

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.

Resumen

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, su cuantificación mediante H.P.L.C, y finalmente determinó su potencial antioxidante con el uso del reactivo D.P.P.H.

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

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; its cuantification with H.P.L.C, and finally the determination of their antioxidant potential was done with the D.P.P.H reagent.

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

INTRODUCCIÓN

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).

Metodología

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.

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.

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).

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).

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.

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).

Extracción de carotenoides del material vegetal

Se extraerán los carotenoides con cuatro métodos diferentes.

Método No 1

Consistirá 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 selló 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).

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.

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.

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.

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.

Mezclado.-

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

De este modo se va a obtener un total de 24 datos de concentración.

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).

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.

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.

Determinación de la capacidad antioxidante.-

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

El extracto fue llevado a una concentración de 1.5mg. L^{-1} , en el rota vapor hasta obtener una oleoresina; posteriormente se pesó 0,01g de la misma y se aforó a 25 ml con metanol. (Valdivieso, J., 2010).

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.

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.

RESULTADOS

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.

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

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).

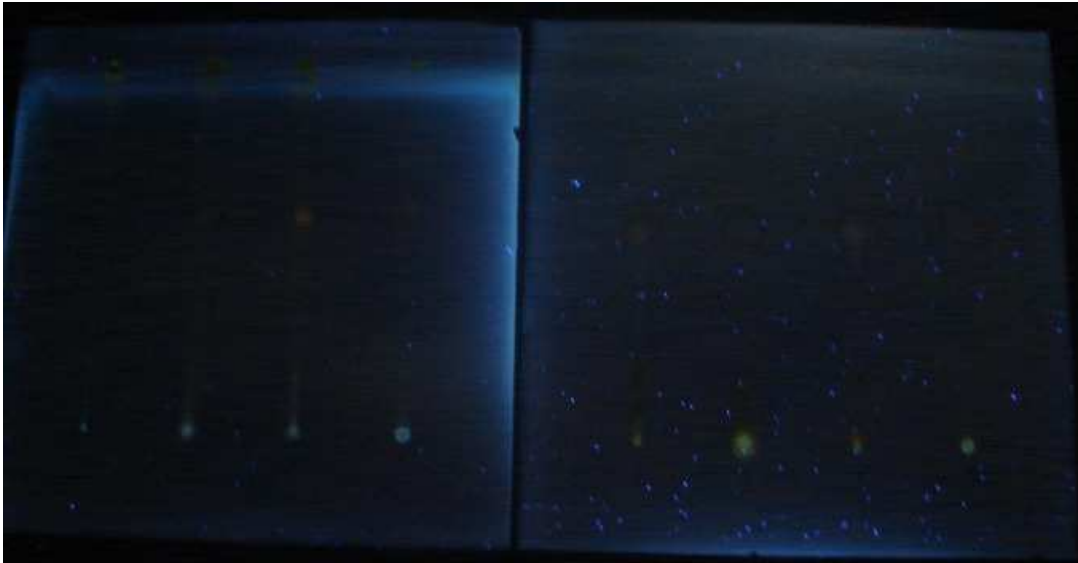


Figura 3.2.- Primeros dos cromatogramas en la identificación de los carotenoides presentes en los extractos obtenidos.

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.

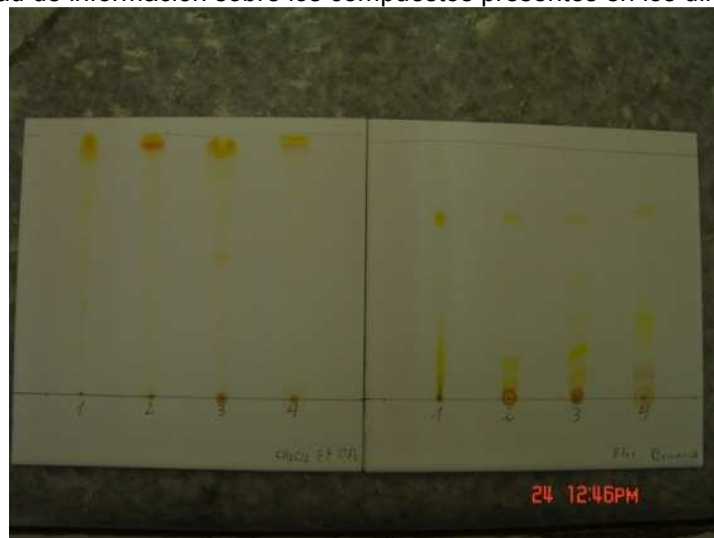


Figura 3.3.- Segunda repetición de los cromatogramas para la identificación de carotenoides en los extractos obtenidos. Se puede observar una mejoría en cuanto a la visibilidad de los compuestos y a la claridad de las bandas formadas.

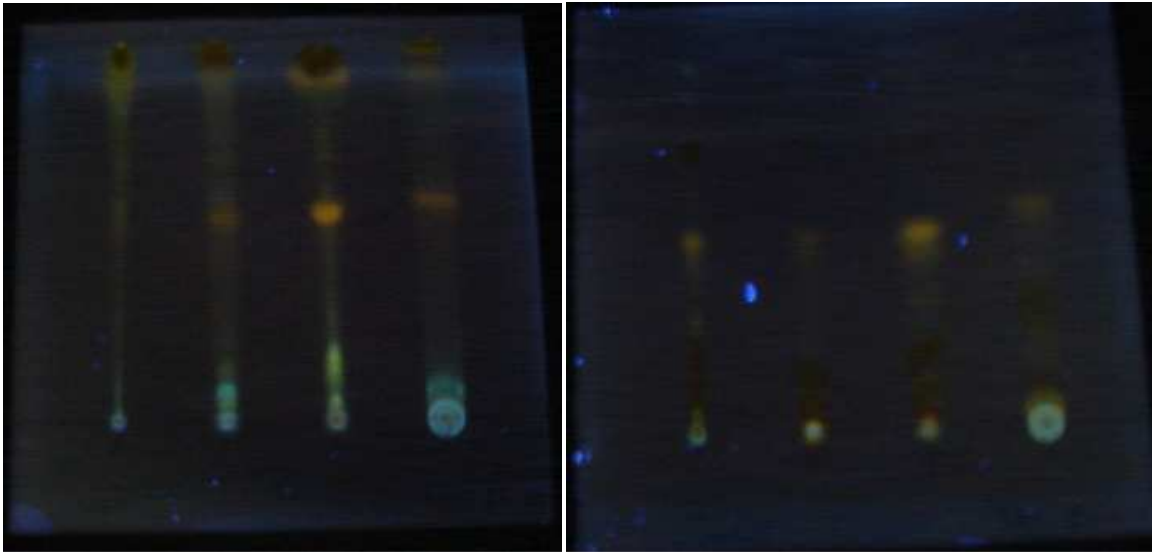


Figura 3.4.- Segunda repetición de los cromatogramas; se puede observar una mejoría en cuanto a la claridad de las bandas visibles con luz ultravioleta de longitud larga.

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.

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.

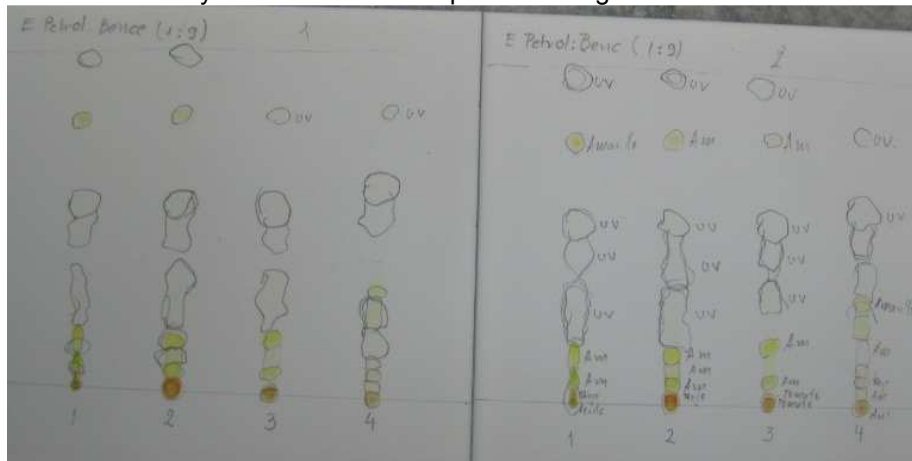


Figura 3.5.- Segunda sesión de identificación de los carotenoides presentes en los extractos obtenidos; en este caso solamente se utilizó éter de petróleo y benceno (1.9). Se puede ver que existen bandas de color rojo que prácticamente no migraron en los cromatogramas; y bandas de compuestos no visibles.

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 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	Lycopeno
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	Lycopeno
	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	Lycopeno

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

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:

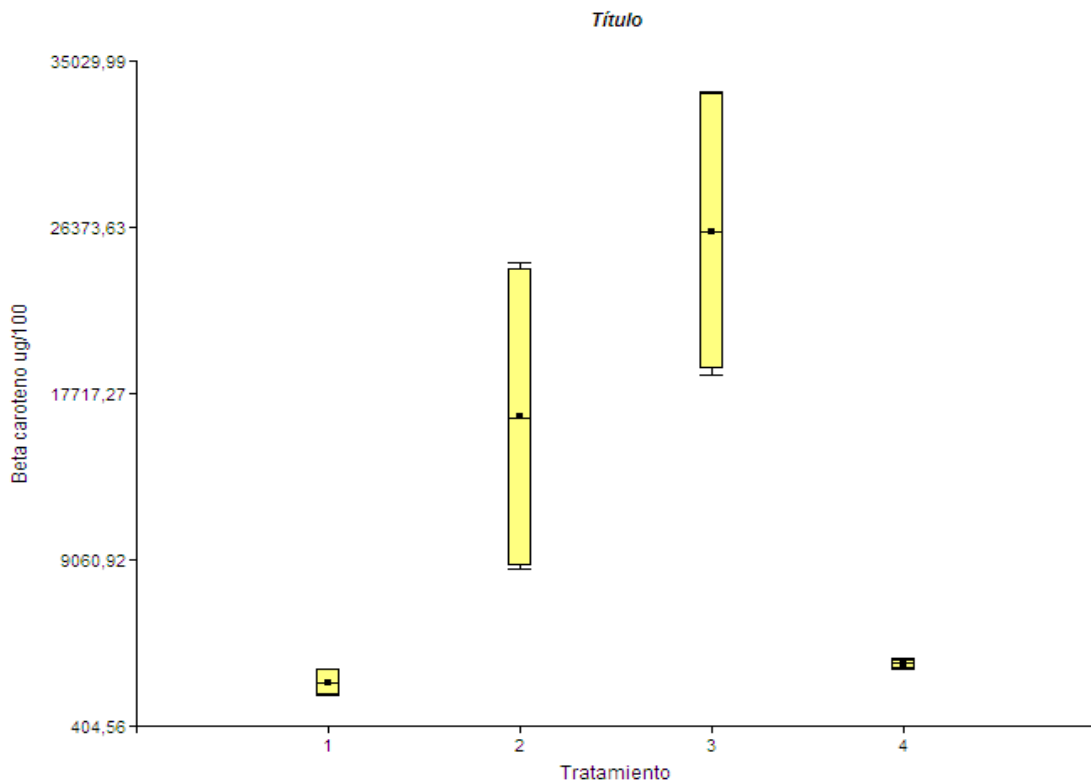


Figura 3.6.-Gráfico de cajas de los datos sometidos a análisis; se puede ver que los únicos dos tratamientos en mostrar diferencias significativas son los correspondientes al Éter etílico y Cloroformo (1:1) o tratamiento numero 2; y al Cloroformo o tratamiento número 3.

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%.

Conclusiones

En promedio la concentración obtenida por el mejor método de extracción que en nuestro caso fue es cloroformo es 26114,4833; 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 debido a lo sensible del método. (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: α -caroteno, β -caroteno, ϵ -caroteno y γ -caroteno pero también hubo presencia de licopeno que indudablemente da lugar a las tonalidades rojizas dentro de las bandas encontradas y aunque no es el compuesto mayormente encontrado su presencia es indiscutible.

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.

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.

Agradecimientos

Dejo constancia de mi agradecimiento al área de química de la facultad de ingeniería en Biotecnología; por su apoyo, su guía y sobre todo su colaboración con el desarrollo de este

proyecto. De igual manera quisiera agradecer a los laboratorios de multianálisis por la ayuda logística durante el desarrollo de este proyecto de tesis.

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 (*Lycopersicon 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. Food Chem.* 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). Caracterización química 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.
- Greenberg, 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.
- Klaui, 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. U. Pp: 608-609.
- Miller, J. N., Sampson, J., & Candeias, L, P. (1996). Antioxidant activities of carotenos and Xantophylls. pp 1-3.
- Minguez, M. I. (1997). *Clorofilas y Carotenoides en Tecnología de Alimentos*. Serie: Ciencias, número 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 ceta 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. Current Protocols 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>