqueleto de la molécula

que puede terminar con grupos cíclicos complementada con grupos funcionales oxigenados. (Swaminathan, S. 2008).

Su estructura básica puede ser la causa del potencial antioxidante de los carotenoides mientras que sus grupos terminales, podrían ser una explicación de las diferentes formas en las que los carotenoides individuales interactúan con membranas biológicas. (Swaminathan, S. 2008).

La estructura de un carotenoide determina que funciones biológicas pueda tener. Su patrón distintivo de enlaces dobles y simples en su estructura es lo que les permite absorber excesos de energía de otras moléculas, mientras que la naturaleza de sus grupos terminales tiene una influencia en su polaridad. (Swaminathan, S. 2008).

En su mayoría son solubles en solventes apolares y dan lugar a coloración que oscila entre el amarillo (como el β - caroteno) y el rojo (como el licopeno). (Martinez, M, A. 2003).

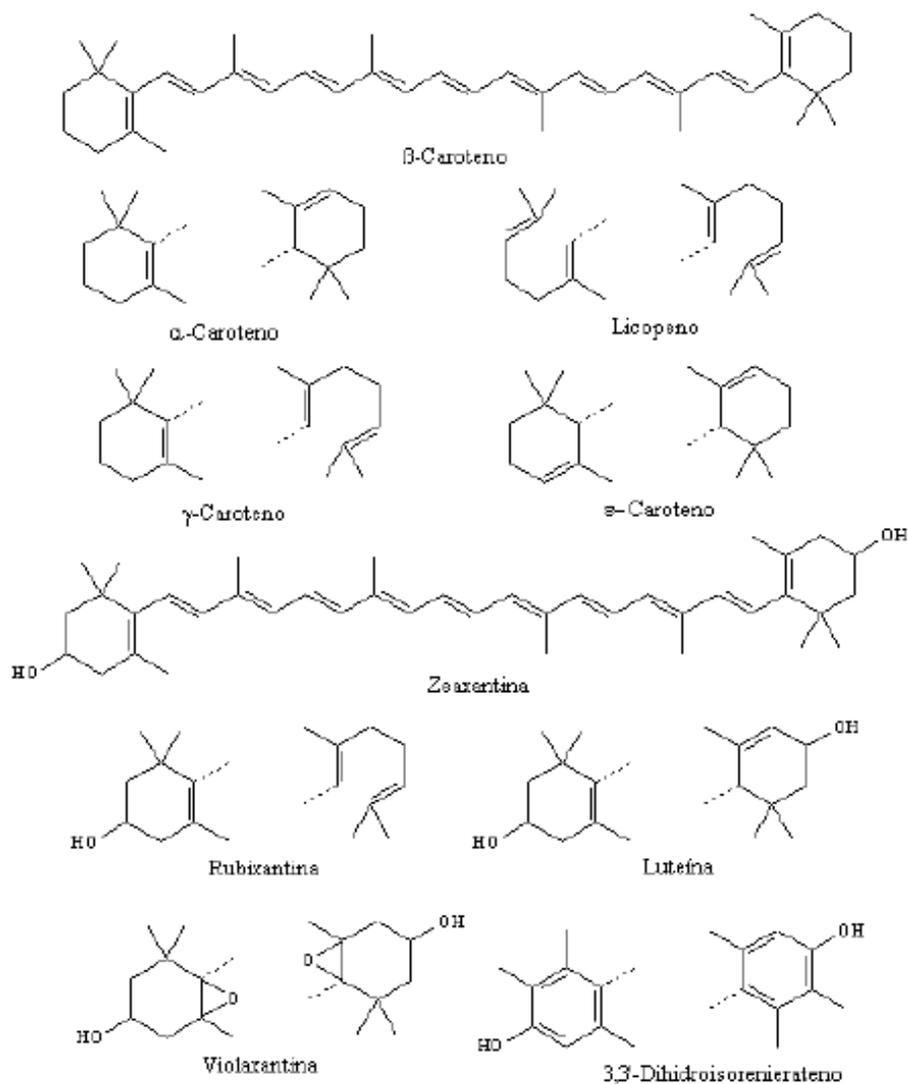


Figura 1.2.-Ejemplos de carotenoides naturales.

1.4.2.2 Nomenclatura

La estructura patrón de 40 carbonos se denomina "caroteno". La numeración se toma en cuenta como un dímero, por lo que la mitad izquierda se numera comenzando por el carbono que se enlaza a dos metilos y se prosigue de manera lineal hasta el carbono 15 (El extremo opuesto del primer monómero); se prosigue a numerar los metilos de izquierda a derecha hasta el número 20. La mitad derecha se numera de manera homóloga de derecha a izquierda con

numeración primada. Dependiendo la estructura de cada uno de los extremos, se nombra el tipo de extremo de la izquierda con las letras griegas de acuerdo a la convención de la IUPAC. Posteriormente se hace lo mismo con la mitad derecha. (Martinez, M, A. 2003).

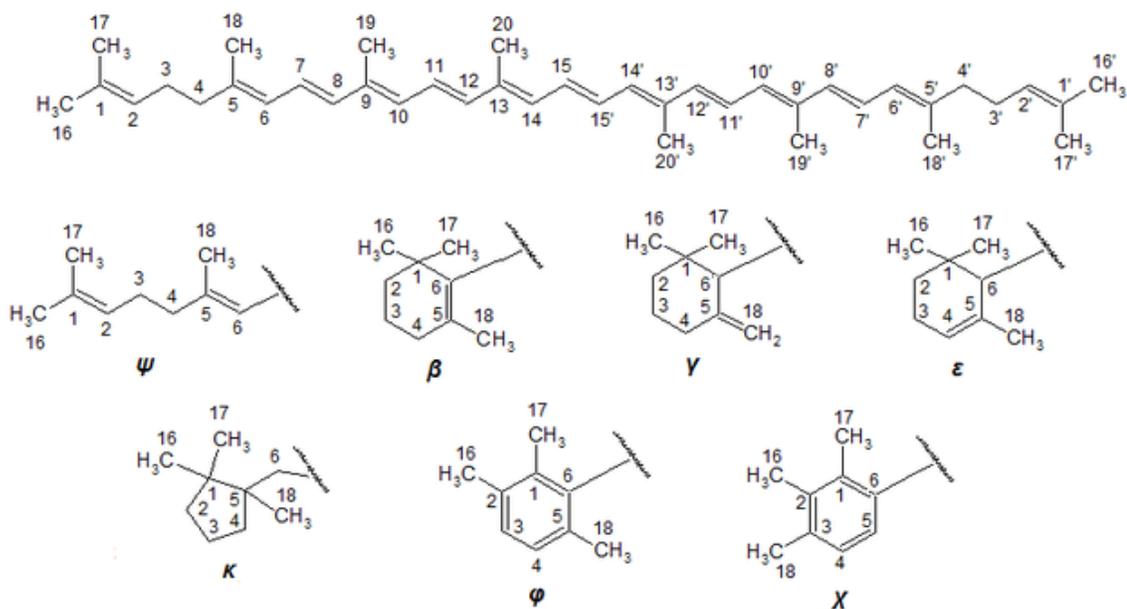


Figura 1.3.-Numeración y clave con letras griegas de acuerdo a las estructuras posibles de los extremos del caroteno.

1.4.2.3 Clasificación

Se clasifican en:

Carotenos.- Solo contienen carbono e hidrógeno (β - caroteno, el licopeno, etc).

Xantofilas.-Estas a más de carbono e hidrógeno tienen oxígeno en su molécula.

En general para los carotenos se usa el sufijo caroteno, y para las xantofilas el sufijo ina.

1.4.2.4 Distribución y estado natural

No hay duda de que los carotenoides son pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza; se encuentran en todo el reino vegetal, en bacterias, algas, hongos, vertebrados, invertebrados y crustáceos.

Aunque los animales son incapaces de sintetizar carotenoides, muchos deben incorporar carotenoides a partir de su dieta. (Swaminathan, S. 2008).

En animales superiores el β - caroteno es un componente esencial de la dieta, por ser el precursor de la vitamina A (retinol), además de ser el responsable de ciertas coloraciones brillantes en el pelaje, piel, ojos, y más. (Martinez, M, A. 2003).

Los 700 carotenoides conocidos se les suele encontrar en forma libre como ésteres de ácidos grasos o como glucósidos, aunque estos son muy raros siendo un ejemplo la crocina (carotenoide natural encontrado en las flores de Crocus y Gardenia, aporta un color rojo intenso, y es altamente antioxidante, tiene además propiedades anti carcinogénicas y afrodisíacas). Actualmente se siguen identificando carotenoides nuevos. (Martinez, M, A. 2003).

El caroteno más comúnmente encontrado es el β - caroteno, usualmente constituye entre el 25 – 30 % del contenido total de carotenoides en plantas. La

luteína es la Xantofila más abundante (40-45%), pero siempre se encuentra en menor proporción que el β - caroteno. (Martinez, M, A. 2003).

Hay carotenoides que confieren coloraciones amarilla, naranja, roja y violeta a tejidos vegetales y algunos órganos animales. Los flavonoides confieren colores similares, en tonalidades azules a muchas flores y frutos. (Martinez, M, A. 2003).

Algunos ejemplos vienen a ser las coloraciones anaranjadas de la zanahoria, frutas cítricas, el rojo de pimientos, tomates y, tonalidades rojas del flamenco o el salmón. (Swaminathan, S. 2008).

1.4.2.5 Función

En plantas, algas y bacterias fotosintéticas sirven como pigmentos complementarios en la recolección de la luz durante el proceso fotosintético y como sustancias fotoprotectoras, evitando en cierta forma la diseminación de especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres, impidiendo su acción nociva en la célula, protegiendo de reacciones entre oxígeno, luz UV o visible y moléculas lipofílicas fotosensibles, como bacterioclorofila o clorofila. En los animales estos pigmentos tienen una gran importancia a nivel nutricional y fisiológico. (Mosquera, 2005).

1.4.2.6 Extracción y aislamiento

Los carotenoides tienden a descomponerse por efecto de la luz, la temperatura y el aire; debido a la alta conjugación de enlaces dobles de sus

moléculas. La luz degrada los carotenoides al cambiar su estructura original (por ejemplo el isómero cis y el isómero trans, al cambiar su estereoquímica cambia dramáticamente sus propiedades), este es un factor a considerar al momento de realizar la extracción. Los carotenoides también sufren de degradación térmica en su estructura. El contenido de oxígeno en el aire favorece la reacción de los enlaces dobles a funciones epóxido, hidroxilos y peróxidos, entre otros. Debido a estos factores es recomendable realizar la extracción de carotenoides en ausencia de luz, oxígeno (en una atmósfera artificial de nitrógeno u otro gas inerte) y a temperatura ambiente o menor. Además se debe realizar lo más rápido posible y, usar tejidos frescos, para evitar la degradación conjunta de estos factores adversos. (Martinez, M, A. 2003).

Debido a que los carotenoides son solubles en compuestos orgánicos poco polares como el éter etílico, benceno, cloroformo, acetona, acetato de etilo, entre otros y al hecho de que se deben extraer de tejidos frescos que tienen un alto contenido de agua que dificulta una óptima extracción, es mejor eliminar la misma. Un procedimiento recomendable es deshidratar los tejidos con etanol o metanol a ebullición seguido de filtración. Con el tejido deshidratado se puede extraer los carotenoides con solventes orgánicos. Una alternativa apropiada para la deshidratación es la liofilización, que resulta conveniente, ya que se realiza al vacío, eliminando la posibilidad de degradación por altas temperaturas y la presencia de aire. Si hay presencia de carotenoides esterificados en el extracto, estos se pueden hidrolizar disolviendo el extracto en un volumen pequeño de KOH 60% alcohólico. Esta mezcla se deja en la oscuridad durante una noche, en atmósfera de nitrógeno, a temperatura ambiente y en agitación, con esto los carotenoides serán liberados. Si se requiere un proceso más rápido, es aconsejable la ebullición durante 5-10 minutos. (Martinez, M, A. 2003).

Para separar carotenoides mezclados con Xantofilas mono y dihidroxiladas se debe agitar la muestra con una solución de éter de petróleo y metanol al 90% (V/V). “Las Xantofilas dihidroxiladas quedan en la fase metanólica, las mono-hidroxiladas y los carotenoides quedan en la fase etérea. Repitiendo este proceso se separan en la fase metanólica las Xantofilas monohidroxiladas y, en la fase etérea quedan los carotenoides. Las Xantofilas en las fases metanólicas pueden recuperarse extrayéndolas con éter etílico”. (Martínez, M, A. 2003).

Usualmente los extractos de carotenoides se encuentran impuros debido a la presencia de otras sustancias como esteroides, estas pueden ser eliminadas dejando el extracto concentrado en una solución de éter etílico, tapado y a -10°C durante la noche. De esta manera los esteroides se precipitan y se los puede retirar por centrifugación o filtración. (Martínez, M, A. 2003).

Una vez obtenido los extractos de carotenoides, se los puede separar y analizar por cromatografía en capa fina, en papel o en columna. El método más común es la cromatografía en capa fina con varias clases de fases estacionarias que incluyen: óxido de magnesio activado, sílica gel, hidróxido de calcio y fosfato de magnesio entre otros. (Martinez, M, A. 2003).

1.4.2.7 Aplicaciones

Tradicionalmente se los incorporaba a los alimentos y productos medicinales en carácter de colorantes, obteniéndolos en forma de extractos, hoy en día se recurre principalmente al uso de carotenoides obtenidos por síntesis.

Cuando se agrega carotenoides a una ración de alimentación animal; estos proveen coloración a los tejidos en los cuales se acumulan (función pigmentante); aunque mayormente se encuentran alterados de alguna manera, ya sea por descomposición enzimática u oxidación. Esta es la razón por la que se los ha usado en diversas industrias: como en la acuicultura donde se utiliza la astaxantina para pigmentar la carne, piel o exoesqueleto de salmónidos y crustáceos. Otros carotenos como el β - caroteno y el β - apocarotenal se utilizan en la producción de quesos, helados, dulces entre otros. (Sánchez, A.1999).

La presencia de gran número de dobles enlaces hace a los carotenoides muy sensibles a la oxidación, especialmente en reacciones de foto oxidación con el oxígeno molecular. También se oxidan en presencia de lipo-oxigenasas, pero no de forma directa, sino por reacción con los hidroperóxidos. Las reacciones de oxidación dan lugar en todos los casos a la pérdida de color. Generalmente, existe una gran dependencia entre la velocidad de oxidación y el ambiente en el que se encuentran. Dentro de los alimentos, los carotenoides son mucho más resistentes a la oxidación que en materiales pulverizados y secos, o en extractos.

También pueden alterarse por isomerización. Salvo excepciones, como en algunas algas, los carotenoides naturales se encuentran siempre con todos los dobles enlaces en forma *trans*. Aunque en principio la configuración *trans* de los dobles sería la más estable, las repulsiones que inducen los grupos metilos laterales hacen que algunos de los dobles enlaces puedan pasar a la configuración *cis*. Esta isomerización puede producirse por calentamiento, exposición a la luz o de forma espontánea en ciertos disolventes o en presencia de superficies activas.

En cuanto a la actividad antioxidante de los carotenoides, existe una considerable cantidad de evidencia de la interacción in Vitro de β - caroteno con radicales libres, debido a sus propiedades como antioxidante (rompiendo cadenas de reacciones perjudiciales) y su capacidad de estabilizar el oxígeno libre, que es en general una capacidad común para la mayoría de carotenoides conocidos. (Kriskey, N. 1989).

En un estudio realizado con carotenoides provenientes de la dieta, se determinó que el licopeno tiene una mayor capacidad antioxidante, seguido por el β - caroteno y, este siendo más potente que el α - caroteno, al comparar sus estructuras encontraron que el licopeno acíclico y el β - caroteno tienen 11 enlaces dobles conjugados, pero el último es bicíclico. Por esta razón parece ser que la habilidad de los carotenoides para efectuar su acción antioxidante aumenta al aumentar su apéndice cromóforo y su traslape de orbitales moleculares con dobles enlaces. La presencia de grupos funcionales en los anillos terminales modula esta capacidad antioxidante. (Miller, J. N.1996).

Esta actividad marcada de los carotenoides hacia los radicales libres y sus efectos antioxidantes se relaciona a su habilidad para donar electrones o átomos de hidrógeno y lo propensos que son para oxidarse. Existen opiniones en las que además de tener una actividad antioxidante; luego de sus reacciones forman aductos radicalarios no reactantes, relativamente estables; con tendencia a decaer o unirse con los radicales atacantes, formando igualmente productos estables. (Everett, S.A.1996).

Por esta razón existe un gran movimiento para el desarrollo de productos suplementados con carotenoides; tanto medicinales; alimenticios, naturales y más, debido a que es un hecho comprobado su capacidad antioxidante in vivo.

1.4.3 Carotenoides en la industria: antecedentes y usos actuales

De todos los pigmentos naturales conocidos actualmente los mayormente distribuidos en la naturaleza son las clorofilas y los carotenoides. (Mosquera, 2005).

Los carotenoides se han usado tradicionalmente en alimentos procesados como lácteos, fármacos y cosméticos, los de uso más popular incluyen: β -caroteno, cantaxantina, luteína, astaxantina, zeaxantina, capsantina, capsorubina, rodoxantina y algunos apocarotenoides, ya sea extraídos de fuentes naturales o sintetizados. (Klaui, 1981).

Por largo tiempo se han usado compuestos como xantina, luteína, y cantaxantina en la industria avícola para mejorar la coloración de la yema de huevo y la piel del pollo adicionándolos en su dieta. (Marusich, 1981).

De la misma manera se utilizan estos compuestos en acuicultura para darle color a diferentes partes de la anatomía de salmónidos y crustáceos e incrementar su aceptabilidad. (Shahaidi, 1998).

“Se estima que la producción anual en la naturaleza es de 10^8 toneladas, y en la actualidad se conocen cerca de 700 carotenoides”. (Mosquera, 2005).

De los 700 carotenoides identificados, cerca de 200 se habían sintetizado hasta 1994, incluyendo estructuras complejas como la Peridinina, que fue sintetizada en forma óptimamente activa en 1990. (Pfander, 1996).

Solo 40 carotenoides son consumidos regularmente por el ser humano y unos cuantos se producen industrialmente. Las ventas de astaxantina y β -caroteno principalmente han aumentado considerablemente a partir de 1990. (Pfander, 1996).

El carotenoide de mayor venta es el β - caroteno con una producción anual estimada de 500 toneladas. Los carotenoides se comercializan a precios por kilo del orden de USA \$600 para el β -caroteno y para los β - apo - 8 - carotenoides, de USA \$1300 para la cantaxantina y \$2300 dólares para la astaxantina. En 1995 las ventas de carotenoides sintéticos fueron cercanas a los USA \$500.000. Otros carotenoides con potencial económico para los que se han desarrollado vías de síntesis industrial son el Licopeno, zeaxantina y capsorubina. (Pfander, 1996).

1.4.4Oxidación y compuestos antioxidantes

El fenómeno de la oxidación explicado químicamente consiste en la pérdida de electrones por parte de una especie; mientras que la reducción es la ganancia de electrones; usualmente se dan ambos procesos simultáneamente en una misma reacción química. Generalmente, la sustancia que oxida es reducida (en cierta medida) y se debe a que es más electronegativa; es decir tiene una mayor tendencia a acaparar estos electrones durante una reacción.(Skoog, D. A. 2001).

Se puede afirmar que una sustancia oxidada se encuentra degradada, debido a que ha pasado a un estado más inestable y ha perdido energía. El proceso inverso; que una sustancia oxidada no electronegativa sea reducida no es viable en términos energéticos y, realmente no se da muy a menudo, en la naturaleza.

En los seres vivos, en el metabolismo oxidativo, se generan continuamente especies oxigenadas parcialmente reducidas, que son mucho más reactivas y, que pueden llegar a ser extremadamente tóxicas. Estas son también llamadas radicales libres y, tienden a sufrir reacciones en cadena, hasta convertirse en moléculas inocuas. Es decir que no dejan de reaccionar con la primera molécula que encuentran si no que siguen un proceso muy variado y destructivo hasta llegar a estabilizarse. (Mathews, C.1998).

Entre estas especies podemos mencionar los radicales hidroxilo, que son extremadamente reactivos y constituyen el agente mutágeno más activo que los que se producen a partir de la radiación ionizante. Estas especies (súper óxidos, peróxidos, radicales hidroxilo, iones hidroxilo, entre otras) deben convertirse en especies menos reactivas si se pretende que el organismo sobreviva. Es un aspecto algo paradójico desde el punto de la bioquímica que el oxígeno, esencial para la vida, es también una de las sustancias más tóxicas a causa de la reactividad de estas especies parcialmente reducidas, de hecho, el oxígeno es altamente tóxico para la mayoría de organismos anaerobios (adaptados a un metabolismo oxidativo) y, en la fase inicial de la evolución fue tóxico para todas las formas de vida.

Las especies tóxicas del oxígeno reaccionan con todas las clases de macro-moléculas celulares y, las reacciones suelen dar lugar a una gran variedad

de estados patológicos, como la arteriosclerosis, el ictus, el cáncer, el emfisema, el envejecimiento, entre otras enfermedades degenerativas. Las membranas pueden sufrir daños, que consisten fundamentalmente en una oxidación de los lípidos de la membrana. Se cree que la acumulación de proteínas lesionadas debido a una oxidación o enzimas inactivas por fenómenos similares contribuyen a producir el envejecimiento celular.(Mathews, C. 1998).

Recientemente ha habido un gran interés por el daño sufrido en el ADN debido a estas especies oxidantes, que incluyen fenómenos letales y mutágenos. Los radicales hidroxilo causan una ruptura de las hebras de ADN. Aunque las roturas de una sola hebra pueden repararse, las de doble hebra no pueden hacerlo y la célula muere como resultado de la interrupción de la replicación cromosómica. Además se forman varias bases alteradas por la reacción de los radicales hidroxilos con el ADN, como la 8-hidroxiguanina, la tiamina glicol y el 5-hidroximetiluracilo. Todas estas modificaciones son generadoras de mutaciones, debido a que esta base modificada altera sus propiedades de apareamiento con otras bases y ello da lugar errores en la replicación de ADN. Es un hecho ampliamente aceptado que el cáncer se produce como una serie de mutaciones celulares somáticas. Normalmente estos daños se reparan de manera eficiente, pero si se acumulan en una cantidad superior a la capacidad de reparación de una célula, aumenta la frecuencia de mutaciones, al igual que la probabilidad de carcinogénesis.(Mathews, C. 1998).

Las células poseen diversos mecanismos para protegerse del daño oxidativo, tanto químicos como enzimáticos. Diversos compuestos actúan como antioxidantes biológicos ya sea eliminando los radicales de oxígeno o reduciendo químicamente los compuesto oxidados. Ejemplos de estos compuestos son el glutatión, ácido ascórbico (conocido como vitamina C), el ácido úrico y el α -tocoferol (vitamina E). Entre los ejemplos de antioxidantes enzimáticos, tenemos la

súper-óxido dismutasa, la familia de las peroxidasas, entre otras. Investigaciones recientes indican que el cuerpo humano produce este tipo de defensas de una forma más acentuada en la juventud y, que su acción va decayendo con el paso del tiempo. (Mathews, C. 1998).

Por lo tanto un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Estos son agentes reductores que terminan estas reacciones quitando intermedios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos, por lo que usualmente detienen en seco las reacciones en cadena de los radicales libres. De esta manera protegen a otros compuestos corporales. Algunos antioxidantes pueden atrapar los iones metálicos necesarios para catalizar la formación de los oxidantes reactivos. Otros antioxidantes pueden reparar el daño de la oxidación de biomoléculas o pueden influir sobre las enzimas que catalizan los mecanismos de reparación. (Skoog, D. A., 2001).

Los antioxidantes se encuentran contenidos en ajo, arroz integral, café, coliflor, brócoli, jengibre, perejil, cebolla, cítricos, sémola, tomates, aceite de semilla de la vid, té, romero, entre otras muchas sustancias. También son parte importante constituyente de la leche materna. (Skoog, D. A., 2001).

Ahora no hay que olvidar que estos hechos son muchas veces de conocimiento público y, aunque no parezca crean una opinión, un consenso sobre lo que es deseable, apetecible, dando lugar a una tendencia en el consumidor. Por lo tanto estos conocimientos crearán nuevas pautas y dictarán al consumidor sobre que producto es más deseable, más atractivo, nutritivo o beneficioso para la salud. Por estas razones existe un gran interés en la investigación, desarrollo y

comercialización de productos con propiedades antioxidantes, tanto por el hecho comercial como farmacológico.

Dentro de las sustancias antioxidantes, los carotenoides son los que han recibido mayor atención; debido a su versatilidad, variedad y, su innegable efecto sobre la salud, por el hecho de que la mayoría de estudios comprueban su capacidad antioxidante, su forma de extracción no es compleja y, desde 1990 ya se ha estandarizado la forma de sintetizarlos, no solo a escala de laboratorio, si no lo suficiente como para suplir una demanda de 500 toneladas anuales. (Sánchez, A. 1999).

1.4.5 Uso de los carotenoides en medicina

“Los animales no pueden sintetizar carotenoides aunque si metabolizarlos a vitamina A (retinol)”(Mosquera, 2005).Por esto los carotenoides únicamente se incorporan al organismo a través de la dieta, siendo un alimento esencial. La carencia de esta vitamina es un problema a nivel mundial, sobre todo en la población infantil, por esto hay líneas de investigación en el que se busca suplementar estas deficiencias con β - caroteno empleando modelos de liposomas. (Mosquera, 2005).

Por años se han usado el β - caroteno y la cantaxantina para el tratamiento de enfermedades por fotosensibilidad. Adicionalmente hay evidencia de que los carotenoides aumentan la respuesta inmune. (Shmidt, 1997).

Recientemente se han descubierto nuevas aplicaciones farmacológicas de los carotenoides; y estas han sido objeto de numerosos estudios; esto se debe su

capacidad de prevenir enfermedades degenerativas como el cáncer, arteriosclerosis, cataratas, degeneración macular, envejecimiento prematuro, entre otras. Esto es debido a sus propiedades antioxidantes: estos se unen al sistema primario con los tocoferoles y vitamina C dando lugar a un ciclo regenerativo que aumenta sinérgicamente la capacidad antioxidante, además de otras funciones relacionadas a la protección de membranas celulares. (Shmidt, 1997).

En los últimos años varios estudios epidemiológicos han demostrado que existe una proporción inversa entre el consumo de alimentos ricos en carotenoides y una elevada concentración de los mismos en el tejido adiposo con el riesgo de sufrir un infarto del miocardio. (Kabagame, 2005).

De ensayos clínicos realizados, en los que se analizó la posibilidad de usar β -caroteno como fármaco, se observó que no existe correlación entre la suplementación y el desarrollo del proceso degenerativo, la conclusión más extendida fue que no existen beneficios ni riesgos. Las estrategias para utilizar β -caroteno como protector in vivo no está avalada aún por los ensayos clínicos en las condiciones estudiadas. Una de las conclusiones obtenidas en estas investigaciones es que quizás la dosis sea el factor clave a controlar en futuros estudios para obtener un resultado positivo. Por esta razón muchos estudios se han enfocado en el efecto de los carotenoides añadidos a través de la dieta y, es una tendencia muy extendida y variada; pero se ha dejado de hacer estudios de otros tipos como los mencionados anteriormente, por lo que todavía no existe una manera de utilizar carotenoides como fármacos In vivo. (Greeberg, E.R.1994).

1.5 Preguntas de investigación

¿Son los pétalos de *Senna Multiglandulosa* una fuente representativa de Carotenoides?

¿Pueden los extractos de los pétalos de *Senna Multiglandulosa* dar lugar a una actividad antioxidante marcada frente al reactivo D.P.P.H(2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo, D-9132)?

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

- Ing. Mariela Vera, Directora del proyecto
- Jaime F. Gia, Director del proyecto.
- Dra. Blanca Naranjo, Docente colaborador (ESPE).
- Ing. Pedro Romero Saker, Docente colaborador (ESPE).
- David Andrés Cornejo Ojeda, Estudiante tesista.
- Escuela Politécnica del Ejército.

2.2 Zona de estudio

El proyecto de graduación se realizó en las instalaciones de los laboratorios de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército, localizados en Sangolquí, provincia de Pichincha.

2.3 Periodo de tiempo de investigación

El proyecto de graduación arranco en el mes de Abril del 2011. La parte experimental, que comprende la elaboración de los extractos, la cuantificación del contenido de carotenoides en los mismos; y la determinación de su potencial antioxidante, terminó en el mes de septiembre 2011. En síntesis la investigación se desarrolló durante 7 meses, desde Abril del 2011 hasta Septiembre del 2011.

2.4 Diseño

Con el fin de evaluar la eficiencia de los cuatro métodos de extracción propuestos se realizaron cinco repeticiones de cada método, dando un total de veinte muestras.

2.5 Instrumentos utilizados

2.5.1 Equipos

- Cámara digital.
- Balanza analítica.
- Balanza.
- Cámara de vidrio para Cromatografía.
- Cámara de visualización de luz ultravioleta UVP.
- Lámpara de luz ultravioleta UVP (254-365nm).
- Pipetas EPPENDORF.
- Micropipetas EPPENDORF.
- Hot Plate con agitador magnético.

- Refrigerante a reflujo.
- Soporte y aro metálico.
- Pinzas.
- Balones de 50, 100ml.
- Columnas de plástico de 15cm.
- Jeringuillas de 10 y 20ml
- Matriz de sílica gel para cromatografía.
- Cámara de vidrio para cromatografía.
- Capilares.
- Rotavapor.
- Equipo HPLC.
- Columna C18 para HPLC.
- Detector HP 1050 serie g1303A para HPLC.
- Espectrofotómetro.
- Software para HPLC: Procesador ACD/NMR.
- Microfiltros.
- Viales para lectura de HPLC.
- Cuvetas para espectrofotómetro.
- Embudo.
- Tamiz.

2.5.2 Reactivos

-Éter de petróleo.

-Éter etílico

-Cloroformo.

-Isopropanol.

-Benceno.

-Hexano.

-Yodo granulado.

-Dicloro metano.

- Acetato de etilo.

-Metanol.

-Hidróxido de potasio.

-Acido ascórbico.

Tierra de diatomeas y magnesio activado (1:1).

-Radical libre DPPH (2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo, D-9132).

-Vitamina A.

-Tierras de diatomeas y magnesio activado (1:1)

2.6 Procedimientos

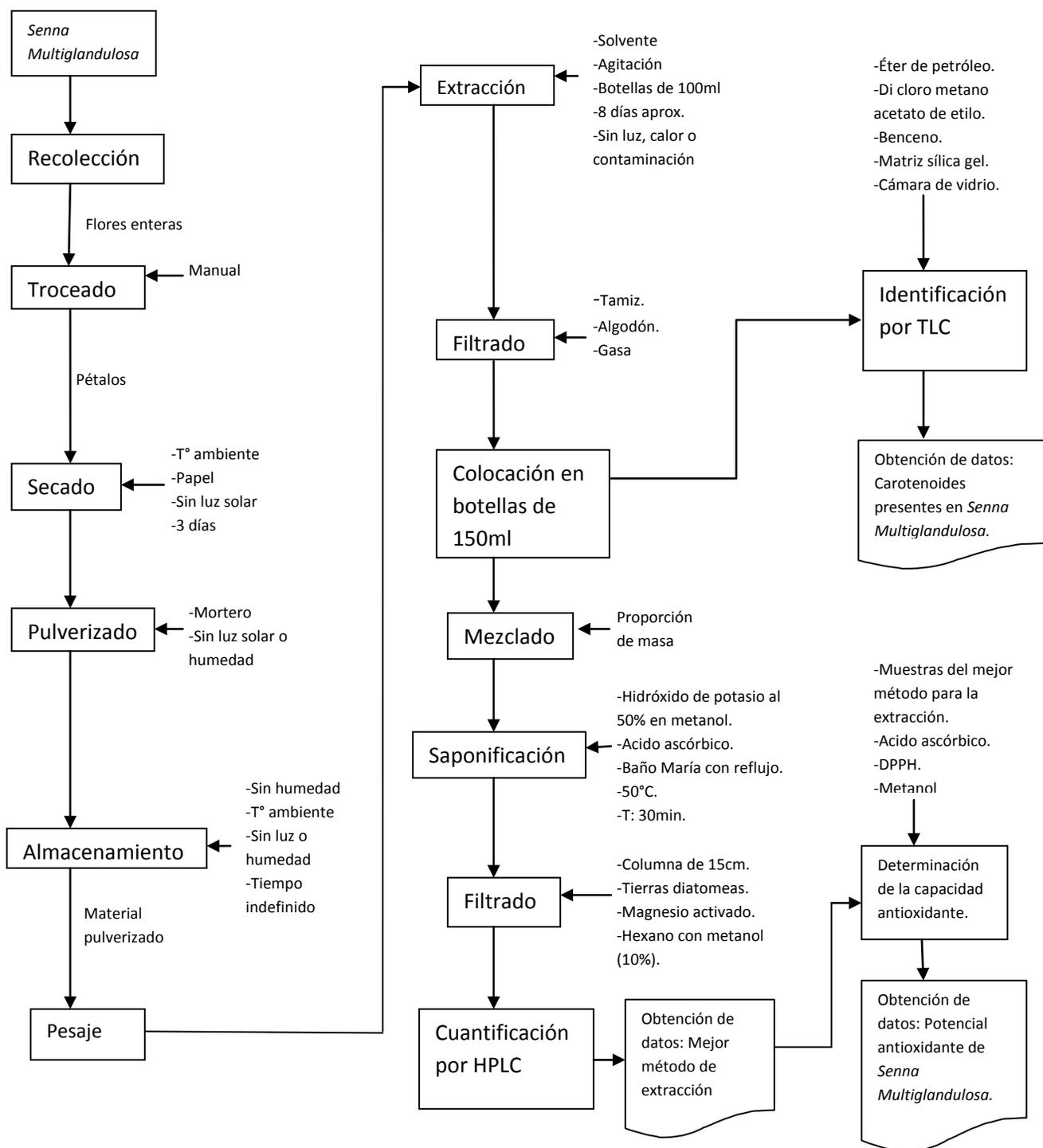


Figura 2.1.-Diagrama de bloques general de los procedimientos.

2.6.1 Recolección de material vegetal

Las muestras de Chin Chin Silvestre (*Senna Multiglandulosa*) fueron recolectadas de localidades silvestres en el sector de Sangolquí, en la urbanización Ushimana, calle Zamora; en el parque recreativo de la misma; el cual presenta las siguientes posiciones:

Elevación: 2499m sobre el nivel del mar.

Sur: 0 grados, 18 minutos, 19 segundos

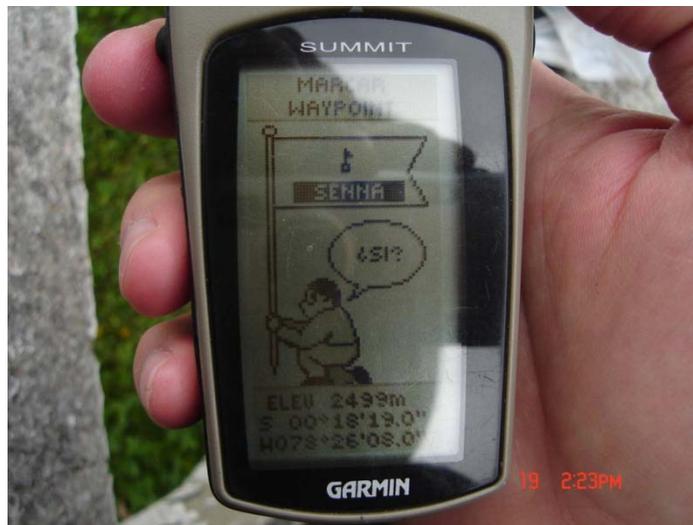


Figura 2.2.-Imagen de los datos de posicionamiento global obtenidos mediante GPS (global positioning system).

Fueron tomadas únicamente las flores de la planta y almacenadas en fundas de plástico.

El material vegetal fresco fue recolectado en épocas de lluvia; las flores a pesar de presentar coloraciones amarillas intensas son extremadamente sensibles a condiciones de sequedad; tienden a marchitarse con facilidad; y esta situación

afecta significativamente a la presencia y calidad de carotenoides en las flores; cuando esta planta ha estado mucho tiempo bajo condiciones de sequedad (soles intensos, sequía); se puede observar un amarillo menos intenso y flores con indicios de marchitamiento. (Cornejo, D. 2011).

Posteriormente las muestras fueron almacenadas en refrigeración por un período no mayor a tres días; evitando en lo posible su contacto con humedad, este es un factor que facilita la putrefacción y degradación de las muestras.

2.6.2 Troceado

El troceado de las flores fue realizado de forma manual; básicamente se separaron todos los pétalos del cálamo y demás estructuras de las flores ya que estas estructuras dan lugar a condiciones de hacinamiento al almacenarlas en refrigeración y debido a su contenido en humedad, facilitan en gran medida la putrefacción del material vegetal de interés. (Cornejo, D. 2011).

Los pétalos fueron almacenados bajo refrigeración por un período de una semana. Este proceso se repitió hasta obtener una cantidad significativa de material vegetal.

2.6.3 Secado

Teniendo en cuenta las propiedades de los carotenoides; se procedió a realizar un secado a temperatura ambiente; distribuyendo los pétalos en una superficie lo más amplia posible cubierta de papel bond (sin ningún tipo de

escritura en el área de contacto con las muestras); evitando que estén uno encima de otro o demasiado cerca entre sí. (Cornejo, D. 2011).

Posteriormente se los cubrió con papel bond doblado en el centro, para maximizar su contacto con el aire del ambiente. Debido a que se tuvo a disposición una casa de madera, el calor ambiental tendía a acumularse de cierta manera, por lo que el secado prosiguió hasta obtener pétalos de consistencia crujiente. De este modo se logró evitar la pudrición de los pétalos; se consiguió una evaporación uniforme; se evita el contacto con la luz del sol y de cualquier fuente de calor excesiva que degrade a los compuestos de interés. (Cornejo, D. 2011).

2.6.4 Pulverizado

Una vez obtenidos los pétalos secos se los guardo en recipientes de plástico con tapa rosca no translucidos. Posteriormente fueron troceados lo mejor posible mediante métodos mecánicos y molidos con un mortero. El producto obtenido fue tamizado para obtener solo el material más fino. (Cornejo, D. 2011).

2.6.5 Almacenamiento

Este material fue almacenado en recipientes de plástico de tapa rosca no translucidos, lejos de cualquier fuente de calor, o de cualquier contacto con la luz solar, a temperatura ambiente.

2.6.6 Pesaje

Para cada muestra se peso una cantidad representativa de material vegetal, que fue colocado en botellas de vidrio, color ámbar con tapa rosca. En total se obtuvieron veinte muestras (cuatro métodos de extracción a cinco repeticiones por cada método).

2.6.7 Extracción de carotenoides del material vegetal

Los carotenoides fueron extraídos con cuatro métodos diferentes.

2.6.7.1 Método No 1

Consistió en una maceración o extracción sólido-líquido con los siguientes parámetros:

Para la extracción se añadió alrededor de 80ml de éter de petróleo al material vegetal pesado y guardado en botellas de vidrio. Luego se cerró herméticamente la tapa de la botella; y se la sello con una cobertura de plástico; fueron utilizados empaques de aluminio colocados en las tapas de los recipientes para evitar su contacto con las mismas (solventes como el Clorofomo disuelven el plástico por lo que es conveniente aislar con aluminio cualquier material usado en la extracción, ya sea la tapa o parte de la tapa). Se almacenó las botellas en oscuridad y ausencia de fuentes de calor. Adicionalmente las botellas fueron agitadas periódicamente una vez al día. (Cornejo, D. 2011).

Este proceso tuvo una duración de ocho días aproximadamente, luego de lo cual se filtró el material vegetal (este proceso se detalla en la siguiente sección)

y se recuperó el solvente en botellas de 150ml. Luego este proceso de extracción se repitió 2 veces más. (Cornejo, D. 2011).

2.6.7.2 Método No 2

Se empleó el mismo esquema que el método 1, pero el solvente de extracción fue éter etílico y cloroformo (1:1). Los demás parámetros fueron mantenidos como: temperatura, agitación, relación material vegetal-solvente y tiempo de extracción.

2.6.7.3 Método No 3

Se continuó empleando el esquema propuesto para el método 1, en este caso el solvente de extracción fue cloroformo. Manteniendo todos los parámetros propuestos en el método 1.

2.6.7.4 Método No 4

Se siguió empleando el esquema propuesto para el método 1, en este caso el solvente de extracción fue únicamente Isopropanol. Sin variar los demás parámetros.

2.6.8 Filtrado

El material vegetal se separó del solvente mediante un tamiz, gasa, algodón y un embudo. Por supuesto se trató de que el material vegetal se decante y de que solo el solvente pase de una botella a la otra. El material vegetal se

recuperó en su totalidad para repetir este proceso dos veces más como se mencionó anteriormente.

2.6.9 Mezclado

Posteriormente para la determinación de la concentración se construyeron muestras compuestas hechas con las repeticiones de cada método de extracción.

| Mezcla de dos repeticiones | | | | Mezcla de tres repeticiones | | | |
|----------------------------|------|------|---------------|-----------------------------|------|------|---------------|
| Método 1 | | | | | | | |
| Repeticiones | 1 | 2 | Volumen final | 3 | 4 | 5 | Volumen final |
| Volumen tomado (ml) | 25,3 | 24,7 | 50ml | 15,5 | 16,4 | 18,1 | 50ml |
| | | | | | | | |
| Método 2 | | | | | | | |
| Repeticiones | 4 | 1 | Volumen final | 2 | 3 | 5 | Volumen final |
| Volumen tomado (ml) | 22,3 | 27,7 | 50ml | 16,6 | 17,5 | 15,9 | 50ml |
| | | | | | | | |
| Método 3 | | | | | | | |
| Repeticiones | 2 | 5 | Volumen final | 1 | 3 | 4 | Volumen final |
| Volumen tomado (ml) | 25,3 | 24,7 | 50ml | 17,1 | 16,2 | 16,7 | 50ml |
| | | | | | | | |
| Método 4 | | | | | | | |
| Repeticiones | 3 | 4 | Volumen final | 1 | 2 | 5 | Volumen final |
| Volumen tomado (ml) | 25,8 | 24,2 | 50ml | 15,7 | 16,9 | 17,4 | 50ml |

Tabla 2.1.-Detalle de la construcción de las mezclas utilizadas a partir de los extractos originales.

De este modo se obtuvieron un total de 24 datos de concentración.

2.6.10 Saponificación.-

En los extractos obtenidos existen una infinidad de compuestos que también son solubles en los solventes seleccionados; por lo tanto fue necesario un paso adicional de saponificación y filtrado de estos compuestos para removerlos. Los carotenoides no toman parte de este proceso, lo que permitió separarlos de forma adecuada. (Natalucci C.L., 1982).

Se trabajó con dos muestras de cada método.

Fueron tomados 3 gramos de muestra a los cuales se añadió 5 gramos de hidróxido de potasio, 5 ml de agua y 90 ml de metanol. Se adicionó también 2 gramos de ácido ascórbico, para evitar la oxidación de los carotenoides presentes (el ácido ascórbico funciona como antioxidante). La muestra se calentó en baño maría con reflujo a 50°C por 30 minutos. Luego de este tiempo se formaron residuos de consistencia pastosa en las paredes del recipiente, y mostraron una coloración rosada. (Natalucci C.L., 1982).

Las muestras se taparon con una película de plástico, y se dejaron reposar por aproximadamente 20 minutos en oscuridad. (Natalucci C.L., 1982).

2.6.10.1 Filtrado o remoción de compuestos saponificables.-

Por separado se prepararon (por cada muestra), columnas de plástico de 15 cm de largo por tres centímetros de ancho; rellenas de tierras de diatomeas y magnesio activado (proporción 1:1).

Del proceso anterior se tomaron 50ml de muestra, y se colocó en las columnas; se dejó reposar durante 15 minutos; para posteriormente añadir una solución de Hexano al 10% con metanol. (González, I.A., 2010).

En este punto los carotenoides en forma de solución empezaron a fluir hacia el balón de muestra. Esta solución presentó un color amarillo claro.

Las muestras así obtenidas fueron concentradas en un rota vapor, a una temperatura de 50°C, el color amarillo se impregnó en las paredes de los balones.

2.6.11 Cuantificación de los carotenoides presentes por HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia).-

Los carotenoides fueron retirados de los balones con metanol, micro filtrados; e inyectadas en recipientes herméticos para HPLC. (González, I.A., 2010).

Las lecturas fueron realizadas a 326nm.

2.6.12 Determinación de la capacidad antioxidante.-

El método que dio lugar a una mayor concentración de carotenoides fue el cloroformo; por lo tanto se utilizaron sus extractos originales para determinar el potencial antioxidante de *Senna Multiglandulosa*. (Valdivieso, J., 2010).

El extracto fue concentrado en el rota vapor hasta obtener una oleorresina; posteriormente se pesó 0,01g de la misma y se aforó a 25 ml con metanol. (Valdivieso, J., 2010).

Luego, mediante un cálculo de concentración:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2;$$

Se tomó 93,75 μL de la solución y se volvió a aforar a 25ml en metanol obteniéndose una solución a 1.5mg. L^{-1} .

Este procedimiento fue repetido para los cinco extractos de cloroformo.

Se efectuó el mismo procedimiento en la elaboración de la solución de ácido ascórbico; la cual tiene que estar a una misma concentración que la solución de interés, en este caso 1.5mg. L^{-1} .

Posteriormente se preparó una solución 0,5mM del reactivo DPPH, tomando 0,01g del reactivo y aforando a 25ml igualmente con metanol.

Se mezcló 1ml de la muestra y de la solución de DPPH en los viales del espectrofotómetro; se realizaron cinco mediciones de absorbancia a 517nm; y una correspondiente a la solución patrón de ácido ascórbico.

2.6.13 Identificación de los carotenoides presentes mediante T.L.C.

Se procedió a realizar la identificación a partir de los extractos vegetales obtenidos inicialmente.

Se utilizaron cuatro porciones de sílica gel, en cada una de las cuales se colocó una muestra de cada extracto (correspondiente a cada método de extracción).

Dos porciones de sílica gel se colocaron en una solución de di cloro metano y acetato de etilo, (proporción 4:1); y las otras dos en una solución de Éter de petróleo y benceno (proporción 1:9); ambas en una cámara de vidrio para cromatografía. (Suzuki, S. 2007).

Este proceso fue repetido al día siguiente, para comprobar los resultados.

2.7 Análisis de datos

Se realizó un cálculo de promedios, desviación estándar, y varianza de los pesos correspondientes al material vegetal seco asignado a cada método de extracción. Posteriormente se aplicó los mismos cálculos al grupo total de datos correspondientes al material vegetal seco utilizado.

En cuanto a los datos de concentración de carotenoides presentes fueron también calculados promedios, desviación estándar; y fue realizado el análisis de varianza para determinar si existen diferencias significativas entre tratamientos.

Posteriormente estos fueron sometidos a pruebas de significación con el fin de agrupar a los tratamientos en rangos que involucraron a uno o más tratamientos, posibilitando la identificación del mejor tratamiento o método de extracción en nuestro caso.

Se realizó la prueba de Duncan, para establecer comparaciones iniciales, y posteriormente la de Tukey, que fue elegida por tener un nivel mayor de rigurosidad, adecuado para nuestro caso debido a que se trata de datos obtenidos en condiciones controladas.

Se construyeron gráficos de cajas y dispersión de puntos para los datos obtenidos.

Para la determinación del poder antioxidante de los extractos de cloroformo; se realizó un cálculo de promedios, varianza y desviación estándar a partir de los porcentajes de actividad antioxidante encontrados.

El análisis de datos fue realizado en los programas EXCEL e Infostat para Windows.

3 RESULTADOS

3.1 Obtención de material vegetal seco a partir de los pétalos de *Senna Multiglandulosa*.

El procedimiento de secado dio lugar a un material de un color amarillo intenso, muy fino; al repartir el material en las botellas se obtuvieron los siguientes resultados de peso.

| | Repetición 1 | Repetición 2 | Repetición 3 | Repetición 4 | Repetición 5 |
|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Método 1 | 7,43 | 7,596 | 7,429 | 6,737 | 6,386 |
| Método 2 | 5,717 | 6,634 | 7,007 | 7,091 | 6,387 |
| Método 3 | 6,261 | 6,381 | 6,606 | 6,427 | 6,547 |
| Método 4 | 7,21 | 7,019 | 6,371 | 6,798 | 6,528 |

Tabla 3.1.- Pesos en gramos del material vegetal usado para la extracción de carotenoides mediante cuatro métodos de extracción.

Se calcularon el promedio, la desviación estándar y la varianza de estos datos de peso con el fin de tener una idea de la media de los datos y la certeza de los mismos.

| Método | Promedio | Desviación estándar | Varianza |
|----------|----------|---------------------|----------|
| Método 1 | 7,116 | 0,525 | 0,276 |
| Método 2 | 6,567 | 0,554 | 0,307 |
| Método 3 | 6,444 | 0,137 | 0,019 |
| Método 4 | 6,785 | 0,344 | 0,118 |

Tabla 3.2.- Promedios, desviación estándar y varianza de los pesos del material vegetal obtenido correspondientes a cada método de extracción.

De la misma manera tenemos los promedios, desviación total y varianza total de los pesos del material vegetal obtenido.

| Promedio total | Desviación total | Varianza total |
|----------------|------------------|----------------|
| 6,728 | 0,469 | 0,220 |

Tabla 3.3.- Promedio, desviación estándar y varianza del conjunto de pesos del material vegetal usado en el presente estudio.

3.2 Identificación de los carotenoides presentes mediante T.L.C (cromatografía en capa fina).

| | |
|-----------------------|-------------------------------------------------------|
| Pigmentos | Sistema: Éter de petróleo-Benceno (Proporción 1:9) |
| Carotenoides | Valores de RF (x100) |
| α - Caroteno | 80 |
| β - Caroteno | 74 |
| γ - Caroteno | 41 |
| ϵ - Caroteno | 84 |
| Licopeno | 13 |
| Pigmentos | Sistema: Dicloro metano y acetato de metilo (4:1) |
| Xantófilas | Valores de RF (x100) |
| Luteína | 35 |
| Zeaxantina | 24 |
| Violaxantina | 21 |
| Cryptoxantina | 75 |
| Capsantina | 16 |

Cuadro 3.1.-Valores RF estándar de carotenoides y Xantófilas en una fase móvil de éter de petróleo y benceno (proporción 1:9) para carotenoides; y di cloro metano con acetato de etilo (proporción 1:4) para xantofilas.

3.3.1 Primera replica

En la primera repetición de los ensayos de identificación se obtuvieron dos placas o cromatogramas; de las cuales solo una dio lugar a valores de RF acordes con la literatura, esta fue la correspondiente a la fase móvil éter de petróleo y benceno (1:9).

Ciertas bandas no fueron visibles pero si identificables mediante luz ultravioleta en longitud de onda larga.



Figura 3.1.- Primeros dos cromatogramas obtenidos para la identificación de carotenoides en los extractos obtenidos. A la izquierda: fase móvil compuesta de Di cloro metano y acetato de etilo (4:1); y a la derecha Éter de petróleo y Benceno (1:9).



Figura 3.2.- Primeros dos cromatogramas en la identificación de los carotenoides presentes en los extractos obtenidos. Existen zonas que no son visibles pero que son reveladas mediante luz ultravioleta de longitud larga.

Los valores de RF obtenidos así como las coloraciones apreciables a simple vista de las bandas obtenidas en la primera repetición se resumen en la tabla 3.4.

| Repetición 1 | | | | | | | |
|------------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Placa 1: Dicloro metano acetato de etilo (4:1) | | | | | | | |
| Extracto 1 | Coloración | Extracto 2 | Coloración | Extracto 3 | Coloración | Extracto 4 | Coloración |
| 100 | amarilla | 100 | Amarilla | 100 | Amarilla | 100 | Amarilla |
| | | 59 | Roja | 42 | Roja | 39 | Roja |
| | | 96 | U.V Larga | 99 | U.V Larga | 99 | U.V Larga |
| Placa 2: Éter-Benceno (1:9) | | | | | | | |
| Extracto 1 | Coloración | Extracto 2 | Coloración | Extracto 3 | Coloración | Extracto 4 | Coloración |
| 99 | Amarilla | 97 | Amarilla | 100 | Amarilla | 100 | Amarilla |
| 93 | Amarilla | 94 | U.V Larga | 94 | U.V Larga | 99 | U.V Larga |
| 81 | Amarilla | 85 | U.V Larga | 84 | U.V Larga | 87 | U.V Larga |
| 74 | Amarilla | 75 | U.V Larga | 63 | U.V Larga | 75 | U.V Larga |
| 56 | Amarilla | 45 | U.V Larga | 51 | U.V Larga | 68 | U.V Larga |
| 17 | Amarilla | 18 | U.V Larga | 43 | U.V Larga | 41 | U.V Larga |
| 10 | Amarilla | 3 | Amarilla | | | | |
| 3 | Amarilla | | | | | | |

Tabla 3.4.- Valores de RF calculados y coloración mostrada por las diferentes bandas obtenidas de la cromatografía de los cuatro extractos (correspondientes a cada método de extracción), en la primera repetición.

Según estos resultados; mayormente existen compuestos que dan lugar a un color amarillo; pero también existe muchos compuestos que no son apreciables a simple vista.

Este procedimiento fue repetido una segunda vez con el propósito de mejorar la técnica, y aumentar la cantidad de información sobre los compuestos presentes en los diferentes extractos.

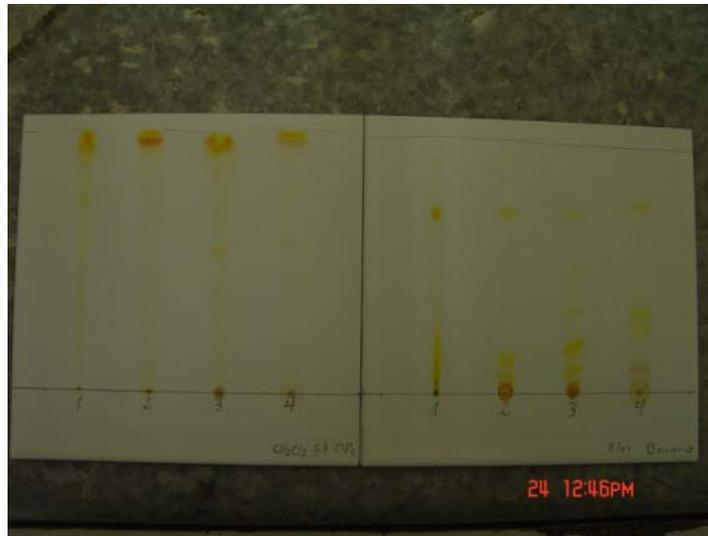


Figura 3.3.- Segunda repetición de los cromatogramas para la identificación de carotenoides en los extractos obtenidos. Se puede observar una mejoría en cuanto a la visibilidad de los compuestos y a la claridad de las bandas formadas.

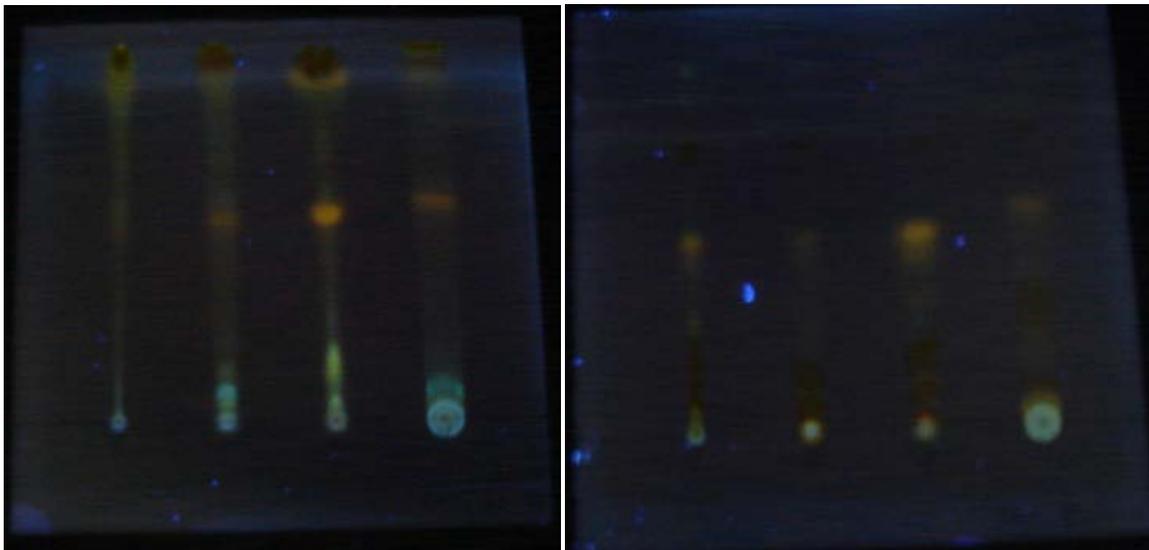


Figura 3.4.- Segunda repetición de los cromatogramas; se puede observar una mejoría en cuanto a la claridad de las bandas visibles con luz ultravioleta de longitud larga.

En la tabla 3.5 se resumen igualmente los RF de las bandas observadas y de los colores que dieron lugar las mismas en la segunda repetición de esta técnica.

| Repetición 2 | | | | | | | |
|------------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Placa 1: Dicloro metano acetato de etilo (4:1) | | | | | | | |
| Extracto 1 | Coloración | Extracto 2 | Coloración | Extracto 3 | Coloración | Extracto 4 | Coloración |
| 100 | Amarilla | 100 | Amarilla | 100 | Amarilla | 100 | Roja |
| 92 | Amarilla | 95 | U.V Larga | 96 | Amarilla | 91 | Amarilla |
| 82 | Amarilla | 92 | U.V Larga | 86 | Amarilla | 84 | Amarilla |
| 68 | U.V Larga | 87 | U.V Larga | 47 | Amarilla | 44 | U.V Larga |
| 60 | U.V Larga | 48 | U.V Larga | 38 | U.V Larga | 23 | U.V Larga |
| 44 | U.V Larga | 11 | U.V Larga | 16 | Amarilla | 11 | Amarilla |
| 29 | U.V Larga | 5 | Amarilla | 10 | Amarilla | 5 | Amarilla |
| 18 | U.V Larga | 2 | Roja | 7 | Amarilla | 2 | Amarilla |
| 12 | U.V Larga | | | 4 | Roja | | |
| 9 | Amarilla | | | | | | |
| 3 | Roja | | | | | | |
| Placa 2: Éter-Benceno (1:9) | | | | | | | |
| Extracto 1 | Coloración | Extracto 2 | Coloración | Extracto 3 | Coloración | Extracto 4 | Coloración |
| 100 | Amarilla | 100 | Amarilla | 100 | Amarilla | 100 | Amarilla |
| 92 | Roja | 95 | Roja | 90 | U.V Larga | 94 | Amarilla |
| 82 | Roja | 91 | Amarilla | 94 | Roja | 90 | U.V Larga |
| 74 | Amarilla | 86 | Roja | 91 | U.V Larga | 83 | U.V Larga |
| 60 | U.V Larga | 79 | Amarilla | 86 | Roja | 78 | U.V Larga |
| 53 | U.V Larga | 56 | U.V Larga | 81 | Amarilla | 72 | U.V Larga |
| 30 | Amarilla | 30 | U.V Larga | 77 | Roja | 63 | U.V Larga |
| 19 | Amarilla | 18 | Amarilla | 68 | Amarilla | 53 | Amarilla |
| 10 | Amarilla | | | 55 | U.V Larga | 24 | U.V Larga |
| | | | | 29 | U.V Larga | 15 | U.V Larga |
| | | | | 21 | U.V Larga | 6 | U.V Larga |
| | | | | 8 | U.V Larga | | |

Tabla 3.5.- Valores de RF calculados y coloración mostrada por las diferentes bandas obtenidas de la cromatografía de los cuatro extractos (correspondientes a cada método de extracción), en la segunda repetición. (Las bandas marcadas con luz U.V larga no fueron visibles, si no únicamente mediante luz ultravioleta de longitud larga).

De igual manera se puede observar como la mayoría de compuestos presentes dieron lugar a coloraciones amarillentas y a bandas visibles únicamente mediante luz ultravioleta, pero en este caso se encontraron bandas de una coloración rojiza, que prácticamente no migraron con la fase móvil; y que se encontraron en una proporción relativamente baja con respecto a las otras bandas.

3.3.2 Segunda réplica

Se procedió a realizar una segunda sesión de identificación, utilizando para este caso únicamente el solvente Éter de petróleo- Benceno (1:9), ya que este probó ser el más eficaz para la movilización y separación de compuestos presente en los extractos; en el siguiente cuadro se resumen los valores de RF y las coloraciones a que dieron lugar las bandas en este caso.

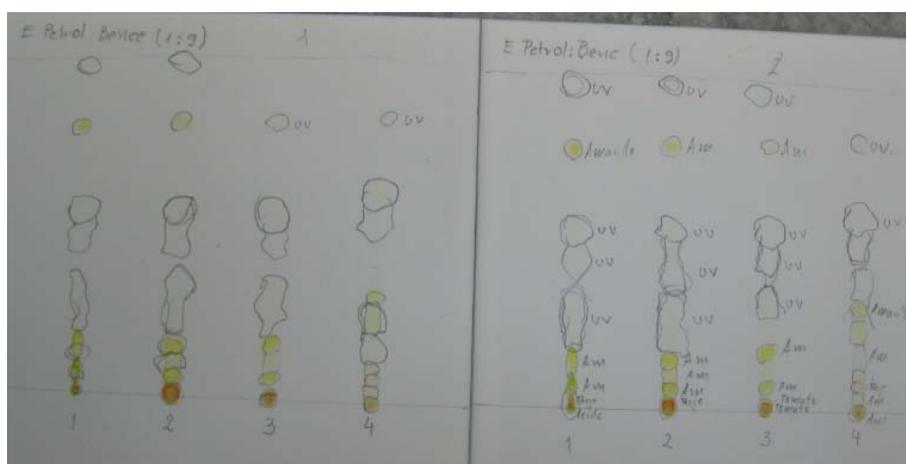


Figura 3.5.- Segunda sesión de identificación de los carotenoides presentes en los extractos obtenidos; en este caso solamente se utilizó éter de petróleo y benceno (1.9). Se puede ver que existen bandas de color rojo que prácticamente no migraron en los cromatogramas; y bandas de compuestos no visibles.

En la tabla 3.6 se resumen igualmente los valores de RF de las bandas observadas y de los colores que dieron lugar las mismas.

| Placa 1:Éter-Benceno (1:9) | | | | | | | |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Extracto 1 | Coloración | Extracto 2 | Coloración | Extracto 3 | Coloración | Extracto 4 | Coloración |
| 100 | Amarilla | 100 | Roja | 100 | Roja | 100 | Amarilla |
| 97 | Roja | 94 | Amarilla | 98 | Roja | 96 | Amarilla |
| 93 | Amarilla | 90 | Amarilla | 94 | Amarilla | 93 | Roja |
| 86 | Amarilla | 86 | Amarilla | 89 | Amarilla | 89 | Amarilla |
| 72 | U.V Larga | 71 | U.V Larga | 84 | Amarilla | 85 | Amarilla |
| 52 | U.V Larga | 53 | U.V Larga | 71 | U.V Larga | 75 | Amarilla |
| 46 | U.V Larga | 47 | U.V Larga | 54 | U.V Larga | 70 | Amarilla |
| 20 | Amarilla | 27 | Amarilla | 47 | U.V Larga | 48 | Amarilla |
| 3 | U.V Larga | 1 | U.V Larga | 19 | Amarilla | 39 | U.V Larga |
| | | | | | | 17 | U.V Larga |
| Placa 2:Éter-Benceno (1:9) | | | | | | | |
| Extracto 1 | Coloración | Extracto 2 | Coloración | Extracto 3 | Coloración | Extracto 4 | Coloración |
| 100 | Amarilla | 100 | Roja | 100 | Roja | 100 | Amarilla |
| 97 | Roja | 94 | Amarilla | 97 | Roja | 96 | Amarilla |
| 93 | Amarilla | 90 | Amarilla | 93 | Amarilla | 93 | Roja |
| 86 | Amarilla | 86 | Amarilla | 88 | Amarilla | 89 | Amarilla |
| 72 | U.V Larga | 71 | U.V Larga | 83 | Amarilla | 83 | Amarilla |
| 57 | U.V Larga | 53 | U.V Larga | 69 | U.V Larga | 76 | Amarilla |
| 48 | U.V Larga | 46 | U.V Larga | 54 | U.V Larga | 72 | Amarilla |
| 23 | Amarilla | 19 | Amarilla | 47 | U.V Larga | 70 | Amarilla |
| 4 | U.V Larga | 3 | U.V Larga | 27 | Amarilla | 62 | U.V Larga |
| | | | | 4 | U.V Larga | 49 | U.V Larga |
| | | | | | | 40 | U.V Larga |
| | | | | | | 16 | U.V Larga |

Tabla 3.6.- Valores de RF calculados y coloración mostrada por las diferentes bandas obtenidas de la cromatografía de los cuatro extractos (correspondientes a cada método de extracción), en la réplica de los cromatogramas. (Las bandas marcadas con luz U.V larga no fueron visibles, si no únicamente mediante luz ultravioleta de longitud larga).

De la misma forma se observa una mayoría de compuestos que dan lugar a una coloración amarillenta y de aquellos que solo son apreciables mediante luz

ultravioleta de longitud de onda larga. Sin embargo es recurrente el apareamiento de compuestos que dan lugar a una coloración rojiza en una proporción baja.

Para finalizar se hizo una comparación de los valores de RF obtenidos en el primer ensayo de identificación con valores de literatura.

En el siguiente cuadro se presenta la comparación de los valores de RF obtenidos para el primer extracto.

| Repetición 1 | | Repetición 2 | | Carotenoides Identificados | |
|--------------|------------|--------------|------------|----------------------------|---------------|
| Placa 1 | Placa 2 | Placa 1 | Placa 2 | | |
| Extracto 1 | Extracto 1 | Extracto 1 | Extracto 1 | | |
| 100 | 99 | 100 | 100 | | |
| | 93 | 92 | 92 | | |
| | 81 | 82 | 82 | α -Caroteno | |
| | 74 | 68 | 74 | β -Caroteno | Cryptoxantina |
| | 56 | 60 | 60 | | |
| | 17 | 44 | 53 | γ -Caroteno | |
| | 10 | 29 | 30 | Zeaxantina | |
| | 3 | 18 | 19 | Capsantina | |
| | | 12 | 10 | Licopeno | |
| | | 9 | | | |
| | | 3 | | | |

Tabla 3.7.- Identificación inicial de los carotenoides presentes en el extracto 1.

Como se puede apreciar la identificación inicial de los carotenoides presentes en el primer extracto; hay presencia tanto de carotenoides como de xantofilas; y adicionalmente se nota la presencia de licopeno en las muestras, el cual hace un aporte de bandas de coloración rojiza.

A continuación se presentala comparación de los valores de RF obtenidos para el segundo extracto.

| Repetición 1 | | Repetición 2 | | Carotenoides Identificados | |
|--------------|------------|--------------|------------|----------------------------|---------------|
| Placa 1 | Placa 2 | Placa 1 | Placa 2 | | |
| Extracto 2 | Extracto 2 | Extracto 2 | Extracto 2 | | |
| 100 | 97 | 100 | 100 | | |
| 59 | 94 | 95 | 95 | | |
| 96 | 85 | 92 | 91 | ε-Caroteno | |
| | 75 | 87 | 86 | ε-Caroteno | Cryptoxantina |
| | 45 | 48 | 79 | γ-Caroteno | |
| | 18 | 11 | 56 | Lycopeno | |
| | 3 | 5 | 30 | | |
| | | 2 | 18 | Capsantina | |

Tabla 3.8.- Identificación inicial de los carotenoides presentes en el extracto 2.

Como puede apreciarse en este caso encontramos la presencia deε-Caroteno dentro de las bandas; y la de nuevo se obtuvieron carotenoides y xantofilas dentro de las bandas. Una vez más se encontró licopeno dentro del segundo extracto.

A continuación se presentala comparación de los valores de RF obtenidos para el tercer extracto.

| Repetición 1 | | Repetición 2 | | Carotenoides Identificados | |
|--------------|------------|--------------|------------|----------------------------|--------------------|
| Placa 1 | Placa 2 | Placa 1 | Placa 2 | | |
| Extracto 3 | Extracto 3 | Extracto 3 | Extracto 3 | | |
| 100 | 100 | 100 | 100 | | |
| 42 | 94 | 96 | 90 | | |
| 99 | 84 | 86 | 94 | ϵ -Caroteno | |
| | 63 | 47 | 91 | γ -Caroteno | |
| | 51 | 38 | 86 | Luteína | |
| | 43 | 16 | 81 | α -Caroteno | γ -Caroteno |
| | | 10 | 77 | Cryptoxantina | |
| | | 7 | 68 | | |
| | | 4 | 55 | | |
| | | | 29 | | |
| | | | 21 | Violaxantina | |
| | | | 8 | | |

Tabla 3.9.- Identificación inicial de los carotenoides presentes en el extracto 3.

En este caso se determinó la presencia de nuevas xantofilas las cuales no estuvieron presentes en los anteriores extractos. Tampoco estuvo presente licopeno.

A continuación se presentala comparación de los valores de RF obtenidos para el cuarto extracto.

| Repetición 1 | | Repetición 2 | | Carotenoides Identificados | | |
|--------------|------------|--------------|------------|----------------------------|------------|---------------|
| Placa 1 | Placa 2 | Placa 1 | Placa 2 | | | |
| Extracto 4 | Extracto 4 | Extracto 4 | Extracto 4 | | | |
| 100 | 100 | 100 | 100 | | | |
| 39 | 99 | 91 | 94 | | | |
| 99 | 87 | 84 | 90 | ε-Caroteno | | |
| | 75 | 44 | 83 | β-Caroteno | γ-Caroteno | Cryptoxantina |
| | 68 | 23 | 78 | β-Caroteno | Zeaxantina | |
| | 41 | 11 | 72 | β-Caroteno | γ-Caroteno | Cryptoxantina |
| | | 5 | 63 | | | |
| | | 2 | 53 | | | |
| | | | 24 | Zeaxantina | | |
| | | | 15 | Lycopeno | Capsantina | |
| | | | 6 | | | |

Tabla 3.10.- Identificación inicial de los carotenoides presentes en el extracto 4.

En este caso se vuelve a constatar la presencia de varios carotenoides; el licopeno entre ellos; y las xantofilas encontradas en los anteriores extractos.

La identificación fue confirmada mediante los datos obtenidos en la segunda repetición del ensayo.

A continuación se detalla los carotenoides cuya presencia fue confirmada en el primer extracto.

| Placa 1 | Placa 2 | Carotenoides Confirmados |
|------------|------------|--------------------------|
| Extracto 1 | Extracto 1 | |
| 100 | 100 | |
| 97 | 97 | |
| 93 | 93 | |
| 86 | 86 | ϵ -Caroteno |
| 72 | 72 | β -Caroteno |
| 52 | 57 | |
| 46 | 48 | γ -Caroteno |
| 20 | 23 | |
| 3 | 4 | |

Tabla 3.11.- Confirmación de los carotenoides presentes en el extracto 1.

No se encontró la presencia de licopeno en el primer extracto; pero se confirmó la presencia de ϵ -Caroteno, β -Caroteno y γ -Caroteno.

A continuación se detalla los carotenoides cuya presencia fue confirmada en el segundo extracto.

| Placa 1 | Placa 2 | Carotenoides Confirmados |
|------------|------------|--------------------------|
| Extracto 2 | Extracto 2 | |
| 100 | 100 | |
| 94 | 94 | |
| 90 | 90 | |
| 86 | 86 | ϵ -Caroteno |
| 71 | 71 | β -Caroteno |
| 53 | 53 | |
| 47 | 46 | γ -Caroteno |
| 27 | 19 | Licopeno |
| 1 | 3 | |

Tabla 3.12.- Confirmación de los carotenoides presentes en el extracto 2.

En este extracto si se confirma la presencia de Licopeno; y de los carotenoides encontrados en el primer extracto: ϵ -Caroteno, β -Caroteno y γ -Caroteno en el primer extracto.

| Placa 1 | Placa 2 | Carotenoides Confirmados |
|------------|------------|--------------------------|
| Extracto 3 | Extracto 3 | |
| 100 | 100 | |
| 98 | 97 | |
| 94 | 93 | |
| 89 | 88 | ϵ -Caroteno |
| 84 | 83 | β -Caroteno |
| 71 | 69 | |
| 54 | 54 | |
| 47 | 47 | γ -Caroteno |
| 19 | 27 | Licopeno |
| | 4 | |

Tabla 3.13.- Confirmación de los carotenoides presentes en el extracto 3.

De nuevo se confirma la presencia de Licopeno; y de los carotenoides encontrados en el primer y en el segundo extracto: ϵ -Caroteno, β -Caroteno y γ -Caroteno en el tercer extracto.

| Placa 1 | Placa 2 | Carotenoides Confirmados |
|------------|------------|--------------------------|
| Extracto 4 | Extracto 4 | |
| 100 | 100 | |
| 96 | 96 | |
| 93 | 93 | |
| 89 | 89 | ϵ -Caroteno |
| 85 | 83 | ϵ -Caroteno |
| 75 | 76 | β -Caroteno |
| 70 | 72 | |
| 48 | 70 | |
| 39 | 62 | |
| 17 | 49 | γ -Caroteno |
| | 40 | γ -Caroteno |
| | 16 | Licopeno |

Tabla 3.14.- Confirmación de los carotenoides presentes en el extracto 4.

Finalmente se confirma la presencia de Licopeno; y de los carotenoides encontrados en el primero, segundo, y tercer extracto: ϵ -Caroteno, β -Caroteno y γ -Caroteno en el cuarto extracto.

Según estos resultados, los extractos obtenidos contienen una variedad de carotenoides y xantofilas; fueron identificados de forma inicial los siguientes: α -Caroteno, β -Caroteno, γ -Caroteno, ϵ -Caroteno y Licopeno.

Dentro de las Xantofilas identificadas inicialmente tenemos: Cryptoxantina; Zeaxantina, Capsantina, Luteína y Violaxantina.

Los carotenoides cuya presencia fue confirmada en los extractos obtenidos fueron: ϵ -Caroteno, β -Caroteno, γ -Caroteno, Licopeno.

3.3 Cuantificación de los carotinoides presentes por HPLC.-

Como se mencionó anteriormente; se obtuvieron dos mezclas de cada método de extracción; obteniéndose un total de ocho muestras para realizar los análisis por HPLC.

En la siguiente tabla se resumen los parámetros obtenidos para las ocho muestras obtenidas.

| Numero de muestra | Método | Tiempo de retención(min) | Altura(mm) | Área(mm ²) |
|-------------------|--------------------------------|--------------------------|------------|------------------------|
| Muestra 1 | Éter de petróleo | 0,657 | 10585,45 | 148245,5 |
| Muestra 2 | Éter de petróleo | 0,653 | 14055,801 | 196258 |
| Muestra 1 | Éter etílico y Cloroformo(1:1) | 0,603 | 50902,77 | 682601 |
| Muestra 2 | Éter etílico y Cloroformo(1:1) | 0,723 | 12412,697 | 344366 |
| Muestra 1 | Cloroformo | 0,733 | 11113,481 | 305448,906 |
| Muestra 2 | Cloroformo | 0,598 | 37394,953 | 484971,906 |
| Muestra 1 | Isopropanol | 0,603 | 29229,75 | 394792,594 |
| Muestra 2 | Isopropanol | 0,623 | 3339,105 | 607230,438 |

Tabla 3.15.- Tiempo de retención de los carotenoides durante el proceso de HPLC como también altura y área de las curvas obtenidas.

Posteriormente se realizó un cálculo para la determinación de la concentración de carotenoides presentes en cada muestra, los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla. (Los resultados están expresados en unidades de β -Caroteno).

| Éter de petróleo | Éter etílico y Cloroformo(1:1) | Cloroformo | Isopropanol |
|-------------------------|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| ug de betacaroteno/100g | ug de betacaroteno/100g | ug de betacaroteno/100g | ug de betacaroteno/100g |
| 1970,04 | 8546,1 | 19083,02 | 3856,69 |
| 2014,66 | 8754,29 | 18968,02 | 3812,23 |
| 1978,44 | 8729,79 | 18713,66 | 3947,68 |
| 3360,74 | 24510,09 | 33344,61 | 3360,48 |
| 3348,56 | 24096,79 | 33456,11 | 3351,39 |
| 3396,69 | 24240,61 | 33121,48 | 3511,36 |
| Promedio: | Promedio: | Promedio: | Promedio: |
| 2678,188333 | 16479,61167 | 26114,48333 | 3639,971667 |

Tabla 3.16.-Concentración de los carotenoides presentes en los extractos expresados en ug de betacaroteno/100g de muestra.

Los resultados fueron posteriormente sometidos a un análisis de varianza o ANOVA con el propósito de detectar diferencias entre tratamientos.

En la siguiente tabla se muestran los resultados del análisis.

| Variable | N | R^2 | R^2_{Aj} | CV | |
|---------------------------------------------|---------------|-------|--------------|-------|---------|
| Beta caroteno ug/100g | 24 | 0,77 | 0,73 | 47,65 | |
| Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo) | | | | | |
| F.V | S.C | gl | CM | F | p-valor |
| Modelo | 2255010640,19 | 3 | 751670213,40 | 22,13 | <0,0001 |
| Tratamiento | 2255010640,19 | 3 | 751670213,40 | 22,13 | <0,0001 |
| Error | 679181330,23 | 20 | 33959066,51 | | |
| Total | 2934191970,43 | 23 | | | |

Tabla 3.17-Análisis de varianza o ANOVA de los datos de concentración de los cuatro métodos de extracción propuestos.

El análisis de varianza sobre este experimento, ha permitido advertir diferencias altamente significativas entre los tratamientos probados ($p < 0,001$), de un análisis visual de las medias podemos observar que el mejor método de extracción en cuanto a concentración de carotenoides es mediante el uso de cloroformo, seguido de Éter etílico y cloroformo (1:1); seguido del Isopropanol y finalmente el método menos eficiente fue el Éter de petróleo.

Estos datos fueron sometidos a pruebas de significación con el fin de agrupar a los tratamientos en rangos que involucraron a uno o más tratamientos, posibilitando la identificación del mejor tratamiento o método de extracción en nuestro caso.

Se realizó la prueba de Fisher LSD, para establecer comparaciones iniciales entre los tratamientos, estos resultados se muestran en la siguiente tabla.

| Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=7018.16901 | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------|---|---------|--------|---|---|
| Error: 33959066.5115 | | | | gl: 20 | | |
| Tratamiento | Medias | n | E.E | Rangos | | |
| 1 | 2679,69 | 6 | 2379,04 | A | | |
| 4 | 3639,97 | 6 | 2379,04 | A | | |
| 2 | 16479,61 | 6 | 2379,04 | | B | |
| 3 | 26114,48 | 6 | 2379,04 | | | C |
| Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) | | | | | | |

Tabla 3.18.-Determinación de diferencias estadísticas de los métodos de extracción mediante la prueba de Fisher LSD.

Posteriormente se realizó la prueba de Tukey, para tener mayor certeza y confirmar los resultados obtenidos, este análisis se muestra en la siguiente tabla.

| Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9416.25121 | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------|---|---------|--------|---|---|
| Error: 33959066.5115 | | | | gl: 20 | | |
| Tratamiento | Medias | n | E.E | Rangos | | |
| 1 | 2679,69 | 6 | 2379,04 | A | | |
| 4 | 3639,97 | 6 | 2379,04 | A | | |
| 2 | 16479,61 | 6 | 2379,04 | | B | |
| 3 | 26114,48 | 6 | 2379,04 | | | C |
| Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) | | | | | | |

Tabla 3.19.-Determinación de diferencias estadísticas de los métodos de extracción mediante la prueba de Tukey.

Como se puede observar en ambas pruebas tenemos que los tratamientos uno y cuatro no presentan diferencias significativas, siendo su efecto igualmente inefectivo en cuanto a la extracción de carotenoides.

A continuación se muestra el gráfico de cajas hecho a partir del análisis de los datos:

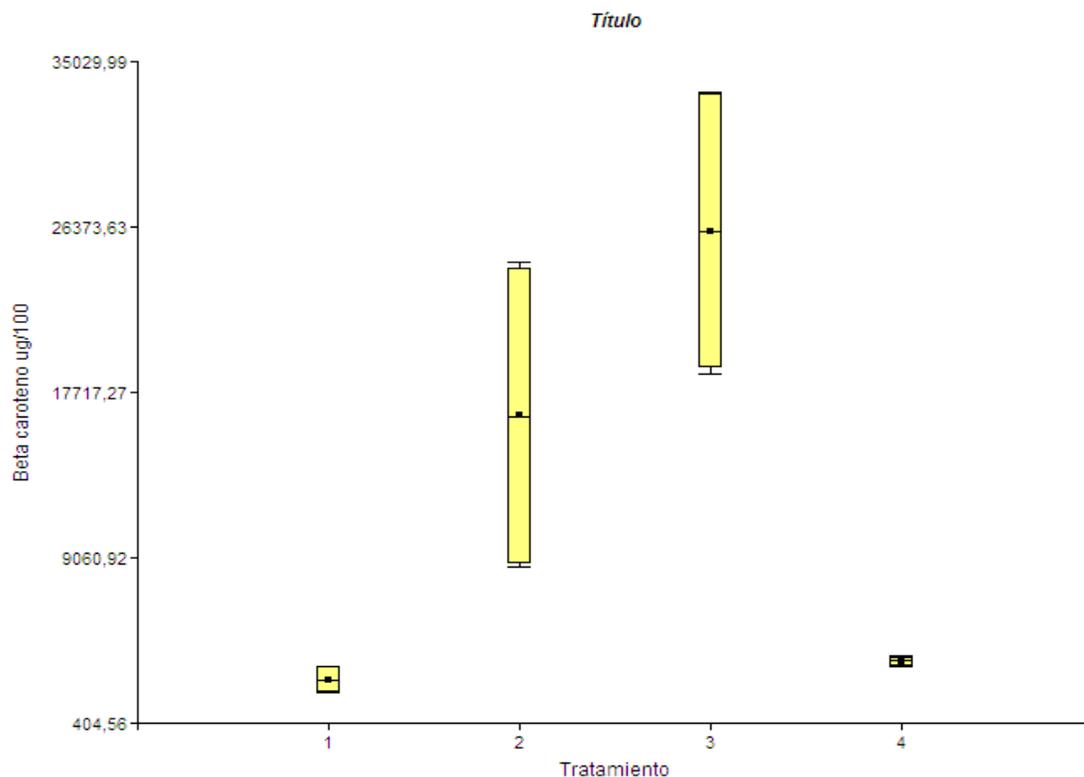


Figura 3.6.-Gráfico de cajas de los datos sometidos a análisis; se puede ver que los únicos dos tratamientos en mostrar diferencias significativas son los correspondientes al Éter etílico y Cloroformo (1:1) o tratamiento numero 2; y al Cloroformo o tratamiento número 3.

3.4 Determinación del potencial antioxidante mediante el reactivo DPPH (2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo, D-9132).

Fue usado el procedimiento descrito por Khoo et al con ciertas modificaciones; debido a que utilizamos soluciones de la misma concentración, se pudo obtener un valor del potencial antioxidante puntual mediante la siguiente ecuación:

Actividad antioxidante:

$$\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Donde A_0 es la absorbancia del control o patrón de referencia, y A_1 es la absorbancia de la muestra (solución rica en carotenoides de interés).

Los datos obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

| Muestra | Lectura hecha a | Absorbancia | Actividad antioxidante (%) |
|-----------------|-----------------|-------------|----------------------------|
| M3R1 | 517nm | 0,6 | 40,82 |
| M3R2 | 517nm | 0,467 | 54,08 |
| M3R3 | 517nm | 0,606 | 39,8 |
| M3R4 | 517nm | 0,623 | 38,78 |
| M3R5 | 517nm | 0,609 | 39,8 |
| Ácido ascórbico | 517nm | 0,022 | 100 |

Tabla 3.20.- Absorbancias de los extractos correspondientes al método de extracción con cloroformo; y su respectivo potencial antioxidante junto con la medida del ácido ascórbico (sustancia patrón).

Puede observarse que la muestra que dio lugar a un mayor potencial antioxidante dentro del método de extracción por cloroformo es la muestra M3R2, y la menor M3R4.

El valor promedio de las absorbancias es 0,581; y el promedio de los porcentajes de actividad antioxidante es 42,656%.

4 DISCUSIÓN

El presente estudio resultó novedoso debido a que no existen investigaciones sobre el contenido de carotenoides presentes en la especie *Senna Multiglandulosa*, y más aún la tendencia de investigar nuevas especies como fuentes de carotenoides no está siendo cabalmente explorada, por el contrario hay una sobre explotación de aquellas conocidas. La demanda actual de carotenoides es tal, que se ha venido estandarizando procesos de síntesis de los mismos a escala industrial, como es el caso del β -Caroteno, en lugar de buscar nuevas fuentes. (Pfander, 1996).

Por supuesto este fenómeno no es ajeno en líneas actuales de investigación; existen estudios de alteración genética de ciertas variedades para que estas den lugar a una producción más abundante de carotenoides, sobre todo en trabajos conjuntos para el tratamiento del cáncer; como es el caso de *Lotus Japonicus*; o *Catharanthus Roseus*; especies que han venido recibiendo una atención desmesurada desde hace décadas. (Suzuki, S. 2007).

En la extracción de carotenoides fueron elegidos solventes teniendo en cuenta que tengan una polaridad intermedia; pero que presenten diferencias entre ellos así fue propuesta una solución lo más universal posible debido a que se trataba de una especie desconocida. En nuestro caso, el Cloroformo calificado como el más apolar del grupo; y siendo un solvente no utilizado de forma extendida para la extracción de carotenoides, dio lugar a la mayor concentración de los mismos al término del proceso de extracción. La segunda mezcla que dio lugar a una mayor concentración de carotenoides fue Éter etílico y cloroformo (1:1); aunque es muy posible que aventajara de cierta manera a otros solventes debido a que igualmente contenía Cloroformo. La diferencia en concentración es

realmente notable, siendo el cloroformo mucho más eficiente que los otros solventes.

En el proceso de extracción el cloroformo al tener un peso molecular menor al de los carotenoides de interés logró envolverlos; y tener contacto con áreas de las moléculas que posibilitarían interacciones de Van-der Waals facilitando la retención de los mismos. Los átomos de cloro en la molécula tienen una polaridad ligeramente negativa, lo que permite su atracción a los extremos de hidrógeno de los carotenoides de interés, que tienen una carga ligeramente positiva (terminaciones de hidrógeno).

Por su puesto el hecho de que lograra extraer mejor que los otros solventes, puede deberse a que estos contienen mayor cantidad de grupos oxigenados en su molécula y tiendan a formar mayor número de puentes de hidrógeno con las moléculas de agua presentes, uniéndose a las mismas y a otras sustancias hidrofílicas de forma preferencial, dejando de lado (en cierta medida) a los carotenoides de interés. Por el contrario el cloroformo es una molécula más compacta, de menor peso molecular, bastante estable y va a tener un comportamiento apolar debido a la falta de flexibilidad espacial de su molécula, así al entrar en contacto con los carotenoides, los extrajo con un mejor rendimiento.

Debido a esto el presente estudio tiene un aporte significativo, en cuanto a que estudia una especie desconocida y evalúa algunos solventes que no han sido mayormente usados en otras investigaciones. Es también interesante notar que el solvente del que se esperaba diera lugar a la mayor concentración de carotenoides resultara ser el tercero menos eficiente: el Éter de petróleo; que es un solvente ampliamente utilizado en la extracción de compuestos vegetales. (Martinez, M, A. 2003).

Ahora por supuesto que como mayormente las investigaciones se centran en el desarrollo de productos enriquecidos con carotenoides que sean aptos para el consumo humano; existe la necesidad de buscar solventes no tóxicos, de fácil remoción y de bajo costo; por lo que esta puede ser una razón de que la mayoría de investigaciones eviten el uso de cloroformo. (Valdivieso, J. 2010).

En promedio la concentración obtenida por el mejor método de extracción que en nuestro caso fue es cloroformo es 26114,4833 ug/100 g; mientras que en un estudio de transformación genética de *Lotus Japonicus* se obtuvieron concentraciones de 3660,0 ug/100 g de muestra en el proceso de extracción; los cual es un indicio de que la concentración obtenida es razonable y que incluso está por encima de los valores obtenidos en este otro estudio. Además en este estudio también fue realizado un procedimiento adicional de saponificación antes de realizar la determinación de la concentración de carotenoides por HPLC; debido a que la presencia de sustancias lipofílicas; y a carotenoides esterificados los cuales causan alteraciones en los tiempos de retención y complican de muchas otras formas la determinación por HPLC por lo sensible del método, esto corrobora los métodos utilizados en la presente. (Suzuki, S. 2007).

La identificación mediante TLC reveló datos interesantes, las bandas obtenidas mostraron coloraciones amarillas, pero también estuvieron presentes ciertas bandas de colores rojizos, por lo que como era de esperarse existe una mayoría de compuestos de color amarillo como zeaxantina, pero también hubo presencia de licopeno, α -caroteno, β -caroteno, ϵ -caroteno y γ -caroteno que indudablemente da lugar a las tonalidades rojizas dentro de las bandas encontradas y aunque no son compuesto mayormente encontrados su presencia es indiscutible.

Por supuesto podemos mencionar que el Licopeno y otros carotenoides son compuestos necesarios para atraer polinizadores a las flores, o que se trata de un componente esencial en el proceso de absorción de luz; pero lo interesante es que esta especie resultó ser una fuente de los mismos, aunque no se revelen a simple vista ya que presenta tonalidades únicamente amarillas en sus flores.

Ahora bien existen una infinidad de carotenoides tanto identificados como desconocidos; en el presente trabajo se realizó la identificación con los valores de RF reportados en literatura para los compuestos más conocidos y representativos, y cabe destacar que se obtuvieron varias bandas para cada extracto, posiblemente esta especie tenga carotenoides desconocidos hasta la fecha y existe la posibilidad de que existan otros compuestos que den lugar a una coloración rojiza; así en el estudio mencionado de transformación genética de *Lotus Japonicus*; obtuvieron bandas únicamente de color amarillo dentro de sus resultados de TLC en las flores de la variedad salvaje, pero lograron obtener bandas de colores rojizos dentro de sus variedades transformadas, indicando la presencia de carotenoides desconocidos para esta especie hasta la fecha. (Suzuki, S. 2007).

Este hecho corrobora que existe una gran mayoría de compuestos amarillos en flores que muestran este color; pero que no necesariamente existe presencia de otros colores a simple vista ni tampoco dentro de la composición final de las flores de variedad salvaje, lo que implica que la especie *Senna Multiglandulosa* (escogida en el presente estudio) podría tener muchas claves genéticas sobre la expresión de colores rojizos en las flores, y constituye un potencial aún no explotado.

Los resultados de este tipo de estudios abren la posibilidad para continuar con investigaciones sobre *Senna Multiglandulosa*; ya que es una planta que está dotada naturalmente con la capacidad de producir licopeno y posiblemente otros carotenoides que dan lugar a una coloración rojiza; siendo un candidato ideal para estudios de biología molecular, transformación genética, estudios de expresión y más. Básicamente el interés que existe se basa en la posibilidad de crear plantas con colores nuevos en plantas ornamentales y conocer los mecanismos de expresión de los genes en torno a la coloración de las plantas, debido a las ventajas que ofrecen ciertas especies como la presencia de carotenoides en las plantas (que son indicio innegable de expresión genética); altas tasas de transformación, potencial para la sobreexpresión de genes externos, ciclos cortos y tamaños adecuados; a esto la especie estudiada cuenta además con los mecanismos genéticos de expresión de colores rojizos; aunque no sean visibles a simple vista. (Suzuki, S. 2007).

Los carotenoides de interés en el presente estudio son sustancias apolares; por lo tanto su efectividad no necesariamente sufrió ninguna disminución al realizarse las pruebas en un medio de metanol; este solvente a pesar de ser ciertamente hidrofílico tiene la capacidad de solubilizar efectivamente una gran variedad de compuestos orgánicos, de la misma manera es un entorno adecuado para que pueda interactuar con el reactivo DPPH.

Se formaron soluciones adecuadamente; y se pudo apreciar un cambio en la coloración durante el proceso. Decker, E.A (2005), menciona en su investigación que uno de los principales factores que afectan el desempeño de cualquier compuesto antioxidante es su comportamiento frente a al agua y los lípidos de su entorno. “Los antioxidantes hidrofílicos son a menudo menos eficaces en emulsiones aceite-agua que los antioxidante liposolubles, mientras que los antioxidantes liposolubles son menos eficaces en los sistemas cuyo componente

principal es hidrofílico”. Esta diferencia en cuanto a su efectividad se debe a su ubicación física en los dos sistemas. Los antioxidantes polares son más eficaces en la mayoría de aceites, ya que pueden acumularse en la interface aire-aceite; por el contrario antioxidantes no polares son más efectivos en las emulsiones, que se mantienen en las gotas de aceite y pueden acumularse en la interface aceite-agua. Los hidroperóxidos (como ejemplo de sustancia oxidante, formadora de radicales libres) se producen en la superficie de interacción aceite –agua. Los agentes pro-oxidantes (sustancias propensas a convertirse en sustancias oxidantes como metales de transición) se producen en la fase acuosa.(Decker, E.A, 2005).

Por otro lado, en las emulsiones con antioxidantes polares la fase acuosa perdería contacto eventualmente con la fase no acuosa. Los antioxidantes liposolubles tienen un mejor efecto en aceites, en cambio, los polares son más eficaces en alimentos con un alto contenido en agua. (Decker, E.A, 2005).

Los extractos de Cloroformo tuvieron un efecto antioxidante máximo de 54,08%, en este caso no fue realizada una curva de calibración con el fin de obtener valores puntuales en torno al potencial antioxidante de estos extractos.

Por su puesto que el efecto antioxidante no es debido a un solo compuesto; en nuestro caso no fue realizado ninguna clase de procedimiento adicional de separación o purificación de carotenoides; sin embargo la identificación reveló la presencia de muchos carotenoides de potencial antioxidante conocido, como el β -Caroteno y el Licopeno, por lo que se puede afirmar que una combinación de compuestos presentes en el extracto dieron lugar a este efecto antioxidante. Es poco probable que la totalidad de este efecto sea posible sin los carotenoides presentes; sin embargo el origen exacto del potencial

antioxidante de los extractos es algo que está más allá del alcance de esta investigación.

5 CONCLUSIONES

-El método de extracción número uno, basado en la utilización de Éter de petróleo como solvente dio lugar a una concentración promedio de 2678,188ug de carotenoides/100g, al cabo de tres semanas de tener contacto con la muestra en cuestión.

-El método de extracción número dos, basado en la utilización de Éter etílico y cloroformo (1:1) como solvente dio lugar a un promedio de 16479,611ug/100g, al cabo de tres semanas de tener contacto con la muestra en cuestión.

-El método de extracción número tres, basado en la utilización de Cloroformo como solvente dio lugar a un promedio de 26114,4833ug/100g, al cabo de tres semanas de tener contacto con la muestra en cuestión.

-El método de extracción número cuatro, basado en la utilización de Cloroformo como solvente dio lugar a un promedio de 3639,971ug/100g, al cabo de tres semanas de tener contacto con la muestra en cuestión.

-El método número tres, basado en la utilización de Cloroformo resultó ser el mejor método de extracción de carotenoides en términos de concentración, el método número dos (Éter etílico y cloroformo 1:1) el segundo mejor, debido a que

ambos presentan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su acción.

-Los métodos número cuatro (Isopropanol) y el número uno (Éter de petróleo) no presentaron diferencias significativas por lo que son estadísticamente iguales.

-Los carotenoides identificados y confirmados mediante TLC en los extractos obtenidos son: ϵ -caroteno, β -caroteno γ -Caroteno y Licopeno.

-Los extractos correspondientes al método número tres dieron lugar a una actividad antioxidante máxima de 54,08% correspondiente a la muestra designada M3R2 (método tres repetición dos); y a una mínima actividad antioxidante de 38,78% por parte de la muestra designada M3R4 (método tres repetición cuatro), con respecto a la solución patrón de ácido ascórbico (concentración $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

-En promedio los extractos correspondientes al método número tres dio lugar a un potencial antioxidante de 42,656%, con respecto a la solución patrón de ácido ascórbico (concentración $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

6 RECOMENDACIONES

-Se debe tener cuidado con el material vegetaltamizado secoya que es muy ligero y puede ingresar en las vías aéreas, en los ojos, e impregnarse fácilmente en cualquier superficie. A pesar de esto es muy adecuado para la extracción de compuestos de interés por el área de contacto que puede tener con el solvente.

- Al realizar pruebas por T.L.C es mejor colocar la mayor cantidad posible de muestra, ya que mientras mayor es esta cantidad la información obtenida será más clara y reveladora; esto es colocando la muestra varias veces en intervalos de tiempo para que se seque.

-Comparar otros solventes y combinaciones de solventes con el cloroformo (utilizado en la presente) en cuanto a su eficiencia en la extracción de carotenoides hasta tener una certeza de cuál es el mejor método para la extracción de los mismos.

-Utilizar un mayor número de estándares de carotenoides, para obtener mayor información con un mayor grado de certeza en pruebas como la identificación por TLC y la determinación de carotenoides totales por HPLC.

-De ser posible se recomienda realizar varias pruebas de identificación por TLC, con el fin de mejorar la técnica con cada repetición; y de ser posible variar los parámetros para obtener mayor grado de certeza en los resultados obtenidos.

-Evaluar la actividad antioxidante mediante otros análisis, como TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter); ORAC(Oxygen radical-absorbance capacity); método del ácido tiobarbitúrico (TBAR'S), o la prueba de LDL (low density lipoproteins), para obtener mayor información, y ver que tan consistente es la capacidad antioxidante de los extractos en cuestión, y conocer el potencial de los extractos para la elaboración de fármacos u alimentos enriquecidos.

7 BIBLIOGRAFÍA.-

-Aruna, P., (2001). Antioxidant Activity. pp: 1-4.

-Bauernfeind, J. C. (1972). Carotenoid vitamina A precursors and analogs in foods and feeds. J. Agric. Food Chem. 20. Pp: 456-473.

-Blot, W. J., Li, J.Y., et al. (1993). Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in general population. J. Natl. Cancer Inst. 85. Pp:1483-1492.

-Britton, G., Liaaen, S., Pfander, H. (2004). Carotenoids. Handbook. Birkhauser Verlag, Berlin - Alemania. Pp: 34-40.

-Burton, G., Ingold, K. (1984).Science. Pp: 224, 569-573.

-Cardona, M., Rios L. A. (2006).Extracción del carotenoide Licopeno del tomate Chonto (*Lycopersicum esculentum*). Pp: 1-4.

-Conn, P.F., Lambert, C., Land, E.J., Schalch, W. and Truscott, T.G. (1992). Free Radical Res. Commun.: Pp: 16, 401-408.

-Decker, E.A ., Chaiyasit, W.; McClements, D.J. 2005. Ability of antioxidants to alter interfacial tension and lipid oxidation in bulk oil and oil-in-water emulsions. *J.Agric.Agric.Food Chem.. Food Chem*,2005, 53:4982-4988

-Di Mascio, P., Kaiser, S. And Sies, H (1989). Arch. Biochem. Biophys. Pp: 274, 532-538.

-Di Mascio, P., Murphy, M.E. and Sies, H. (1984). Science. Pp: 224, 569-573.

-Everett, S.A., Dennis, M.F., Patel, K.B., Maddix, S., Kundu, S.C and Wilson, R. (1996). J. Biol. Chem. Pp: 271, 3983-3994.

-Gonzalez, I.A., (2010). Caracterizacion quimica del color de diferentes variedades de Guayaba (*Psidium Guajaba L.*) colombiana. Pp:25-26, 61-71.

-Graham, R.D., Rosser, j.M. (2000). Carotenoids in staple foods: their potential to improve human nutrition. Food Nutr. Bull. 21. Pp: 405-409.

-Greenberg, E.R., Baron, J.A, et al. (1990). A clinical trial of beta carotene to prevent basal-cell and squamous-cell cancers of the skin. N. Engl. J. Med. 323. Pp: 789-795.

-Greeberg, E.R., Baron, J.A., et al. (1994). A clinical trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma. N. Engl. J. Med. 331. Pp: 141-147.

-Heidlas, J., Huber, G. (2001). Procedimiento para la extracción de colorantes de carotenos a partir de materiales naturales. Pp: 1-5.

-Hennekens, C.H., Buring, J.E. et al. (1996). Lack of effect of long term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasm and cardiovascular disease. Engl. J. Med. 334. Pp: 1145-1149.

-Kabagame, K. E., Furtado, J., Baylin, A., & Campos, H. (2005). Some Dietary and Adipose carotenoids Are associated with the risk of Nonfatal Acute Myocardial Infarction in Costa Rica. American Society for Nutritional Sciences. Pp1764-1767.

-Klaur, H., & Bauernfeind, J. C., (1981) Carotenoids as food color. pp 48-419.

-Khoo, H., Prasad, K. N. (2010). Carotenoids from Manguifera Pajang and their antioxidant capacity. Pp: 5-6, 10.

-Kriskey, N.I. (1989). Free Radical Biol. Med.. Pp: 7, 617-635.

-Krisnsky, N.I. (1993). Annu. Rev. Nutr.. Pp: 13, 561-587.

-Martinez, M, A. (2003). Carotenoides. pp 2-7.

-Mathews, C. K., Van Holde, K.E. (1998). Bioquímica. Mc Graw Hill. Interamericana de España, A. A. U. Pp:608-609.

-Miller, J. N., Sampson, J., & Candeias, L, P. (1996). Antioxidant activities of carotenes and Xantophylls. pp 1-3.

-Minguez, M. I. (1997). *Clorofilas y Carotenoides en Tecnología de Alimentos*. Serie: Ciencias, numero 47. Secretariado de publicaciones Universidad de Sevilla, España. Pp: 25-155.

-Mosquera, M. I., Pérez, A., & Hornero D (2005). Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales; mucho más que simples “colorantes” naturales. Pp: 3-6.

-Natalucci, L. C. (1982). Análisis del contenido de Carotenoides florales de plantas que crecen en la provincia de Buenos Aires (Argentina). Pp: 15-18.

-Omenn, G.S., Goodman, G.E., et al (1996). Effects of a combination of beta carotene and vitamina A on lung cancer and cardiovascular disease. N. Engl. J. Med. 334. Pp: 1150-1155.

-Palozza, P. and Krinsky, N. (1992). Methods Enzymol. Pp: 213, 403-420.

-Packer, J.E., Mahood, J.S., Mora-Arellano, V.O., Slater, T.F., Willson, R.L. and Wolenden, R.S (1981). Biochem. Biophys. Res. Commun.. Pp: 98, 901-906.

-Pfander, H., Liaaen, S., & Britton, G. (1996). Synthesis in perspective. Pp:1-6.

-Rouessac, F., Rouessac, A. (2000). Análisis químico, métodos y técnicas instrumentales modernas. Pp: 7-79.

-Rueda, D. (2004). Botánica Sistemática, Grupo Compunor Quito-Ecuador: Pp: 21.

-Sánchez J. O.,(2004). Introducción al diseño experimental. Pp: 16-39.

-Sánchez, A., & Flores, L. B. (1999). Carotenoides, Función, Biosíntesis, Regulación y Aplicaciones. Pp: 183-188.

-Setiawan, B., Sulaeman, A., et al. (2001). Carotenoid content of selected Indonesian fruits. Journal of Food Composition and Analysis. Pp: 14, 169-176.

-Schmidt, K. (1997). Interaction of antioxidative micronutrients with host defense microorganisms. Pp: 307-311.

-Shahaidi, F., Metusalach, & Brown, J.A. (1998). Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. Pp: 1-67.

-Schott, J. (2010). Detection and measurement of carotenoids by UV/Vis spectrometry. CurrentProtocols in Food Analytical Chemistry (Editor Wrolstad, R.E.).John Wiley and sons, Inc., New York. Pp: F2.2.

-Skoog, D. A., West, D. M., et al. (2001). Química analítica. Mc Graw Hill Interamericana Editores,S.A de C.V.. Pp: 407-478.

-Swaminathan, S., Priya, K. (2008). Isolation and purification of carotenoids from Marigold flowers. Pp: 1-5.

-Suzuki, S., Nishihara, M. 2007. Flower color alteration in *Lotus Japonicus* by modification of the carotenoid biosynthetic pathway. Genetic transformation and hibridrization. Pp: 1-8.

-The alpha-tocopherol, beta carotene cancer prevention study group. (1994). The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. N. Engl. J. Med. 300. Pp: 1029-1035.

-Valdivieso, J., Reyes, M. (2010). Extracción del carotenoide Licopeno a partir de los rechazos post cosecha del mercado interno de *Citrullus Lanatus* (Sandía) para su futura aplicación en alimentos. Pp: 2-4.

- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

