

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



Determinación de colorantes naturales de tono rojo y naranja contenidos en *Smilax domingensis* con potencial de aplicación industrial por el método de extracción por disolventes.

Sebastián Cáceres Girón

Guatemala
2010

Determinación de colorantes naturales de tono rojo y naranja contenidos en *Smilax domingensis* con potencial de aplicación industrial por el método de extracción por disolventes.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería Química

Determinación de colorantes naturales de tono rojo y naranja contenidos en *Smilax domingensis* con potencial de aplicación industrial por el método de extracción por disolventes.

BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Trabajo de investigación presentado por Sebastián Cáceres Girón para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Química

Guatemala
2010

Vo. Bo. :

(f) _____

Ing. Químico. Gamaliel Zambrano Ruano

Colegiado # 686

Asesor

Tribunal Examinador:

(f) _____

Ing. Químico Oscar Maldonado

Colegiado # 90

(f) _____

Ing. Químico José Andrés Hernández

Colegiado # 1609

(f) _____

Ing. Químico. Gamaliel Zambrano Ruano

Colegiado # 686

Fecha de aprobación:

Guatemala, 25 de enero de 2011

PREFACIO

A raíz de investigaciones multidisciplinarias de un equipo de profesionales que iniciaron un trabajo pionero han llegado a detectar la riqueza florística con la que cuenta Guatemala. Las investigaciones etnobotánicas llevadas a cabo por este equipo dan cuenta del potencial de aplicación de las diferentes plantas detectadas en dichos estudios. Una de las investigaciones fue el descubrimiento de la actividad que presenta el rizoma de *Smilax domingensis*. Sin embargo, las investigaciones realizadas solamente han demostrado la amplia actividad farmacológica de la planta dejando por un lado una aplicación potencial del de la misma como fuente de colorantes naturales. Por la razón mencionada anteriormente, y por el esfuerzo del equipo de investigadores por crear una alternativa a los colorantes que se usan en la actualidad se llegó a la conclusión que el rizoma de *S. domingensis* es una de las plantas más aprovechables a nivel industrial.

Este trabajo no se podría haber realizado sin la ayuda y asesoría de las personas del Laboratorio de productos Naturales Farmaya, en especial la Jefe de Producción Liz Méndez y la Jefe de Control de Calidad Fabiola Hernández, se empezó la investigación de colorantes en el rizoma de *S. domingensis*. Al mismo tiempo, por los consejos y conocimiento del Licenciado Armando Cáceres quien, por su experiencia, fue el promotor de la idea de este trabajo. Asimismo, los esfuerzos y consejos de las personas encargadas del Laboratorio de Investigación de Productos Natural. Finalmente al señor Hideo Kojima por su apoyo en las técnicas de teñido de algodón.

ÍNDICE

PREFACIO	v
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE ILUSTRACIONES	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	2
III. JUSTIFICACIÓN.....	14
IV. OBJETIVOS	15
V. METODOLOGÍA.....	16
VI. RESULTADOS	26
VII. DISCUSIÓN.....	31
VIII. CONCLUSIONES.....	39
IX. RECOMENDACIONES	40
X. BIBLIOGRAFÍA.....	41
XI. APÉNDICE	42

LISTA DE TABLAS

Tabla No. 1 Clasificación de colorantes naturales según su naturaleza química	4
Tabla No. 2 Constante dieléctrica de diferentes solventes	10
Tabla No. 3 Criterios de solubilidad.....	21
Tabla No. 4 Rendimiento de extracción etanólica.....	26
Tabla No. 5 Rendimiento de extracción fraccionada	26
Tabla No. 6 Ensayos macro para determinación de flavonoides y antocianinas.....	26
Tabla No. 7 Cromatografía de Capa Fina.....	27
Tabla No. 8 Solubilidad de los extractos secos	28
Tabla No. 9 Pruebas de Teñido	29
Tabla No. 10 Comparación de color.....	30
Tabla No. 11 Datos para determinar el mejor disolvente etanólico	43
Tabla No. 12 Datos para determinar el mejor disolvente metanólico	43
Tabla No. 13 Datos recolectados de la prueba de mejor disolvente etanólico	44
Tabla No. 14 Datos recolectados de la prueba de mejor disolvente metanólico	44
Tabla No. 15 Datos de la extracción etanólica	44
Tabla No. 16 Datos para determinación de sólidos totales al final del 5to día de extracción etanólica	44
Tabla No. 17 Datos de la extracción fraccionada.....	45
Tabla No. 18 Datos de la Cromatografía de Capa Fina de los estándares utilizados	45
Tabla No. 19 Datos de la Cromatografía de Capa Fina de los diferentes extractos	45
Tabla No. 20 Ensayos macro para determinación de flavonoides.....	46
Tabla No. 21 Solubilidad de los colorantes en diferentes disolventes	46
Tabla No. 22 Datos para las pruebas de teñido	46
Tabla No. 23 Costo de los disolventes utilizados y materia prima.....	47
Tabla No. 24 Consumo y costo de energía.....	47
Tabla No. 25 Rendimiento de extractos para determinación de mejor disolvente etanólico	53
Tabla No. 26 Rendimiento de extractos para determinación de mejor disolvente metanólico	54
Tabla No. 27 Sólidos totales al final del 5to día de extracción etanólica.....	54
Tabla No. 28 Rendimiento de extracción etanólica.....	54
Tabla No. 29 Rendimientos de extracción fraccionada.....	54
Tabla No. 30 Rf de los estándares utilizados.....	54
Tabla No. 31 Rf de los extractos	55
Tabla No. 32 Balance de Masa de extracción etanólica	55
Tabla No. 33 Balance de Masa de extracción fraccionada.....	55
Tabla No. 34 Costos unitarios de la extracción etanólica.....	55

Tabla No. 35 Costos unitarios de la extracción fraccionada	56
Tabla No. 36 Costos de tinción con base en 20 gramos	56

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración No. 1 Método para determinación de mejor disolvente	16
Ilustración No. 2 Crisoles utilizados para evaporación de disolvente	17
Ilustración No. 3 Equipo Rotavapor para recuperación de disolventes.....	18
Ilustración No. 4 Balón utilizado para concentrar colorante	19
Ilustración No. 5 Cromatoplaaca antes de ingresar a la cámara de fase móvil	20
Ilustración No. 6 Cámara para fase móvil	20
Ilustración No. 7 Baño de colorante	22
Ilustración No. 8 Hilo de algodón virgen	22
Ilustración No. 9 Baño de mordiente sulfato de cobre	23
Ilustración No. 10 Cromatoplaaca revelada en visible	28
Ilustración No. 11 Cromatoplaaca revelada en UV 354 nm.....	28
Ilustración No. 12 Procedimiento para la determinación de mejor disolvente.....	42
Ilustración No. 13 Procedimiento de la extracción etanólica de colorantes naturales	42
Ilustración No. 14 Procedimiento de la extracción fraccionada de colorantes naturales	43
Ilustración No. 15 Balance de masa de la extracción etanólica.....	52
Ilustración No. 16 Balance de masa de la extracción fraccionada	52

RESUMEN

La sustitución de colorantes sintéticos cada vez gana más interés a nivel mundial. En este trabajo se realizaron dos extracciones de colorantes naturales del rizoma de *Smilax domingensis* para determinar el contenido de colorantes naturales dentro de la materia vegetal. Se encontró que en una extracción etanólica utilizando etanol al 50% como disolvente se obtuvo un rendimiento de 32.2%, siendo éste el disolvente más adecuado para la extracción de colorantes en el rizoma de *S. domingensis*. Se encontró que una extracción fraccionada utilizando 5 disolventes con diferente polaridad tiene un rendimiento de extracción de 20.2%. Se caracterizaron por Cromatografía de Capa Fina los diferentes extractos dejando evidencia de la existencia de flavonoides tipo Rutina en los extractos con más alto rendimiento y Ácido clorogénico en todos los extractos obtenidos; no se encontró evidencia de la presencia de antocianinas. La solubilidad de los extractos y las pruebas de tinción que se llevaron a cabo demuestran la alta aplicabilidad de los extractos en diferentes industrias. Finalmente, aunque se encontraron flavonoides y una aplicación industrial del color del extracto, no se logró sustituir a los rojos y naranjas de la industria puesto que el color de los extractos es entre café y naranja. Se recomienda conducir pruebas de estabilidad de colorante así como pruebas más específicas para la determinación de la presencia de antocianinas en el rizoma de la materia vegetal.

I. INTRODUCCIÓN

La utilización de la zarzaparrilla en Guatemala es casi exclusivamente para la industria farmacéutica y de cosméticos y no se aprovecha en otros tipos de industria. Por esta razón el objetivo de este trabajo de graduación fue determinar el contenido de colorantes de tipo flavonoides y antocianinas en el rizoma de *S. domingensis* y verificar la aplicación industrial de tales colorantes. Se realizó una extracción fraccionada con solventes de poca polaridad a una alta polaridad. Asimismo, se hizo una caracterización preliminar del tipo de colorantes presentes en los diferentes extractos. Se determinó la solubilidad en agua y etanol de los colorantes extraídos para determinar la industria en la que pueden ser aprovechados los colorantes. Se realizaron pruebas de tinción de hilo para determinar la aplicabilidad en la industria textil llegando a la conclusión que es un pigmento muy adecuado para dicha industria. Finalmente, se comparó con colores que ya existen en la industria, teniendo como resultado un color café anaranjado. Es importante tener en cuenta que aunque existen muchas formas de caracterizar y cuantificar la cantidad de flavonoides en un extracto, en este trabajo solo se utilizó la técnica de Cromatografía de Capa Fina puesto que solamente se quería saber la existencia de flavonoides no la cuantificación de los mismos. A su vez, la solubilidad de los diferentes extractos sólo fue comparada con diluciones etanólicas y agua puesto que estos solventes son los de más amplio uso a nivel industrial.

Se encontró que el rendimiento más alto de extracción lo tiene la extracción etanólica utilizando etanol al 50%. Asimismo, se determinó que la extracción fraccionada con los disolventes utilizados no es la más conveniente puesto que el rendimiento es mucho más bajo que en la extracción etanólica. Finalmente, la solubilidad y pruebas de tinción de los extractos muestran que tienen una alta aplicabilidad a nivel industrial.

II. MARCO TEÓRICO

A. Colorantes naturales ✓

El hombre ha estado involucrado con los colores y las sustancias que les imparten, los pigmentos, desde tiempo antiguo; ha vivido con ellos, los ha utilizado y se ha beneficiado económicamente de ellos. Por su naturaleza, el hombre siempre ha tratado de modificar y embellecer su entorno con el uso del color. Como un animal vidente el hombre ha empleado los pigmentos de origen natural, es decir, del reino de las plantas, animales y minerales, no sólo para modificar su entorno, pero también alterarse a sí mismo con respecto al medio que lo rodea. (Gustav, 1980)

Por definición, un pigmento natural en los sistemas biológicos es la que sintetiza y acumulan, o excretan las células vivas. Por otra parte, ciertos pigmentos, como los fenoles oxidados y los derivados fenólicos más simples, como las cumarinas anticoagulantes, pueden ser formados por las células que están muriendo. Asimismo, se pueden definir como los preparados obtenidos a partir de algunas partes específicas de ciertas plantas naturales empleando un método de extracción física o química que ocasiona una selección de los pigmentos que se usan como componentes nutritivos o aromáticos. Los que se encuentran ya formados en la naturaleza, suelen estar disueltos o formando depósitos granulares en las células superficiales de las plantas. Los colorantes vegetales se encuentran mayormente concentrados en las vacuolas celulares de un sinnúmero de plantas, en donde a su vez sin encontrarse en estado puro, se asocian con otros principios como aceites, resinas, y en particular con los taninos que son de carácter astringente. (Hendry, 1996) ✓

Los pigmentos son el resultado de procesos muy complejos logrados a través de la acción fotosintética de las partes verdes de la planta mediante síntesis. Entre estos tenemos a los derivados: Carotenoides, clorofilicos, antociánicos y flavónicos. Estos colorantes eran los que hasta principios de siglo utilizaban las industrias textiles y que fueron sustituidos paulatinamente por los colorantes orgánicos artificiales. Como ejemplo tenemos la hematoxilina, el achiote y el añil. Las plantas utilizadas como colorantes se dividen en varios grupos: Colorantes naturales, tintes naturales y pigmentos naturales. Los colorantes naturales son productos que se adicionan a los alimentos para proporcionarles un color en específico y hacerlos más agradables a la vista. Los tintes naturales se usan para teñir telas, madera y cuero. Finalmente, los pigmentos naturales son los compuestos responsables del color visible de una planta; además de ser utilizados por la industria farmacéutica. (Lock Sing de Ugaz, 1997)

En los últimos 130 años, se han sintetizado varios miles de compuestos químicos coloridos, de los cuales alrededor de 10,000 son o han sido producidos a escala industrial, tratando en muchos casos de sintetizar productos idénticos a los naturales. Se menciona que obtener colorantes naturales puros puede costar de 30 a 100 veces más que el producir colorantes sintéticos certificados, reduciendo con ello las posibilidades de explotación de estas fuentes naturales. Sin embargo, en años recientes se ha renovado el interés en colorantes naturales por recientes limitaciones en el uso de algunos sintéticos en alimentos, medicamentos y en productos cosméticos debido a su toxicidad. Asimismo, las estrategias biotecnológicas en la producción de colorantes naturales que se han desarrollado en los últimos años son de gran importancia y que podrían otorgar una serie de ventajas, entre ellas, las económicas. (Lock Sing de Ugaz, 1997)

1. Clasificación de colorantes naturales. Los colorantes naturales pueden ser clasificados según su naturaleza química en diversos grupos. Sus valores de longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$).

Tabla No. 1
Clasificación de colorantes naturales según su naturaleza química

NATURALEZA QUÍMICA	EJEMPLOS	COLOR PREDOMINANTE	$\lambda_{\text{máx}}$, nm
TETRAPIRROLES	FICOBILINAS	AZUL-VERDE AMARILLO-ROJO	610-650 540-570
	CLOROFILA	VERDE	640-660
CAROTENOIDES	CAROTENOIDES	AMARILLO-ANARANJADO	400-500
FLAVONOIDES	FLAVONAS	BLANCO-CREMA	310-350
	FLAVONELES	AMARILLO-BLANCO	330-360
	CHALCONAS	AMARILLO	340-390
	AURONAS	AMARILLO	380-430
	ANTOCIANINAS	ROJO-AZUL	480-550
XANTONAS	XANTONAS	AMARILLO	340-400
QUINONAS	NAFTOQUINONAS	ROJO-AZUL-VERDE	420-460
	ANTRAQUINONAS	ROJO-PÚRPURA	
INDIGOIDES E ÍNDOLES	ÍNDIGO	AZUL-ROSADO	470-485 530-554
	BETALAÍNAS	AMARILLO-ROJO	
PIRIMIDINAS SUSTITUIDAS	PTERINAS	BLANCO-AMARILLO	
	FLAVONAS	AMARILLO	
	FENOXAZINAS	AMARILLO-ROJO	
	FENAZINAS	AMARILLO-PÚRPURA	

(Lock Sing de Ugaz, 1997)

B. *Smilax domingensis*

La Zarzaparrilla es nativa de bosques húmedos y espesuras hasta 2100 msnm; distribuida de Veracruz a Panamá y las Antillas. Se obtiene por recolección en bosques primarios y secundarios. Se ha iniciado su cultivo y manejo para garantizar un abastecimiento sostenido. Se requiere suelo bien drenado, caliente, a media sombra, húmedo y condiciones boscosas para que la enredadera trepe. La propagación se hace por semillas o divisiones del rizoma. El rizoma se colecta al final de las lluvias, se corta en hojuelas y se seca al sol. Los usos más importantes de la Zarzaparrilla son de índole medicinal y entre la composición química y principios activos se encuentran: alcaloides, aceite esencial, esteroides insaturados, glicósidos esteroidales, flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles resinas, azúcares y grasas. (Cáceres, 2009)

C. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza. Se han identificado más de 5.000 flavonoides diferentes. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg/día, siendo la quercitina el predominante con un valor medio de 16 mg/día. En un principio, fueron consideradas sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana, pero más tarde se demostraron múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres. Aunque diversos estudios indican que algunos flavonoides poseen acciones prooxidantes, éstas se producen sólo a dosis altas, constatándose en la mayor parte de las investigaciones la existencia de efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos, y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías. (S. Martínez-Flórez, 2002)

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soja, los cuales son consumidos en la dieta humana de forma habitual y también pueden utilizarse en forma de suplementos nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales. Los flavonoides se encuentran también en extractos de plantas como arándano, ginkgo biloba, cardo, mariano o crataegus. Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre. (S. Martínez-Flórez, 2002)

Los flavonoides se sintetizan en las plantas y participan en la fase dependiente de luz de la fotosíntesis, durante la cual catalizan el transporte de electrones. Su formación tiene lugar a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina y también de unidades de acetato. La fenilalanina y la tirosina dan lugar al ácido cinámico y al ácido parahidroxicinámico, que al condensarse con unidades de acetato, originan la estructura

cinamol de los flavonoides. Posteriormente se forman los derivados glicosilados o sulfatados. (S. Martínez-Flórez, 2002)

Son compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura química basada en un esqueleto C6-C3-C6, esto es un anillo bencénico unido a una cadena propánica y esta a su vez a otro anillo bencénico. Dependiendo del grado de saturación y patrón de sustitución de grupos funcionales en la estructura base, se da lugar a flavonoides con designaciones comunes como flavanoles, flavonas, chalconas, auronas, isoflavonoides, etc., así como a sus derivados glicosidados que portan moléculas de azúcares e incluso derivados ácidos de azúcares. Suelen encontrarse también parcialmente polimerizados dando lugar a dímeros, trímeros, etc., hasta formar complejos multienlazados como los taninos condensados. (Lock Sing de Ugaz, 1997)

Los flavonoides son uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos de constituyentes naturales. Se conocen unos 200 flavonoides naturales. Se encuentran distribuidos entre las plantas, tanto libres como glicósidos; estos últimos contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas. Según estudios realizados los flavonoides representan una gran importancia para la utilización de las plantas como colorantes naturales. Los flavonoides en forma natural se encuentran libres como glicósidos o derivados metilados en las células vivas de las plantas. Estos compuestos se encuentran en todas las plantas tanto primarias como secundarias. (del Cid Vásquez, 2004)

Estos compuestos se encuentran de manera natural en los alimentos, particularmente en los vegetales. En general el sabor que aportan a los alimentos suele ser amargo llegando incluso a provocar sensaciones de astringencia dependiendo de lo condensados que sean los taninos. El sabor puede variar dependiendo de las sustituciones presentadas en el esqueleto llegando incluso a usarse como edulcorantes cientos de veces más dulces que la glucosa. (Lock Sing de Ugaz, 1997)

Los flavonoides se emplearon durante mucho tiempo como colorantes de lana y actualmente se usan en la conservación de grasas o jugos de fruta por las propiedades

antioxidantes de algunas polihidroxi flavonas. Los glucósidos de dihidrochalconas se utilizan como edulcorantes. Actúan como antioxidantes, limitan la acción de los radicales libres (oxidantes) reduciendo el riesgo de cáncer y enfermedades cardíacas, mejoran los síntomas alérgicos y de artritis, aumentan la actividad de la vitamina C, refuerzan los vasos sanguíneos, bloquean la progresión de las cataratas y la degeneración macular, evitan las tufaradas de calor en la menopausia y combaten otros síntomas. Tienen actividades biológicas con propiedades diversas como antimicrobianas, anticancerígeno, antimutagénicos. Algunas isoflavonas lipófilas, están dotadas de propiedades estrogénicas. La hidrogenación de las chalconas del limón, da derivados azucarados empleados como edulcorantes. (Lock Sing de Ugaz, 1997)

Como características generales de estos compuestos se deben señalar su solubilidad en agua y en etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos y conjugados. Los flavonoides se emplearon durante mucho tiempo como colorantes de lana, y actualmente se usan en la conservación de grasas o jugos de frutas debido a sus propiedades antioxidantes. Los flavonoides se caracterizan por tener quince átomos de carbono en su núcleo básico con dos anillos aromáticos unidos por un grupo de tres carbonos que pueden formar un tercer anillo. (Lock Sing de Ugaz, 1997)

1. Antocianinas. Las antocianinas son un grupo de pigmentos rojizos, solubles en agua, ampliamente difundidos en el reino vegetal. Numerosas frutas, vegetales, flores y raíces deben sus atractivos colores a este tipo de compuestos, presentes en la savia de las células. Su acusado color rojo, hizo surgir interés por su estructura química. Actualmente se conocen bastante bien las estructuras del grupo de las antocianinas, pero no tanto la fisicoquímica de los pigmentos complejos y de sus reacciones de degradación.

El término antocianina se aplica para el glicósido y el de antocianidina para la aglicona. Las antocianinas están basadas químicamente en una única estructura aromática, aquella de la cianidina y todas se consideran derivadas de ella por adición o sustracción de grupos hidroxilo, por mutilación o por glicosidación. Las antocianinas son

derivados del catión flavilio básico. Un pigmento antociánico generalmente compuesto por un aglicón (una antocianidina) esterificada por uno o más azúcares, rara vez se encuentran aglicoles libres en los alimentos, excepto como componentes en trazas, de las reacciones de degradación. Las antocianinas están consideradas dentro del grupo de los flavonoides, ya que poseen el esqueleto característico $C_6-C_3-C_6$ y el mismo origen biosintético, pero difieren en que absorben fuertemente en la región visible del espectro por su alto grado de conjugación. (Lock Sing de Ugaz, 1997)

Las antocianinas son pigmentos naturales no tóxicos, solubles en agua, que desarrollan gran variedad de colores que van desde el naranja al azul, también presentan propiedades antioxidantes benéficas para la salud. Son insolubles en agua y se solubilizan reduciéndolos en un medio alcalino. Bajo la adición de hidrosulfito de sodio, en presencia de hidróxido de sodio. De esta manera se forma un leuco-éster. Estos compuestos tienen gran afinidad hacia la fibra textil. Se tiñe a una temperatura de aproximadamente 60°C durante 45 min. Cuando se encuentra sobre la fibra, el colorante se oxida con agua pura o con algún agente oxidante, como peróxido de hidrógeno y se transforma de esta forma en pigmento insoluble. (Lock Sing de Ugaz, 1997)

Las antocianinas como pigmentos naturales inocuos tienen considerable potencia en la industria alimenticia pero, a diferencia de los pigmentos rojos sintéticos que se utilizan actualmente, las antocianinas no son estables especialmente en soluciones neutras y alcalinas, ocurriendo fácilmente cambios durante el procesamiento crudo y el almacenaje, los que se manifiestan en la pérdida del color, oscurecimiento del producto y formación de precipitados en los extractos. Por tal motivo su uso se prefiere a pH ácido como en una gran cantidad de las bebidas comerciales. (Lock Sing de Ugaz, 1997)

D. Extracción y purificación

1. Molienda. La molienda tiene como objetivo la disminución del tamaño de las partículas del colorante o droga vegetal para adecuarla a la etapa siguiente del proceso de extracción. La extracción de una molécula entera o dividida en fragmentos gruesos sería incompleto, debido a la pobre penetración del solvente en el tejido vegetal, y sería igualmente muy lenta, una vez que las membranas celulares actúan como verdaderas barreras que dificultan el proceso de extracción. En el caso específico del colorante o droga previamente dividida, tales membranas se encuentran parcialmente destruidas, lo que facilita la disolución de los constituyentes celulares en el líquido externo. Sin embargo, la división excesiva, con formación de polvos muy finos, puede causar problemas en el transcurso de la extracción. En los procesos de percolación existe compactación del polvo, lo que dificulta el paso del solvente, dando como resultado una extracción incompleta del colorante. (Sharapin, 2000)✓

2. Elección de disolventes. Los solventes empleados en la extracción de los colorantes son muy variados y pueden ser desde muy polares como agua y etanol, hasta menos polares como éter y cloroformo. Es recomendable emplear una sucesión de dos o más solventes, usualmente en el orden de lipofílico a hidrofílico; por ejemplo: éter de petróleo, benceno, éter etílico, acetato de etilo, alcoholes y agua. La reacción más usual para la detección de flavonoides en un extracto de planta es la reacción de Shinoda: al extracto alcohólico incoloro o ligeramente amarillo se le coloca un pequeño trozo de magnesio y unas pocas gotas de HCl, el desarrollo inmediato de coloración es indicativo de la presencia de: flavonas y flavonoles (amarillo y rojo), flavanoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo). (Lock Sing de Ugaz, 1997)

Antes de empezar un proceso extractivo en cualquier escala, se debe definir la selectividad del solvente a ser usado en el proceso. Dependiendo del propósito al que se destine, se puede obtener un extracto cuya composición química contiene la mayor parte

de los constituyentes químicos de la planta, o un extracto que contiene solamente constituyentes químicos con una determinada característica. La escogencia del solvente de extracción, así como la permanencia en la composición química de la materia vegetal, representan dos aspectos de suma importancia en cualquier proceso de fabricación. En general, la elección del disolvente depende mucho de la constante dieléctrica que este posee. (Sharapin, 2000)

Tabla No. 2
Constante dieléctrica de diferentes solventes

Solvente	Constante dieléctrica a 25°C
Hexano	1.89
Cloroformo	4.87
Acetato de Etilo	6.02
Etanol	24.3
Metanol	33.6
Agua	78.3

(Sharapin, 2000)

3. Percolación. La percolación consiste en hacer pasar el solvente a través de la droga, hasta su extracción exhaustiva completa. La percolación simple, comprende la extracción exhaustiva de la droga con solvente siempre renovado. En pequeña escala, la percolación se realiza en aparatos, denominados percoladores, de cuerpo cilíndrico o cónico, provistos de un grifo en la parte inferior, para regular el flujo del solvente. La percolación, en pequeña escala o en escala industrial, comprende una etapa preliminar de humedecimiento de la droga, fuera del cuerpo del percolador este procedimiento tiene como objetivo aumentar el contacto, facilitando el paso del solvente y no permitiendo la formación de falsas vías, que perjudican la eficiencia del proceso. El humedecimiento de la droga aumenta la porosidad de la pared celular y facilita la difusión de las sustancias extraíbles hacia el exterior de las células. El humedecimiento deber ser realizado fuera del percolador, ya que la droga puede hincharse excesivamente, principalmente cuando el solvente es acuoso, y comprimirse contra las paredes del percolador, no permitiendo el paso del solvente. La percolación simple presenta, como desventaja, el alto consumo de solvente. Por esta razón, en condiciones industriales, es preferible usar la técnica de la

repercolación. La repercolación consiste en hacer recircular el mismo solvente a través de la droga, por intermedio de bombas. Este procedimiento aumenta el tiempo de contacto de la droga con el solvente y aumenta la eficiencia del proceso. (Sharapin, 2000)

4. Concentración. La concentración representa la etapa siguiente al proceso de extracción. El proceso de concentración busca aumentar el contenido de sólidos en el extracto con la finalidad de: a) alcanzar un determinado contenido del residuo seco; b) fabricar extractos blandos y c) como etapa preliminar en la producción de extractos secos. (Sharapin, 2000)

5. Secado. La operación de secado consiste en retirar el agua u otro solvente y se lleva a cabo cuando se requiere obtener extractos secos, que ofrecen ventajas particulares, como la estabilidad química y mayor facilidad de almacenamiento y transporte. Los extractos secos normalmente presentan una menor carga bacteriana en relación con los otros tipos de extractos, pudiendo ser esterilizados por radiación gama. (Sharapin, 2000)

E. Cromatografía de Capa Fina

Las CCF (Cromatografía de Capa Fina) comprenden lo que se llaman las cromatografías planas. Las CCF es el método más sencillo y más utilizado de las técnicas cromatográficas. Un recipiente cerrado y adecuado que contiene solvente y una placa recubierta es todo lo que se requieren para llevar a cabo las separaciones y el análisis cualitativo y semicuantitativo. Con la optimización de las técnicas y materiales y el uso de instrumentos comerciales disponibles, separaciones altamente eficientes y cuantificación exacta y precisa se puede lograr. (Sherma & Fried, 2003)

La teoría cromatográfica describe las relaciones fisicoquímicas que gobiernan las separaciones. Usualmente, modelos semiempíricos del proceso cromatográfico se utilizan para tener un antecedente termodinámico simplificado y dar una idea del los

fenómenos a gran escala. En general las CCF, funcionan porque las fuerzas capilares inducen a la fase móvil a moverse o fluir a través de la capa fina. Los solventes o mezclas de solventes contenidos en la cámara cromatográfica entran en los capilares de la cama sólida, intentando disminuir su área superficial libre y su energía libre. (Sherma & Fried, 2003)

1. Estándares para determinación de flavonoides

a. Rutina

Número de Registro CAS: 153-18-4

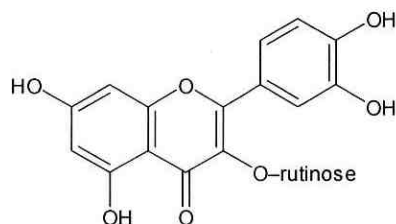
Fórmula molecular: $C_{27}H_{30}O_{16}$

Peso molecular: 610.53

Composición: C 53.12%, H 4.95%, O 41.93%

Propiedades: Oscurecimiento gradual con la exposición a la luz. Los cristales contienen 3 moléculas de agua y se vuelven anhidros luego de 12 horas a 110 °C y 10 mmHg. La rutina anhidra es higroscópica y se oscurece a 125°C y se convierte en un plástico entre 195-197°C. Un gramo de rutina se disuelve en alrededor de 8 litros de agua, en 200 mL de agua hirviendo y en 7 mL de etanol a ebullición. Soluble en piridina, formamida y soluciones alcalinas; poco soluble en alcohol, acetona y acetato de etilo. Es prácticamente insoluble en cloroformo, disulfuro de carbono, éter, benceno y disolventes del petróleo. D.L. 50 en ratones: 950 mg/kg. (Corporation, Merck, 2000)

Molécula:



b. Ácido Clorogénico

Número de Registro CAS: 327-97-9

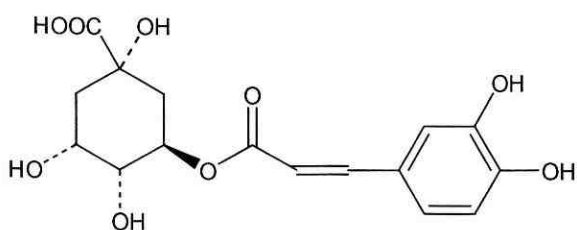
Fórmula molecular: $C_{16}H_{18}O_9$

Peso molecular: 354.31

Composición: C 54.24%, H 5.12%, O 40.64%

Propiedades: Es un factor importante en el metabolismo de las plantas. Generalmente se extrae de los granos verdes del café aunque también se da en plantas, hojas y otros tejidos vegetales. Forma agujas con el contacto con agua. Se deshidrata a 110°C. La solubilidad en agua a 25°C es de 4%, aunque es mucho más soluble en agua caliente. Es soluble libremente en alcohol, acetona y es ligeramente soluble en acetato de etilo. Calentar el ácido clorogénico con una dilución de HCl produce ácido caféico.

Molécula:



(Corporation, Merck, 2000)

c. Quercetina

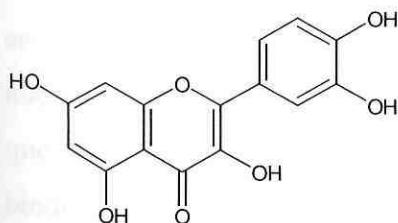
Número de Registro CAS: 117-39-5

Fórmula molecular: $C_{15}H_{10}O_7$

Peso molecular: 302.24

Composición: C 59.61%, H 3.33%, O 37.06%.

Molécula:



(Corporation, Merck, 2000)

III. JUSTIFICACIÓN

Guatemala es uno de los países con más diversidad biológica del mundo puesto que la flora y fauna es muy variada. Esto permite tener muchas plantas que pueden ser utilizadas para diversos usos, desde cosméticos, medicamentos y como alimento. Sin embargo, dichas plantas no están lo suficientemente estudiadas como para tener una base sólida en la cual apoyarse para llevar a cabo aprovechamientos industriales de la diversidad guatemalteca. En cuanto al rizoma de *S. domingensis* se han llevado a cabo innumerables estudios a cerca de su actividad farmacológica sin embargo hay pocos que la reconocen como un sustituto a los colorantes sintéticos. La mayoría de la producción de zarzaparrilla del país que se utiliza como materia prima se exporta y la pequeña cantidad que se queda en el país es utilizada exclusivamente en la industria farmacéutica. Como muchos de los recursos naturales que se extraen de Guatemala, la zarzaparrilla es exportada como materia prima y no se saca provecho localmente de todas sus propiedades. Teniendo en cuenta este antecedente, es muy aconsejable utilizar la planta para obtener colorantes naturales ya que no sólo se le estaría dando otro uso, sino a su vez se podría mejorar la calidad de vida de los consumidores. Finalmente, esto daría la posibilidad de opciones de desarrollo industrial en la que el país podría estar a la vanguardia a nivel regional.

Los colorantes del tono rojo y naranja son de amplio uso en la industria alimentaria, de medicamentos, cosméticos y textiles, sin embargo la toxicidad al acumularse en el hígado de la mayoría de ellos ha abierto las posibilidades de investigar nuevos colorantes de recursos naturales, esperando que por su origen sean menos tóxicos que los obtenidos sintéticamente. La zarzaparrilla es un producto natural de la biodiversidad centroamericana que recientemente se han desarrollado técnicas para su cultivo evitando la depredación de los bosques y por consiguiente del germoplasma nativo. Se tiene acceso a rizoma de *S. domingensis* obtenido por cultivo para conocer la calidad de sus colores y la aplicabilidad de los mismos con el objetivo de tener una alternativa a los colorantes sintéticos.

IV. OBJETIVOS

A. Generales

1. Determinar el contenido de colorantes presentes en diferentes fracciones químicas del rizoma de *Smilax domingensis*.

B. Específicos

1. Obtener fracciones con disolventes de diferente polaridad del rizoma de *S. domingensis*.
2. Caracterizar los colorantes contenidos en cada una de las fracciones por la técnica de cromatografía en capa fina para flavonoides y antocianinas.
3. Establecer la solubilidad de los extractos en solventes de aplicación industrial.
4. Proponer un esquema de aprovechamiento industrial de los colorantes obtenidos.

V. METODOLOGÍA

A. Determinación del mejor disolvente etanólico y metanólico

La extracción por disolventes se pretendía realizar en dos fases, primero extraer solamente con una solución etanólica y luego con 5 diferentes solventes con diferente polaridad. Para determinar la concentración óptima de etanol y metanol se hizo una prueba a microescala en donde se extrajo de 10 g de materia prima, con 4 concentraciones diferentes, 35%, 50%, 70% y 95% v/v. Se dejó reposar por 24 horas y se decantaron 10 ml de extracto líquido. Los percoladores contenían un pedazo de algodón y un filtro Whatman #1 para evitar que el polvo de la materia prima sea decantado junto con el líquido. Asimismo, los percoladores se taparon con parafilm para evitar que el disolvente se evaporara en las 24 horas que se dejó reposar.

Ilustración No. 1
Método para determinación de mejor disolvente



Los cuatro extractos se colocaron en 4 diferentes crisoles y se evaporó el disolvente en cada uno en un baño de maría y en un contenedor grande que contuvo todos los crisoles. Lo último del disolvente se evaporó en un horno mufla a 100°C por 1 hora. Luego de evaporado el disolvente, los crisoles se pesaron y se determinó la cantidad de sólidos disueltos en el extracto. Así, se determinó que la mezcla etanólica al 50% v/v es la más conveniente para extraer colorantes del rizoma de *S. domingensis*.

Ilustración No. 2
Crisoles utilizados para evaporación de disolvente



B. Extracción de colorantes naturales del rizoma de *S. Domingensis*

La extracción de los colorantes naturales se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales Farmaya y constó de dos etapas principales, la molienda y la extracción de colorantes. La primera etapa se realizó con un molino pequeño y se molió 1 kg de rizoma de *S. Domingensis* hasta una granulometría de mesh 50. La materia prima se introdujo en una bolsa plástica y se guardó a temperatura ambiente para ser utilizada el día siguiente a la molienda. Sabiendo la concentración adecuada para la extracción etanólica se realizaron 3 litros de disolución al 50% v/v, así se procedió a pesar 500 g del rizoma de zarzaparrilla molida anteriormente. Luego, en un percolador de acero inoxidable de 3000 mL se taponó la salida inferior con algodón y se cubrió con un filtro Whatman #1 para evitar que el polvillo de la materia prima cayera del percolador. En un recipiente aparte se humedeció la materia prima con 1000 mL de etanol para evitar la formación de canales preferenciales. Se cargó el percolador con la materia prima húmeda y se completó con más disolvente hasta que el mismo cubriera por completo la fase sólida. El percolador se tapó y se dejó reposar por 24 horas. Al día siguiente, se abrió la llave del percolador y se dejó que el menstuo etanólico cayera a un Erlenmeyer de 1000 ml de capacidad. El extracto se agregó a un balón especial para evaporación y se ensambló al equipo de Rotavapor en el cual se destiló todo el disolvente. Con el disolvente recuperado se hicieron un total de 5 recirculaciones de disolvente, siempre ajustando a 50% con agua desmineralizada, para maximizar la cantidad de extracto. El extracto libre de disolvente fue vertido en un cristalizador y fue colocado en un deshidratador por un

tiempo de 1 mes hasta que cristalizó. El colorante en polvo se pasó por un colador mesh 80, para homogenizar el extracto.

Ilustración No. 3
Equipo Rotavapor para recuperación de disolventes

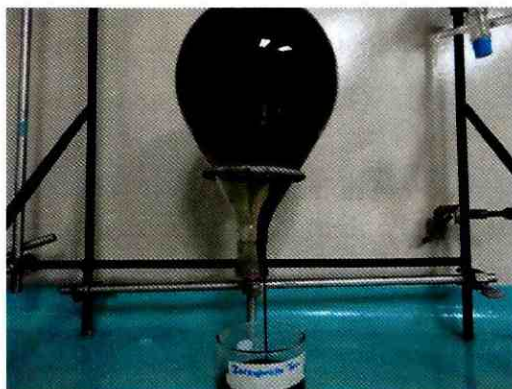


Para la extracción fraccionada se pesaron 300 g de materia prima. El percolador que se utilizó también fue de 3000 ml de capacidad y se taponó con algodón y un filtro Whatman #1. Primero, se humedeció la materia prima con 491 ml de hexano y se cargó el percolador con otros 1022 ml de hexano. El percolador se tapó y se dejó reposar por 24 horas. Al día siguiente se abrió la llave del percolador y se cargó el Rotavapor, se evaporó el hexano con recuperación de disolvente y el extracto blando se vertió en un cristalizador.

La materia prima fue retirada del percolador para evaporar el disolvente que quedaba en el rizoma y luego fue humedecido con el siguiente disolvente. El siguiente disolvente que se utilizó fue cloroformo y se humedeció con 388 ml y 896 ml para cubrir la materia prima. Se siguió el mismo procedimiento que con el hexano y luego se sacó la materia prima del percolador para ser humedecida con 384 ml de acetato de etilo y se cubrió con otros 1008 ml; se siguió el mismo procedimiento anterior. El siguiente disolvente utilizado fue metanol y su utilizaron 450 ml para humedecer y 916 ml para cubrir por completo la fase sólida. Juzgando por el color del extracto líquido que salió del percolador se recirculó el metanol destilado el primer día y se dejó reposar por otras 24 horas, luego se siguió el mismo procedimiento mencionado anteriormente. Finalmente, se utilizó agua desmineralizada como disolvente de la cual se utilizaron 1000

ml para humedecer y 610 ml para completar. Todos los extractos blandos se colocaron en el mismo deshidratador por un período de un mes para dar tiempo a la cristalización.

Ilustración No. 4
Balón utilizado para concentrar colorante



C. Determinación de presencia de flavonoides en el extracto seco

1. Ensayos macro y semimicro. Un gramo de colorante se lava con 20 ml de éter de petróleo hasta que la extracción sea incolora o casi incolora. Disolver el residuo en 30 mL de metanol al 80% (v/v), filtrar y dividir en 7 tubos:

Tubo 1: agregar 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

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

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

Tubo 4: agregar magnesio metálico y 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado.

Tubo 5: agregar un álcali (prueba de amonio) al extracto acuoso.

Tubo 6: agregar solución de ácido bórico en anhídrido acético.

Tubo 7: testigo o control.

Evaluar las reacciones, cambio de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo. Desarrollo inmediato de color flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), Flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); isofavononas, chalconas y auronas no dan coloración.

2. Cromatografía en capa fina (TLC). Pesar 0.1 g de extracto seco y diluir en 10 mL del disolvente que se utilizó para extraer de la materia prima (rizoma de *S. Domingensis*). Aplicar sobre la cromatoplaaca de silicagel 60 F₂₅₄. Como estándar emplear solución de flavonoides al 0.05% en metanol (10 µL). Se utilizaron como estándares quercetina, rutina y ácido clorogénico. Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico. Ácido acético glacial-agua (100:11:11:27).

Ilustración No. 5
Cromatoplaaca antes de ingresar a la cámara de fase móvil

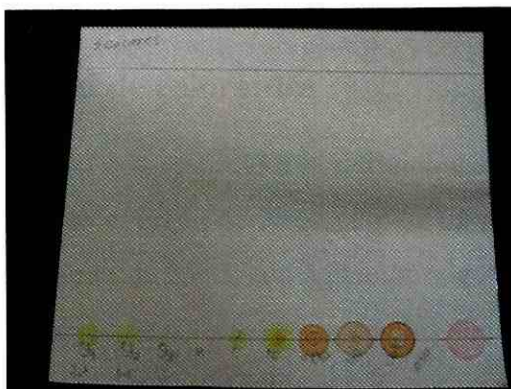


Ilustración No. 6
Cámara para fase móvil



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

Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG). Fluorescencia intensa en UV-365 nm.

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

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

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

Separación: Se realizará en una placa de cromatografía de silica gel con indicador de fluorescencia. Depositar 10 microlitros de cada extracto y 10 microlitros de 3 estándares. Previamente preparar el fase móvil para flavonoides, y poner a una altura de 2cm en una cámara de cromatografía, tapar. Se deja migrar hasta 1 cm antes que termine la placa, desecar y desarrollar. Visualizar en una cámara de luz UV y marcar las bandas; luego desarrollar con reactivo especial para flavonoides. Secar la placa, medir la distancia recorrida por la mancha y calcular el Rf de los estándares y de los extractos. (Wagner & Blatt, 2001)

D. Pruebas de solubilidad de colorantes

La solubilidad se midió con respecto a la definición de solubilidad de la USP la cual define la solubilidad como el grado de disolución de un polvo dentro de 30 minutos en un disolvente a la temperatura de 25°C, con agitación vigorosa durante 30 segundos a intervalos de 5 minutos. Esta propiedad se expresa con los siguientes términos

Tabla No. 3
Criterios de solubilidad

Términos	Partes de disolvente en volumen requeridas para 1 parte de soluto
Muy soluble	Menos de 1 parte
Fácilmente soluble	De 1 a 10 partes
Soluble	De 11 a 30 partes
Poco soluble	De 31 a 100 partes
Ligeramente soluble	De 101 a 1000 partes
Muy ligeramente soluble	De 1001 a 10,000 partes
Casi insoluble	Más de 10,000 partes

Los disolventes que se utilizaron fue agua desmineralizada y etanol al 35, 50, 70 y 95% (v/v).

E. Pruebas de teñido

Se pesó una cantidad de hilo de algodón virgen para teñir con tres diferentes concentraciones de colorante. Se utilizó el 100% del peso del hilo en rizoma de S.

domingensis sin tratamiento, 50% del peso del hilo en extracto seco y 25% del peso del hilo también en extracto seco.

Ilustración No. 7
Baño de colorante



El hilo se remojó en agua a 60°C por 20 minutos para liberar todo el aire atrapado en la fibra y asegurar la tinción máxima. Para hacer la disolución del colorante se utilizó un volumen 30 veces mayor que el peso inicial del hilo de algodón. Este volumen se calentó a ebullición y se dejó reposar por veinte minutos para solubilizar o extraer el colorante deseado. Luego que han transcurrido 20 minutos, la mezcla de colorante se filtró para evitar que los granos de colorante se impregnaran al hilo y lo mancharan. La mezcla de colorante se deja llegar a 80°C y se depositó el hilo dentro del baño de colorante. La temperatura se mantuvo a 80°C y el hilo dentro del baño por 20 minutos. Luego de este tiempo, el hilo se sacó del baño de colorante y se dejó enfriar.

Ilustración No. 8
Hilo de algodón virgen



En un recipiente aparte se disolvió sulfato de cobre en un volumen de agua 20 veces más que el peso de la tela. El sulfato de cobre actuó como mordiente para garantizar que el hilo absorbiera la mayor cantidad posible de pigmento. Luego que se

enfrió el hilo, éste se exprimió y se lavó con agua limpia hasta que dejará de colorear el agua. Se exprimió una segunda vez para quitar el exceso de agua y se vertió el hilo dentro del baño de mordiente; se dejó reposar por 20 minutos. Luego de transcurridos los 20 minutos, se sacó el hilo y se volvió a lavar con agua limpia para remover el excedente de mordiente. Se exprimió el hilo y se vertió de nuevo en el baño de colorante. El procedimiento anterior, se realizó una última vez.

Ilustración No. 9
Baño de mordiente sulfato de cobre



Finalmente, el hilo se sacó del baño de colorante y se dejó enfriar. El hilo se exprimió y se lavó en agua limpia para garantizar que todo el exceso de colorante que pudiera manchar el hilo se removiera. El hilo se dejó secar por 24 horas a temperatura ambiente.

F. Pruebas de color

Se hizo una dilución al 10% (p/v) de los extractos secos metanólico, acuoso y etanólico. De las diferentes mezclas se sacaron gotas para ser añadidas a un pedazo de papel filtro. Se agregaron un total de 3 gotas en cada papel, y éste se dejó secar por 24 horas. Los colorantes secos se compararon con un Pantone para determinar qué color podrían reemplazar en la industria.

G. Materiales y equipo:

Balanza analítica

Estufa eléctrica

Mortero de porcelana
Pistilo de porcelana
Pliego de película plástica (parafilm)
Pliego de papel filtro Whatman No. 1
Embudo
Espectrofotómetro UV-Visible
Molino
Cromatofolios de silica gel
Cámaras cromatográficas
Asperjador de vidrio
Rotaevaporador
Percolador de acero inoxidable
Desecadora
Equipo para reflujo

H. Reactivos

Etanol 95%
Acido clorhídrico concentrado 37.5%
Hexano 99.98%
Cloroformo 99.99%
Acetato de Etilo 99.99%
Metanol 98.9%
Solución de Etanol al 50%
Agua desmineralizada
Disolventes, reactivos y estándares para análisis cromatográfico para flavonoides.

I. Cristalería

Erlenmeyer de 1L para precipitar
Vasos de acero inoxidable de 1L

Probeta de 250 mL

Probeta de 50 ml

Probeta de 25 ml

Probeta de 10 ml

Pipetas volumétricas TD 10 ml

Tubos de ensayo 30 ml

VI. RESULTADOS

Tabla No. 4
Rendimiento de extracción con etanol al 50%

Peso de extracto seco	Rendimiento
161.15	32.23 ± 0.02%

Tabla No. 5
Rendimiento de extracción fraccionada

Disolvente	Peso extracto seco (0.002 g)	Rendimiento (±0.020%)
Hexano	0.374	0.125
Cloroformo	0.488	0.163
Acetato de Etilo	1.071	0.357
Metanol	48.39	16.130
Agua Desmineralizada	10.149	3.383
Extracción total	60.472	20.160

Tabla No. 6
Ensayos macro para determinación de flavonoides y antocianinas

Extracto	Prueba	Resultado	Observación
Metanólico	Cloruro Férrico	Azul oscuro	Presencia de flavonoides tipo flavonas
	Hidróxido de Amonio	Rojo magenta	Presencia de flavonoides tipo flavanonoles
Acuoso	Cloruro Férrico	Azul oscuro	Presencia de flavonoides tipo flavonas
	Hidróxido de Amonio	Rojo magenta	Presencia de flavonoides tipo flavanonoles
Etanólico	Cloruro Férrico	Azul oscuro	Presencia de flavonoides tipo flavonas
	Hidróxido de Amonio	Rojo magenta	Presencia de flavonoides tipo flavanonoles

Tabla No. 7
Cromatografía de Capa Fina

Extracto	Resultados	Rf.	Interpretación
Estándar de Rutina	Presenta dos banda En UV 354 nm: Verde En Visible:	0.21, 0.67	
Estándar de Quercetina	Presenta una banda En UV 354 nm: Fluorescencia celeste En Visible: incoloro	0.91	
Estándar de Ácido Clorogénico	Presenta una banda En UV 354 nm: Naranja pálido y celeste En Visible: incoloro	0.96	
Hexánico	Presenta una banda En UV 354 nm: Naranja pálido y celeste En Visible: incoloro	0.95	Presencia de ácido clorogénico por coincidir el Rf y el color de fluorescencia.
Clorofórmico	Presenta dos bandas En UV 354 nm: Celeste y naranja En Visible: Verde	0.87, 0.96	Presencia de ácido clorogénico por coincidir el Rf y el color de fluorescencia.
Acetato de Etilo	Presenta dos bandas En UV 354 nm: Verde y celeste En Visible: Café	0.60, 0.92	No se puede concluir con certeza que se encuentra alguno de los tres estándares utilizados.
Metanólico	Presenta dos bandas En UV 354 nm: Verde y naranja con celeste En Visible: Café	0.63, 0.97	Posible presencia de Rutina por coincidir el Rf y color de fluorescencia. Presencia de ácido clorogénico.
Acuoso	Presenta tres bandas En UV 354 nm: Verde y celeste En Visible: Café	0.25, 0.64, 0.97	Presencia de Rutina y ácido clorogénico por coincidir el Rf y color de fluorescencia.
Etanólico	Presenta dos bandas En UV 354 nm: Verde y celeste En Visible: Café	0.65, 0.96	Presencia de Rutina y ácido clorogénico por coincidir el Rf y color de fluorescencia.
Rojo # 40	Presenta 1 banda En UV 354 nm: No muestra fluorescencia En Visible: Rojo	0.18	No coincide con ningún estándar, no contiene flavonoides ni antocianinas.

Ilustración No. 10
Cromatoplaqa revelada en visible

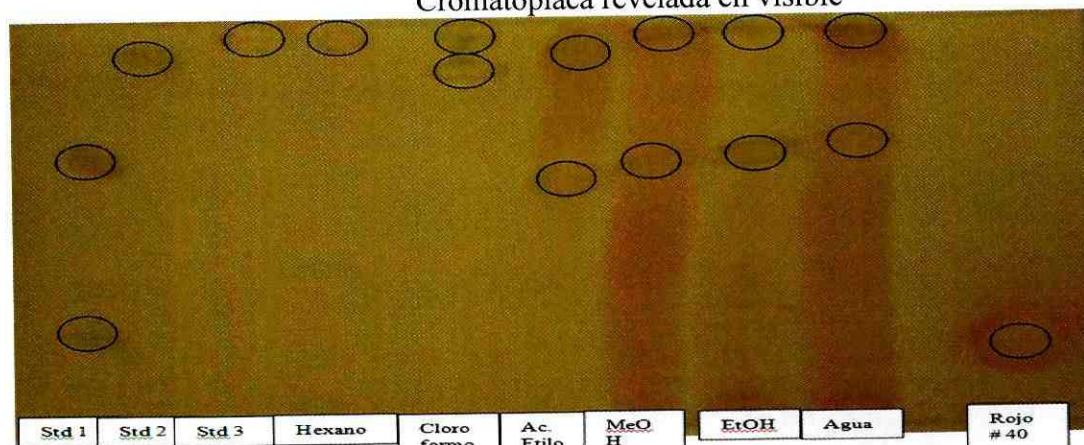


Ilustración No. 11
Cromatoplaqa revelada en UV 354 nm

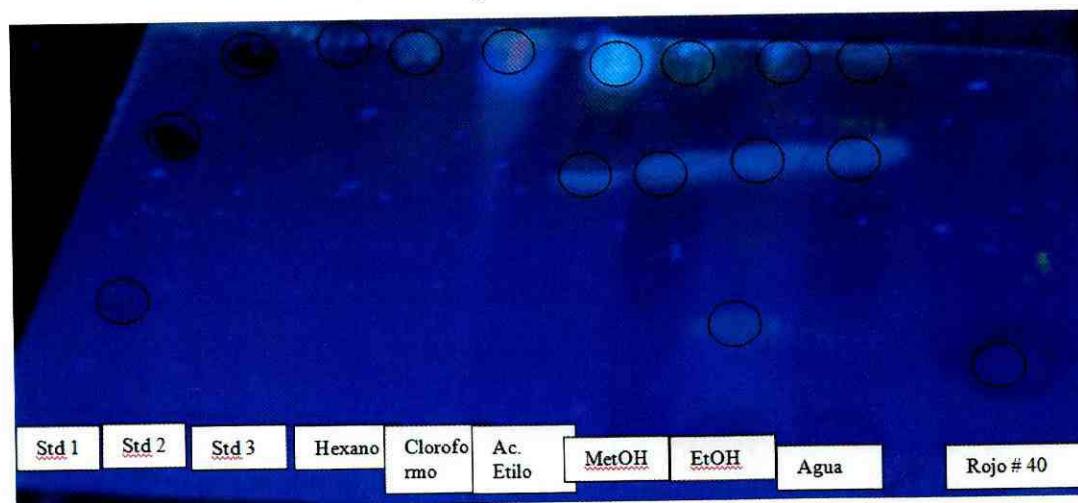


Tabla No. 8
Solubilidad de los extractos secos

Extracto	Agua desmineralizada	Etanol al 35%	Etanol al 50%	Etanol al 70%	Etanol al 95%
Agua desmineralizada	Fácilmente soluble	Fácilmente soluble	Fácilmente soluble	Soluble	Soluble
Etanol	Casi insoluble	Muy soluble	Muy soluble	Muy soluble	Poco soluble
Metanol	Casi insoluble	Muy soluble	Muy soluble	Muy soluble	Poco soluble

Tabla No. 9
Pruebas de teñido





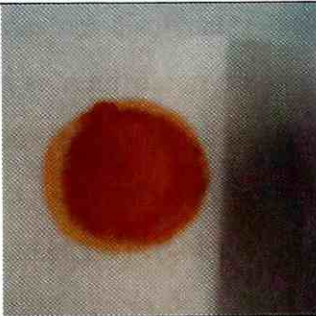



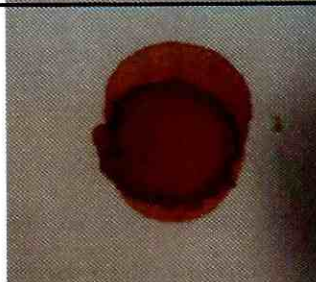

Porcentaje de colorante (p/p)		Costo por 20 g de hilo	Resultado
100%	Rizoma molido	Q0.86	
50%	Extracto etanólico seco	Q4.00	
25%	Extracto etanólico seco	Q 2.00	
Comparación entre los tres hilos (50%, 25%, rizoma)			

Tabla No. 10
Comparación de color

Extracto	Resultado	Color industrial Pantone Comex
Metanólico		 África Código: G3-12
Acuoso		 África Código: G3-12
Etanólico		 África Código: G3-12

VII. DISCUSIÓN

Se realizaron dos extracciones por disolventes orgánicos y agua al rizoma molido de *S. domingensis*, una extracción se realizó con una solución de etanol al 50% (v/v) con recirculación de disolvente y otra extracción fraccionada con 5 disolventes de diferente polaridad para garantizar que se extrajera la mayor cantidad de moléculas colorantes. Ambas extracciones se realizaron en un percolador de acero inoxidable puesto que es una técnica que agota las moléculas de interés de la materia prima vegetal. Para remover el disolvente del extracto se utilizó un sistema de rotaevaporador puesto que éste garantiza la remoción completa de disolvente así como la recuperación del mismo. El objetivo general de este trabajo se cumplió casi en su totalidad con el procedimiento de extracción por percolación puesto que se logró determinar el rendimiento de diferentes disolventes en cuanto a la extracción de compuestos colorantes del rizoma de *S. domingensis*.

La concentración etanólica adecuada se seleccionó a partir de una técnica para evaluar el mejor disolvente en donde se probaron cuatro concentraciones etanólicas diferentes para determinar en qué solución se extraían la mayor cantidad de sólidos. Se determinó que la mayor cantidad de sólidos disueltos se encontraba en el disolvente al 50%. Este mismo procedimiento se realizó para el metanol y se determinó que el mejor disolvente es también una dilución metanólica al 50%. Sin embargo, se observó que el rendimiento de extracción de la dilución etanólica es dos veces mayor que el rendimiento de la extracción metanólica. Así se decidió que convenía realizar una extracción total con etanol y el metanol utilizarlo para la extracción fraccionada.

Para la extracción etanólica total se realizó mismo procedimiento que se realizó para el percolador micro, con 500 g de rizoma molido de *S. domingensis*. Se utilizaron 4 L de solución virgen, 3 L en el primer día y 1 L en el segundo día. Luego del segundo día solamente se utilizó el alcohol destilado que salía del sistema de rotaevaporador, siempre ajustando la concentración a 50% con agua desmineralizada. Para el día 5 de extracción,

se determinó que se extrajeron solamente 6.36 g de sólidos, lo que equivale a un $1.27 \pm 0.02\%$ de rendimiento, lo cual es un rendimiento sumamente bajo, por lo que se decidió ya no continuar recirculando disolvente, considerándose la droga vegetal prácticamente agotada. El extracto blando, libre de disolvente se alcanzó en el día ocho, dicho extracto se colocó en un cristalizador y se deshidrató para remover los restos del disolvente. Se lograron extraer 161.15 ± 0.001 g de colorante seco lo que significa un rendimiento de extracción de $32.23 \pm 0.02\%$, el cual es mucho mayor que el extracto metanólico y el total del extracto por extracción fraccionada. El balance de masa en la extracción etanólica muestra que del volumen inicial agregado, solamente se lograron recuperar 2.992 L, lo que significa que 1.008 L se perdieron entre la materia vegetal, en la destilación o en el extracto blando, antes de deshidratarse. Asimismo, se puede notar que 338.85 g de materia vegetal quedó en el percolador, dejando así los 161.15 g de extracto seco que se habló anteriormente.

La segunda extracción se llevó a cabo en forma fraccionada con cinco disolventes diferentes que fueron hexano, cloroformo, acetato de etilo, metanol y agua desmineralizada, utilizados en ese orden. El orden en que estos se agregaron se decidió del disolvente con menor polaridad al que tiene la mayor polaridad, esto con el fin de garantizar que todos los compuestos que dan color se extrajeran de la materia prima, así como seleccionar el disolvente más eficiente para extracción de colorantes. Todos los disolventes se dejaron reposar por 24 horas y luego fue decantado el extracto líquido para pasar al sistema de evaporación y recuperación de disolvente.

Como se muestra en la Tabla No. 4, en la página 26, el rendimiento más alto lo obtuvo la extracción metanólica, ya que se lograron extraer 48.39 ± 0.002 g de los 300 g iniciales, lo que equivale a un rendimiento de $16.13 \pm 0.02\%$. Es de importancia resaltar que el metanol recuperado del rotavapor se recirculó una vez puesto que se observó que el color del extracto era intenso. Luego de esa primera recirculación, la tonalidad del extracto líquido disminuyó considerablemente por lo que se decidió no continuar recirculando metanol. Por el bajo rendimiento que se obtuvo al final de la deshidratación, se puede asegurar que la decisión de ya no continuar recirculando fue la correcta. Esto

comprueba que el etanol es el mejor disolvente para extraer colorantes del rizoma de *S. domingensis* puesto que es el menos tóxico de todos los solventes utilizados, a excepción del agua desmineralizada, y es el que extrae la mayor cantidad de colorante. Al mismo tiempo el etanol se produce localmente y es un producto de la fermentación agroindustrial lo que hace que sea más conveniente que el metanol, con respecto a obtención y manejo del mismo. Se podría discutir que si el metanol se hubiera recirculado más de una vez habría dado un rendimiento parecido a la extracción etanólica, sin embargo, basándose en los resultados de las pruebas de mejor disolvente se optó por no recircular y no hacer una dilución metanólica, puesto que en la extracción fraccionada es necesario utilizar todos los disolventes en su estado más puro.

El rendimiento más bajo se obtuvo con el hexano, ya que solamente se logró extraer 0.374 ± 0.002 g, es decir un $0.13 \pm 0.02\%$. Este extracto presentaba una apariencia y consistencia pegajosa y totalmente incolora por lo que en el aprovechamiento de los colorantes contenidos en el rizoma de *S. domingensis*, este extracto es despreciable.

En cuanto a los otros tres extractos cabe resaltar los resultados de los extractos obtenidos del acetato de etilo y agua desmineralizada. Ambos extractos presentaron una coloración rojiza, sin embargo el rendimiento del extracto que se obtuvo con acetato de etilo como disolvente es bastante bajo, y su consistencia muy parecida a la de un aceite hicieron imposible su cristalización por lo que se puede concluir que este extracto no tiene posibilidad de aplicación, por lo menos bajo los estándares impuestos por los objetivos de este trabajo. En cuanto al extracto acuoso, la coloración fue muy parecida a la de los extractos líquidos etanólico y metanólico, sin embargo el rendimiento es bastante más bajo que el de los dos alcoholes, por lo que se puede concluir que no es el disolvente más adecuado para la extracción de colorantes en los rizomas de *S. domingensis*. Es importante resaltar que no se decidió recircular el agua en el extracto acuoso puesto que la coloración del extracto líquido era más pálida que aquella del extracto líquido metanólico. Finalmente, el extracto obtenido con cloroformo como disolvente presentó una coloración verde, así como una apariencia y consistencia

grasosas. El simple hecho que el extracto haya salido de color verde fue un primer indicio que el extracto no contiene flavonoides, antocianinas o cualquier molécula natural que de una coloración roja o naranja como se buscaba. Además, este extracto tampoco cristalizó y su rendimiento fue muy bajo por lo que se puede decir que su aplicación es nula o casi nula.

En cuanto a los costos de extracción, éstos se muestran en las Tablas No. 34 y 35 en la página 56. La extracción etanólica tuvo un costo total de Q0.40/g de colorante. Obviamente, el costo más elevado es el del uso de la energía eléctrica puesto que el Rotavapor se utilizó bastante tiempo para poder concentrar el extracto. El costo total de la extracción fraccionada fue de Q314.74/ g de colorante, dato que si se compara con el costo de extracción etanólica, solamente resalta el hecho que el etanol al 50% es el disolvente más conveniente para la extracción de colorantes del rizoma de *S. domingensis*. Sin embargo, también deben compararse los costos totales del extracto metanólico y etanólico puesto que estos disolventes son con los que se obtuvieron los rendimientos más altos. Aunque la extracción etanólica fue menos costosa que la metanólica, es importante resaltar que el costo de extracción con metanol no es tan elevado, lo que hace que el metanol siempre sea una opción en cuanto a la extracción con disolventes. Ahora bien, se puede notar por balance de masa de las diferentes extracciones por separado, que no se perdió tanto disolvente en el proceso de extracción fraccionada como en la extracción etanólica, sin embargo el rendimiento de extracción no fue alto por lo que siempre se debe optar por el uso de etanol como disolvente.

Con los resultados obtenidos de la extracción fraccionada se puede concluir que la mayoría o la parte más significativa de los colorantes contenidos en el rizoma de zarzaparrilla se encuentran en la fracción metanólica. Esto es de suma importancia puesto que deja concluir que no es necesario extraer con ningún otro disolvente que no sean los alcoholes utilizados en el presente trabajo. De esta manera se pueden comparar directamente las extracciones metanólica y etanólica.

Para la caracterización de las moléculas colorantes contenidas en los 6 diferentes extractos obtenidos se realizaron dos pruebas, un ensayo macro y un ensayo semimicro. Los ensayos macro solamente se realizaron a los extractos etanólico, metanólico y acuoso. Esto fue porque la cantidad obtenida de extracto seco hexánico y clorofórmico fue muy baja y, aunque la coloración del extracto de acetato de etilo fue la adecuada, el rendimiento que se obtuvo fue discriminación suficiente para no realizar estas pruebas. Por otro lado, la cromatografía de capa fina o ensayo semimicro si se realizó para todos los extractos.

Las pruebas macro muestran presencia de flavonas y flavanoles en los tres extractos a los que se sometió la prueba. Esto quiere decir que aunque los rendimientos de los tres extractos fueron diferentes, la composición del extracto seco es muy similar. Las pruebas semimicro muestra que existe la posibilidad que haya ácido clorogénico en los extractos hexánico y clorofórmico. Sin embargo, aunque es una molécula de flavonoides, el ácido clorogénico es incoloro, por lo que no tiene aplicación en la industria de los colorantes, aunque si es un anti inflamatorio lo que lo hace ideal en el uso de los productos fitoterápicos. Asimismo, se muestra la posible presencia de quercetina en el extracto de acetato de etilo dada la coloración y R_f mostrado por la segunda mancha. Para los extractos metanólico, etanólico y acuoso se muestra que en los tres hay presencia de rutina puesto que coinciden en el R_f de esta molécula, asimismo, la fluorescencia que los tres extractos desplegaron es característica de flavonoides. Asimismo, los tres extractos contienen ácido clorogénico, pero como se mencionó antes, éste no tiene aplicación en la industria de los colorantes, aunque si funciona como un antioxidante por lo que podría explotarse en otros aspectos. En cuanto al Rojo # 40, se demostró que no contiene flavonoides y no es comparable con los extractos obtenidos o con los estándares utilizados. En cuanto a la caracterización de antocianinas no se encontró evidencia que exista en los extractos obtenidos, por lo menos en una cantidad apreciable. Esto es porque tanto la fluorescencia como las pruebas macro no dan indicio que existan estos compuestos en los extractos.

Para determinar las diferentes aplicaciones de los extractos se determinó la solubilidad de los tres extractos en los que más rendimiento se obtuvo. Como se muestra en la Tabla No. 7, en la página 27, los extractos metanólico y etanólico son muy solubles, un 100% se podría decir, en diluciones etanólicas como las que se muestran en la misma tabla. Sin embargo, estos extractos son casi insolubles en agua, lo que complicaría su aprovechamiento en la industria de alimentos puesto que muchos alimentos que llevan color no contienen etanol. En cuanto al extracto acuoso, es fácilmente soluble en agua y en etanol al 35%, lo que hace que éste extracto sea aplicable en la industria de alimentos de una forma bastante sencilla puesto que en esta industria el solvente más utilizado es el agua, y en algunos casos diluciones etanólicas, por ejemplo para bebidas embriagantes. Sin embargo en procesos que requieren un alto contenido alcohólico, este extracto sería difícil de aplicar puesto que se necesitaría que disolver el colorante antes en una base completamente acuosa y luego aplicar el alcohol, siempre con el riesgo de que la mezcla se separe. Por otro lado, es fácil concluir que cualquiera de los tres extractos mencionados anteriormente, puede ser aplicado como colorante en la industria de los alimentos procesados o como un condimento que agregue valor nutricional a la comida. A su vez, en la industria de bebidas refrescantes, por ejemplo la cerveza de raíz, la cual se basa en la raíz de la zarzaparrilla.

Otra aplicación interesante sería como color de las tabletas o comprimidos en la industria farmacéutica puesto que ya no se tendría que recurrir a pigmentos o colorantes fuertes que pueden dañar el organismo. Esta aplicación se debe comprobar puesto que no se sabe con exactitud la estabilidad de los colorantes obtenidos en un rango amplio de pH así como de temperatura. Además, en la industria de los biocosméticos el colorante obtenido no sólo ayudaría al color del cosmético sino a su actividad anti inflamatorio y antioxidante. En los cosméticos se podría aplicar tanto a cremas, geles, lociones y tratamiento para el cabello.

Aunque se demostró la presencia de flavonoides en los extractos que dieron un alto rendimiento, también se hizo una prueba de coloración. Los tres extractos fueron aplicados en un 10% sobre papel filtro y fueron comparados con estándares de colores

utilizados por la industria. Los resultados se muestran en la Tabla No. 10, en la página 30, y se puede ver que el color está entre café y naranja. Comparados con el Pantone de Comex el color que más se parece al de los extractos es el color “África” con código G3-13. Esto permite concluir algo muy importante que es que aunque si existen colorantes de tipo flavonoides no existen los rojos o naranjas que se esperaban encontrar, aunque si tonos de los mismos lo cual deja concluir como muy satisfactorios los resultados de este trabajo. Aunque a primera vista el colorante natural extraído del rizoma de *S. domingensis* no es un sustituto para los rojos o naranjas de la industria, con base experimental el colorante obtenido se puede llegar a dar los tonos que se quiera dependiendo de la base del producto que se utilice.

Otra aplicación importante de los colorantes, o en este caso pigmentos, es la tinción de hilo. En el caso de este trabajo se trabajó con hilo de algodón virgen y se comparó la coloración del rizoma molido y 2 concentraciones diferentes del extracto etanólico. Solamente se utilizó el extracto etanólico puesto que es el extracto seco que más rendimiento obtuvo y que se sugiere es el más aprovechable a nivel industrial. Los resultados muestran que incluso a una concentración del 25% de colorante sobre el peso del hilo, la coloración es más intensa que la del rizoma molido. Esto puede ser muy beneficioso para la industria textil, puesto que se contaría con un pigmento natural, biodegradable que es más fácilmente manejable que el rizoma de *S. domingensis*. Sin embargo, también se deben tomar en cuenta los costos de obtención del colorante y utilización del mismo. Se puede notar en la Tabla No. 35 que los costos de tinción con extracto, con una base de 20 g para todas las tinciones, son más elevados que para la tinción solamente con rizoma molido. Ahora bien, se puede notar en la Tabla No. 8, de la página 28, que el color de la primera tinción es más pálido que el de las otras dos tinciones, por lo que se necesita utilizar menos extracto seco para llegar al mismo color que con el rizoma molido. Aunque no se puede decir con certeza que los costos de la tinción con extracto serían menos elevados que los costos con rizoma molido, si se puede aseverar que el manejo del extracto seco es más sencillo que el rizoma puesto que no necesita filtrarse el baño de colorante puesto que a esta temperatura el extracto se disuelve con facilidad.

Las fuentes de error que pudieron haber causado un impacto en los resultados obtenidos se encuentran en la medición de los volúmenes de agua y etanol para preparar la solución de etanol al 50% (v/v) puesto que si no se contaba con una dilución a esta concentración, se puede tener una baja en el rendimiento de extracción. Asimismo, en el cálculo del Rf en la Cromatografía de Capa Fina puesto que si no se medía bien se podía optar por concluir que el algún extracto no coincidía con los estándares utilizados y por lo tanto no contiene moléculas de los flavonoides que se utilizaron como estándar.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se determinó que el etanol es el disolvente más adecuado para extraer colorantes del rizoma de *S. domingensis* ya que se obtuvo un 32.2% de rendimiento del colorante.
2. Se determinó que con una extracción fraccionada, se obtienen un 20.2% de rendimiento del colorante.
3. Se determinó que el disolvente menos adecuado para extraer colorantes del rizoma de *S. domingensis* es el hexano ya que sólo obtuvo un 0.125% de rendimiento seguido por el Cloroformo con un 0.163%.
4. Se determinó que existen flavonoides en los extractos secos del rizoma de *S. domingensis*, sobre todo rutina, ácido clorogénico, flavonas y flavanones.
5. Los resultados de la extracción fraccionada demuestran que todos los colorantes contenidos en el rizoma de *S. domingensis* se encuentran en la fracción metanólica y una pequeña porción en la fracción acuosa.
6. El costo de extracción etanólica fue de Q0.40/g de colorante y es mucho más bajo que el costo de extracción metanólica que fue de Q1.96/g de colorante.
7. Los extractos metanólico y etanólico son muy solubles en toda la gama de diluciones etanólicas y son fácilmente aplicables en industrias que utilizan etanol como disolvente. El extracto acuoso es fácilmente soluble en agua lo que hace que sea conveniente para la industria alimenticia.
8. Otras industrias en donde se puede aplicar los colorantes obtenidos son la industria de alimentos, de refrescos, biocosméticos y medicamentos.
9. El color obtenido de una dilución de los extractos es el África del Pantone de Comex, código número G3-12 el cual está dentro de la especificación de los tonos rojos y naranjas que se buscaba.
10. Se obtiene un color más intenso en la tinción de hilo de algodón con un peso de extracto seco del 50 y 25% del peso del hilo utilizados como pigmentos, que un pigmento que consiste de 100% del peso del hilo en rizoma molido.

IX. RECOMENDACIONES

1. Realizar un análisis de espectrofotometría UV-VIS y en el HPLC (High Performance Liquid Chromatography) para cuantificar la cantidad de flavonoides presentes en los diferentes extractos.
2. Utilizar otras técnicas de análisis para determinar si el contenido de antocianinas en el rizoma de *S. domingensis* es realmente despreciable.
3. Aislar y caracterizar los flavonoides para comprobar si en forma aislada se mejora su capacidad colorante y su estabilidad.
4. Realizar pruebas de estabilidad de color de los extractos en los productos terminados de las diferentes industrias que se habló, por ejemplo en diferentes rangos de pH, temperatura y tiempo de contacto con el producto.
5. Seguir buscando una fuente de rojos en los productos naturales para sustituir los rojos sintéticos utilizados en la actualidad.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Cáceres, A. (2009). *Vademécum Nacional de Plantas Medicinales*. Guatemala: Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Corporation, Merck. (2000). *The Merck Index*. New Jersey: Chapman & Hall.
- del Cid Vásquez, H. E. (2004). *Extracción, a nivel del laboratorio, de los pigmentos colorantes del tipo flavonoides contenidos en la flor del subín (Acacia farnesiana L. Wild) proveniente de un bosque silvestre Guatemalteco*. Guatemala: del Cid Vásquez, Henry Estuardo.
- Gómez-Plaza, E., Miñano, A., & López-Roca, J. M. (2006). Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. *Food Chemistry* , 87-94.
- Gustav, F. (1980). *Pigments in Plants* (Segunda ed.). New York, E.E.U.U.: VEB.
- Hendry, G. (1996). *Natural Food Colorants*. Inglaterra: Blackie Academic & Professional.
- Lock Sing de Ugaz, O. (1997). *Colorantes Naturales*. Perú: Pontifica Universidad Católica del Perú.
- M. Rubinskiene, P. V. (2005). Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. *Food Research International* , 867-871.
- S. Martínez-Flórez, J. G.-G. (2002). *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*. León: Universidad de León.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Santafé de Bogotá: Convenio andrés Bello.
- Sherma, J., & Fried, B. (2003). *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- United States Pharmacopea. (2007). *Farmacopea de los Estados Unidos de America*. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention.
- Wagner, H., & Bladt, S. (2001). *Plant Drug Analysis*. New York: Springer.

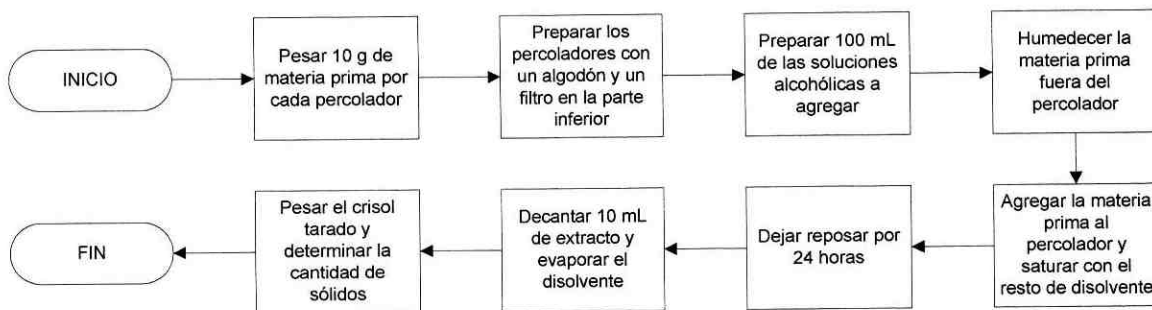
XI. APÉNDICE

A. Procedimiento

1. Determinación del mejor disolvente alcohólico

Ilustración No. 12

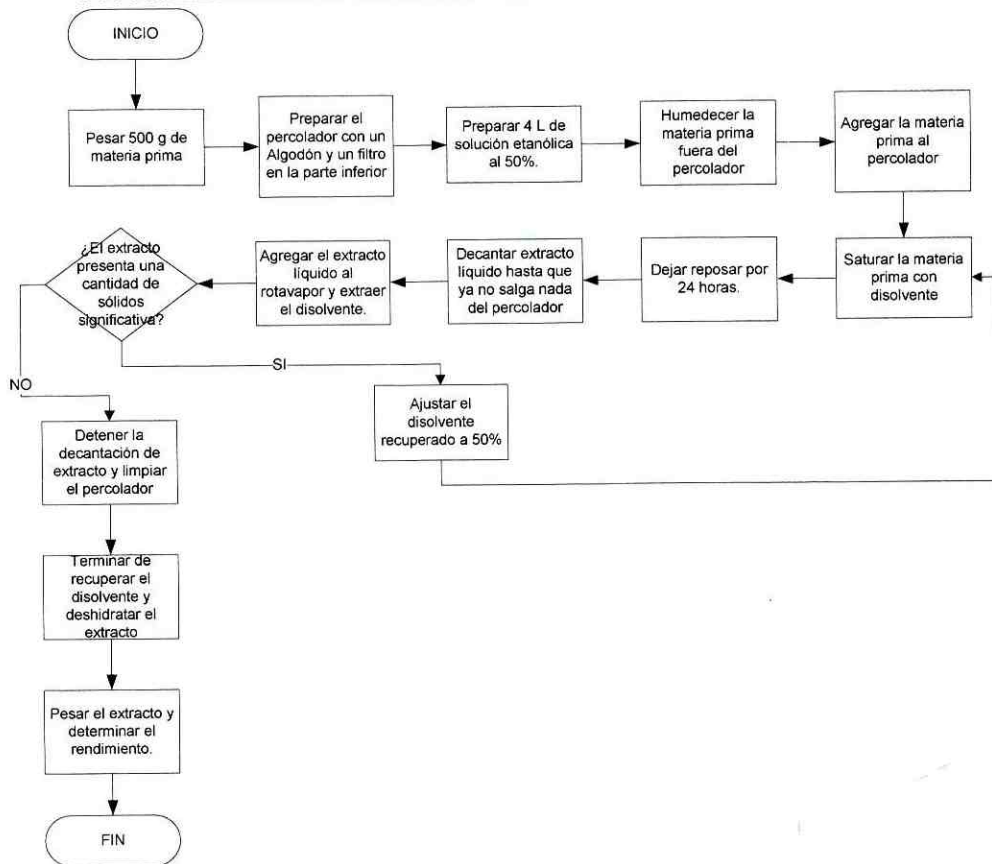
Procedimiento para la determinación de mejor disolvente



2. Extracción de colorantes naturales con etanol

Ilustración No. 13

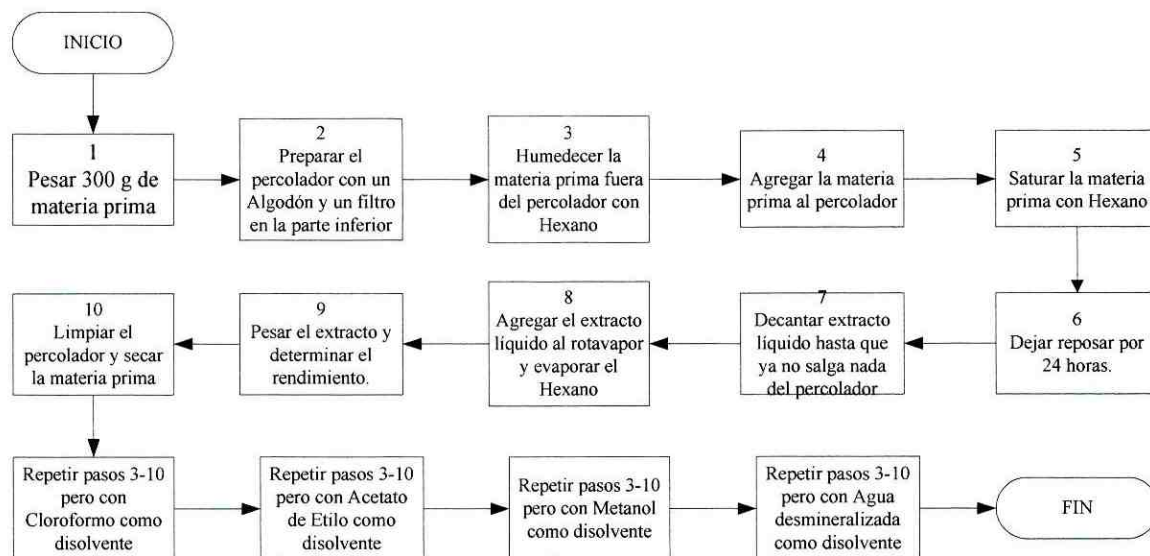
Procedimiento de la extracción etanólica de colorantes naturales



3. Extracción de colorantes naturales con etanol

Ilustración No. 14

Procedimiento de la extracción fraccionada de colorantes naturales



B. Datos originales

Tabla No. 11

Datos para determinar el mejor disolvente etanólico

Volumen de etanol	100.0 ± 0.5 mL
Concentración etanólica inicial	95% v/v
Volumen de muestra	10 ± 0.05 mL
Peso materia prima	10.000 ± 0.001 g

Tabla No. 12

Datos para determinar el mejor disolvente metanólico

Volumen de etanol	100.0 ± 0.5 mL
Concentración etanólica inicial	99.8% v/v
Volumen de muestra	10 ± 0.05 mL
Peso materia prima	10.000 ± 0.001 g

Tabla No. 13
 Datos recolectados de la prueba de mejor disolvente etanólico

Concentración Etanólica (v/v)	Volumen de Etanol (± 0.05 mL)	Peso crisol (± 0.001 g)	Peso total (± 0.001 g)
35%	36.80	27.797	28.148
50%	52.60	26.591	26.991
70%	73.70	24.342	24.726
95%	1000.00	26.195	26.372

Tabla No. 14
 Datos recolectados de la prueba de mejor disolvente metanólico

Concentración (v/v)	Volumen de (± 0.05 mL)	Peso crisol (± 0.001 g)	Peso total (± 0.001 g)
35%	35	27.810	28.004
50%	50	35.120	35.322
70%	70	36.018	36.204

Tabla No. 15
 Datos de la extracción etanólica con etanol al 50%

Peso inicial de rizoma de <i>S. domingensis</i>	Volumen de etanol 50% agregado	Horas de destilación	Volumen de etanol 50% destilado
500.0 \pm 0.1 g	4 \pm 0.1 L	21	2.992 \pm 0.1 L

Tabla No. 16
 Datos luego del 5to día de extracción de sólidos totales con etanol al 50%

Volumen de muestra	Peso Crisol	Peso Total
10 \pm 0.5 mL	35.115 \pm 0.001 g	35.168 \pm 0.001 g

Tabla No. 17
Datos de la extracción fraccionada

Peso de rizoma de <i>S. Domingensis</i> : 300.0 ±0.1 g						
Disolvente	Volumen agregado (±0.5mL)	Volumen decantado (±0.5mL)	Volumen destilado (±0.5mL)	Horas de destilación	Peso cristizador (±0.001 g)	Peso muestra + cristizador (±0.001 g)
Hexano	1,513.0	1,150.0	1,149.0	2	35.652	36.026
Cloroformo	1,284.0	1,100.0	1,062.0	2	44.063	44.551
Acetato de Etilo	1,392.0	1,275.0	1,210.0	2	43.660	44.731
Metanol	2,416.0	2,120.0	2,020.0	4	121.360	169.750
Agua	1,610.0	1,300.0	1,170.0	3	207.208	217.357

Tabla No. 18
Datos de la Cromatografía de Capa Fina de los estándares utilizados

Estándar	Banda	Fluorescencia	Recorrido (±0.05 cm)
Rutina	1	Verde	1.60
	2	Verde pálido	5.00
Quercetina	1	Celeste	6.80
Ácido Clorogénico	1	Naranja pálido/ celeste	7.20

Tabla No. 19
Datos de la Cromatografía de Capa Fina de los diferentes extractos

Extracto	Banda	Fluorescencia	Recorrido (±0.05 cm)
Hexano	1	Naranja pálido/ celeste	7.15
Cloroformo	1	Celeste	6.55
	2	Naranja	7.20
Acetato de Etilo	1	Verde	4.50
	2	Celeste	6.90
Metanol	1	Verde	4.70
	2	Naranja/celeste	7.25
Agua Desmineralizada	1	Verde pálido	1.9
	2	Verde	4.8
	3	Celeste	7.31
Etanol	1	Verde	4.9
	2	Naranja/celeste	7.2
Rojo # 40	1	Rojo	1.35

Tabla No. 20
Ensayos macro para determinación de flavonoides

Prueba	Extracto	Resultado	Tipo de Molécula
Ácido Sulfúrico concentrado	Metanol	Ningún cambio perceptible	-
	Etanol	Ningún cambio perceptible	-
	Agua	Ningún cambio perceptible	-
Cloruro Férrico	Metanol	Verde oscuro	Flavonas
	Etanol	Azul oscuro	Flavonas
	Agua	Azul oscuro	Flavonas
Ácido Clorhídrico concentrado	Metanol	Ningún cambio perceptible	-
	Etanol	Ningún cambio perceptible	-
	Agua	Ningún cambio perceptible	-
Magnesio metálico/ ácido clorhídrico	Metanol	Ningún cambio perceptible	-
	Etanol	Ningún cambio perceptible	-
	Agua	Ningún cambio perceptible	-
Álcali, prueba de amonio	Metanol	Rojo magenta	Flavanonoles
	Etanol	Rojo magenta	Flavanonoles
	Agua	Rojo magenta	Flavanonoles
Ácido bórico en anhídrido acético	Metanol	Ningún cambio perceptible	-
	Etanol	Ningún cambio perceptible	-
	Agua	Ningún cambio perceptible	-

Tabla No. 21
Solubilidad de los colorantes en diferentes disolventes

Extracto	Agua desmineralizada	Etanol al 35%	Etanol al 50%	Etanol al 70%	Etanol al 95%
Agua desmineralizada	Fácilmente soluble	Fácilmente soluble	Fácilmente soluble	Soluble	Soluble
Etanol	Casi insoluble	Muy soluble	Muy soluble	Muy soluble	Poco soluble
Metanol	Casi insoluble	Muy soluble	Muy soluble	Muy soluble	Poco soluble

Tabla No. 22
Datos para las pruebas de teñido

Concentración de colorante	Origen	Peso de tela (± 0.001 g)
100%	Rizoma molido	23.881
50%	Extracto seco	19.090
25%	Extracto seco	14.431

Tabla No. 23
Costo de los disolventes utilizados y materia prima

Disolvente	Costo
Etanol al 95% (v/v)	Q8.30/L
Hexano	Q169/L
Cloroformo	Q133.84/L
Acetato de Etilo	Q365.25/L
Metanol	Q231/L
Agua Desmineralizada	Q0.77/L
Rizoma <i>S. domingensis</i>	Q43/kg

Tabla No. 24
Consumo y costo de energía

Consumo de energía rotavapor	Costo de energía (Q/kWh)
1600 W	Q1.39/kWh

C. Cálculos de muestra

1. Cálculo del peso de extracto seco. Para determinar el peso de las muestras en las que se utilizó un crisol o un cristizador para contenerlas se utilizó la siguiente ecuación **Peso de muestra = (Peso muestra + cristizador) –**

Peso de cristizador Ecuación No. 1

Se utilizó el dato de la primera fila de la Tabla No. 11 como muestra

$$\text{Peso de extracto seco} = 28.148 \pm 0.001\text{g} - 27.797 \pm 0.001\text{g} = 0.3515 \pm 0.002\text{g}$$

De la misma forma se calculó el peso de extracto seco para el resto de extracciones con los demás disolventes.

2. Cálculo de sólidos totales en la determinación de mejor disolvente. Para determinar la cantidad de sólidos totales en la muestra que se utilizó para determinar el mejor disolvente etanólico y metanólico se utilizó la siguiente ecuación.

$$\begin{aligned} \text{Sólidos totales} &= \frac{\text{Peso extracto seco}}{\text{Volumen de muestra}} && \text{Ecuación No. 2} \\ \text{Sólidos totales} &= \frac{0.3515 \pm 0.002 \text{ g}}{10.00 \pm 0.05 \text{ mL}} = 0.03515 \pm \pm 2.00 \times 10^{-5} \text{ g/mL} \end{aligned}$$

De la misma forma se calcularon los sólidos totales para la determinación de mejor disolvente etanólico y metanólico.

3. Cálculo de sólidos totales en la determinación de mejor disolvente. Para determinar la cantidad de sólidos totales que se contenían en el peso completo de de la materia prima a la cual se le querían extraer los colorantes se utilizó estequiometria como se muestra a continuación

$$\text{Sólidos totales en extracto} = \left(\frac{0.03515 \pm \text{g}}{\text{mL extracto}} \right) 100 \pm 0. \text{ mL extracto} = 3.515 \pm \text{g}$$

De la misma manera se calcularon los sólidos totales en el extracto completo para todas las diluciones utilizadas con los disolventes etanol y metanol.

4. Cálculo del rendimiento de extracción. Para determinar el rendimiento de extracción tanto para la determinación de mejor disolvente y para los extractos con disolventes se utilizó la siguiente ecuación

$$\text{Rendimiento} = \left(\frac{\text{Peso extracto seco}}{\text{Peso de materia prima}} \right) * 100 \quad \text{Ecuación No. 3}$$

$$\text{Rendimiento} = \left(\frac{3.515 \pm \text{g}}{10.000 \pm 0.001\text{g}} \right) * 100 = 35.15 \pm \%$$

De la misma forma se calculó el rendimiento de extracción para todas las muestras.

5. Cálculo del Rf en la Cromatografía de Capa Fina. Para determinar el Rf de los diferentes extractos en el cromatograma de Silicagel y poder compararlos con los estándares utilizados se utilizó la siguiente ecuación

$$\text{Rf} = \frac{\text{Recorrido de la mancha}}{\text{Tamaño de la placa}} \quad \text{Ecuación No. 4}$$

Con los datos de la Tabla No. 17 se realizó el cálculo del Rf para la única mancha del extracto con Hexano

$$\text{Rf} = \frac{7.15 \pm 0.05 \text{ cm}}{7.50 \pm 0.05 \text{ cm}} = 0.9533 \pm 0.0092$$

6. Cálculo de la cantidad de colorante necesaria para teñir. La cantidad de colorante a utilizar para la tinción dependió del origen del colorante, en caso del rizoma molido fue un 100% del peso del hilo y se realizaron 2 tinciones con extracto seco, una al 50% del peso del hilo y otra al 25%. Para la tinción en la que se utilizó rizoma molido se calculó el peso de colorante de la siguiente manera.

$$\text{Peso de colorante} = 100\%(\text{Peso de hilo}) \quad \text{Ecuación No. 5}$$

$$\text{Peso de colorante} = 100\%(23.881 \pm 0.001\text{g}) = 23.881 \pm 0.001$$

De la misma forma se calcularon los pesos de la tinción al 50 y 25%.

7. Cálculo de cantidad de mordiente utilizado para teñir. La cantidad de mordiente que se utilizó para teñir el algodón fue 10% del peso de la tela por lo que se calcula de la siguiente manera

$$\text{Peso mordiente} = 0.10(\text{Peso del hilo}) \quad \text{Ecuación No. 6}$$

Utilizando el peso del hilo cuando se tiñó con rizoma de *S. domingensis* se tiene.

$$\text{Peso mordiente} = 0.10(23.881 \pm 0.001\text{g}) = 2.288 \pm 0.001\text{g}$$

De la misma forma se calculó el mordiente necesario en las tres tinciones que se realizaron.

8. Cálculo del costo de disolventes utilizados. El costo de cada disolvente dependió de la cantidad utilizada del mismo. Todos los volúmenes de disolvente fueron multiplicados por su respectivo costo. Por ejemplo para el costo del hexano se realizó el siguiente cálculo.

$$\text{Costo disolvente} = \text{Volumen utilizado} * \text{costo disolvente} \quad \text{Ecuación No. 7}$$

$$\text{Costo de etanol} = 1.513 \text{ L} \left(\frac{Q169}{\text{L}} \right) = Q255.70$$

De la misma forma se calculó el costo de todos los disolventes utilizados.

9. Cálculo del costo de materia prima. Para el costo de materia prima se utilizó el dato de la Tabla No. 21 y la cantidad de extracto seco que se obtuvo.

$$\text{Costo materia prima unitario} = \frac{\text{Peso materia prima} * \text{Costo materia prima}}{\text{Peso de extracto}} \quad \text{Ecuación No. 8}$$

Por ejemplo para la extracción etanólica

$$\text{Costo materia prima unitario} = \frac{300\text{g} \left(\frac{1 \text{ kg}}{1000\text{g}} \right) \left(\frac{Q43}{1 \text{ kg}} \right)}{161.15 \text{ g}} = \frac{Q0.08}{\text{g de extracto}}$$

De la misma manera se calculó para las demás extracciones.

10. Cálculo del costo de disolventes con recuperación. Dado que todos los disolventes se evaporaron con recuperación y que ese mismo disolvente destilado puede utilizarse para una extracción de la misma materia prima. Antes de calcular el costo del volumen real de disolvente utilizado se calculó el volumen de disolvente real de la siguiente manera, por ejemplo para el hexano

$$\text{Volumen real} = \text{Volumen agregado} - \text{Volumen recuperado} \quad \text{Ecuación No. 9}$$

$$\text{Volumen real} = 1.513\text{L} - 1.15\text{L} = 0.363\text{L}$$

Con este valor se procedió a calcular el costo con recuperación de disolvente de la siguiente manera

$$\text{Costo con recuperación} = \text{Volumen real} * \text{Costo de disolvente} \quad \text{Ecuación No. 10}$$

$$\text{Costo con recuperación} = 0.363\text{L} \left(\frac{Q169}{\text{L}} \right) = Q61.35$$

$$\text{Costo de disolvente unitario} = \frac{Q61.35}{0.374 \text{ g extracto}} = \frac{Q164.03}{\text{gramo extracto}}$$

De la misma manera se hizo el cálculo para los demás disolventes.

11. Cálculo del costo de energía eléctrica para destilación. Para calcular el costo de energía eléctrica que se utilizó para recuperar los diferentes disolventes, se usaron los datos de la Tabla No. 22 y se utilizaron relaciones estequiométricas. Asimismo, se utilizó el dato de horas de uso del equipo de Rotavapor para cada disolvente, por ejemplo para la extracción etanólica:

$$\text{Energía consumida} = E_{\text{Rotavapor}} * \text{horas de uso} \quad \text{Ecuación No. 11}$$

$$\text{Energía consumida} = 1600\text{W} \left(\frac{1\text{kW}}{1000\text{W}} \right) (21 \text{ horas de uso}) = 33.6 \text{ kWh}$$

$$\text{Costo de energía} = 33.6\text{kWh} \left(\frac{Q1.39}{1 \text{ kWh}} \right) = Q46.70$$

$$\text{Costo energético unitario} = \frac{Q46.70}{161.15 \text{ g extracto}} = \frac{Q0.29}{\text{g de extracto}}$$

De la misma manera se calculó el costo energético para cada disolvente.

12. Cálculo del costo total de extracción. El costo total de la extracción es la suma de los tres costos de la extracción, el costo de materia prima, el costo del disolvente y el costo energético para recuperar el disolvente.

$$\text{Costo total unitario} = C_{MP} + C_D + C_E \quad \text{Ecuación No. 12}$$

Donde,

C_{MP} = Costo de materia prima unitario

C_D = Costo de disolvente unitario

C_E = Costo energético unitario

Para la extracción etanólica

$$\text{Costo total} = \frac{Q0.08}{\text{g}} + \frac{Q0.03}{\text{g}} + \frac{Q29}{\text{g}} = \frac{Q0.40}{\text{g extracto}}$$

De la misma manera se calculó con las demás extracciones.

13. Cálculo y comparación de los costos de tinción. Para poder comparar las diferentes tinciones de hilo de algodón se tomó como base un peso de 20 g de hilo. Puesto que los materiales, exceptuando el colorante, para realizar la tinción son los mismos, pueden no tomarse en cuenta, y los costos de tinción se dan como sigue

$$\text{Costo de tinción} = \text{Peso materia prima} * \text{Costo materia prima} \quad \text{Ecuación No. 13}$$

Para la tinción con rizoma de *S. domingensis*

$$\text{Costo de tinción} = 20\text{g rizoma} \left(\frac{Q43}{1 \text{ kg rizoma}} \right) \left(\frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ g}} \right) = Q0.86$$

Para el cálculo del costo de tinción con extracto al 50% del peso del hilo se realizó de la siguiente manera

$$\text{Costo de tinción} = 10 \text{ g extracto} \left(\frac{Q0.40}{\text{g extracto}} \right) = Q4.00$$

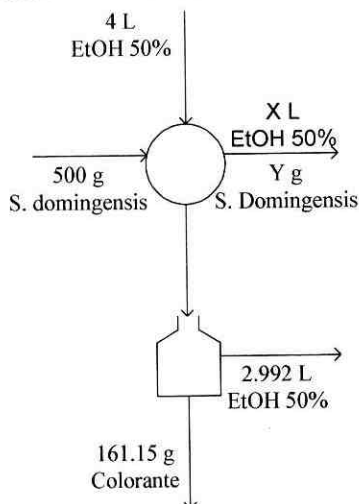
De la misma manera se calculó el costo de tinción con 25% del peso del hilo.

14. Balance de masa

a. Balance de masa de la extracción etanólica

Ilustración No. 15

Balance de masa de la extracción etanólica



Para determinar la cantidad de disolvente que se quedó en la materia prima y el peso final del rizoma de *S. domingensis* (X e Y en la Ilustración No. 6) se realizó el siguiente cálculo.

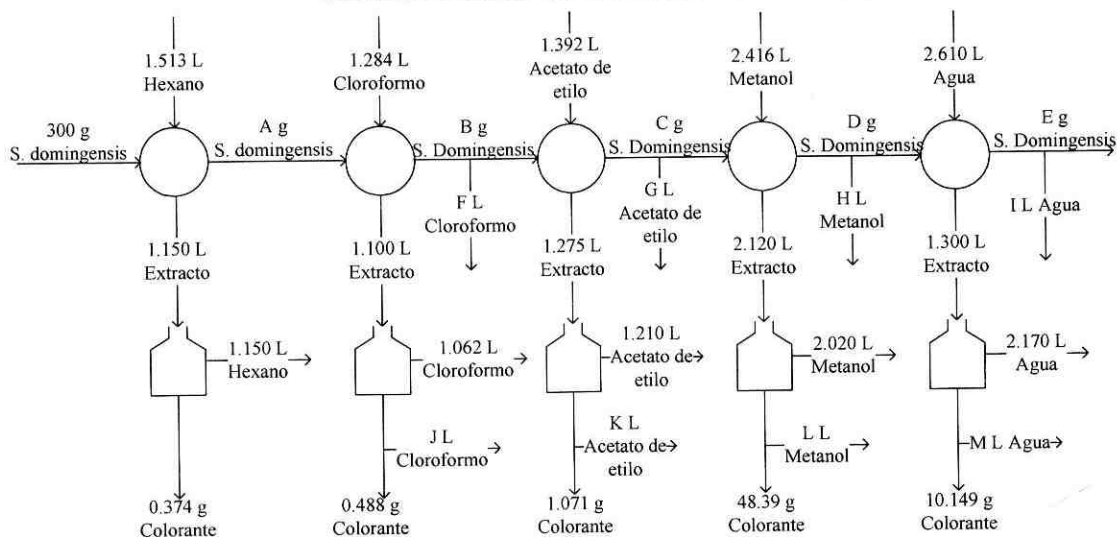
$$X = 4\text{L} - 2.992\text{L} = 1.008\text{L}$$

$$Y = 500\text{g} - 161.15\text{g} = 338.85\text{g de S. domingensis}$$

b. Balance de masa de extracción fraccionada

Ilustración No. 16

Balance de masa de la extracción fraccionada



Las cantidades A-M se determinaron de una forma igual a la que se determinaron en el balance de masa de la extracción etanólica. Por ejemplo para determinar A

$$A = 300 \text{ g} - 0.374 \text{ g} = 299.626 \text{ g S. domingensis}$$

Así, se calcularon el resto de incógnitas.

D. Análisis de error

1. Cálculo de la incertidumbre de suma y resta

$$(A \pm a) + (B \pm b) = (A + B) \pm (a + b) \quad \text{Ecuación No. 14}$$

$$28.148 \pm 0.001\text{g} - 27.797 \pm 0.001\text{g} = 0.3515 \pm 0.002\text{g}$$

2. Cálculo de la incertidumbre de división

$$\frac{(A \pm a)}{(B \pm b)} = \frac{A}{B} \sqrt{\left(\frac{a}{A}\right)^2 + \left(\frac{b}{B}\right)^2}$$

Ecuación No. 15

$$\frac{0.3515 \pm 0.002 \text{ g}}{10.00 \pm 0.05 \text{ mL}} = 0.03515 \pm \pm 2.00 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$$

De la misma forma se calcularon las incertidumbres de todos los cálculos en los que se utilizaron multiplicaciones y divisiones.

E. Datos calculados

Tabla No. 25

Rendimiento de extractos para determinación de mejor disolvente etanólico

Concentración (v/v)	Peso de muestra ($\pm 0.002 \text{ g}$)	Sólidos totales en muestra ($\pm 2.00 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$)	Sólidos totales en extracto ($\pm 0.201 \text{ g}$)	Rendimiento ($\pm 0.02\%$)
35%	0.3515	0.0352	3.515	35.15
50%	0.400	0.0400	4.000	40.00
70%	0.384	0.0384	3.840	38.40
95%	0.1765	0.0177	1.765	17.65

Tabla No. 26
Rendimiento de extractos para determinación de mejor disolvente metanólico

Concentración (v/v)	Peso de muestra (± 0.002 g)	Sólidos totales en muestra ($\pm 2.00 \times 10^{-5}$ g/mL)	Sólidos totales en extracto (± 0.201 g)	Rendimiento ($\pm 0.02\%$)
35%	0.194	0.0194	1.940	19.41
50%	0.202	0.0202	2.020	20.20
70%	0.186	0.0186	1.860	18.60

Tabla No. 27
Sólidos totales al final del 5to día de extracción etanólica

Peso de muestra	Sólidos totales en muestra	Sólidos totales en extracto	Rendimiento
0.053 ± 0.002 g	$0.0053 \pm 2.00 \times 10^{-5}$ g/mL	6.360 ± 0.201 g	$1.27 \pm 0.02\%$

Tabla No. 28
Rendimiento de extracción etanólica

Peso extracto seco	Rendimiento
161.150 ± 0.001 g	32.23%

Tabla No. 29
Rendimientos de extracción fraccionada

Disolvente	Peso extracto seco (0.002 g)	Rendimiento ($\pm 0.020\%$)
Hexano	0.374	0.125
Cloroformo	0.488	0.163
Acetato de Etilo	1.071	0.357
Metanol	48.39	16.130
Agua Desmineralizada	10.149	3.383

Tabla No. 30
Rf de los estándares utilizados

Estándar	Banda	Fluorescencia	Rf
Rutina	1	Verde	0.21 ± 0.0068
	2	Verde pálido	0.67 ± 0.0080
Quercetina	1	Celeste	0.91 ± 0.0089
Ácido Clorogénico	1	Naranja pálido/ celeste	0.96 ± 0.0092

Tabla No. 31
Rf de los extractos

Extracto	Banda	Fluorescencia	Rf
Hexano	1	Naranja pálido/ celeste	0.95 ±0.0092
Cloroformo	1	Celeste	0.87 ±0.0088
	2	Naranja	0.96 ±0.0092
Acetato de Etilo	1	Verde	0.60 ±0.0077
	2	Celeste	0.92 ±0.0090
Metanol	1	Verde	0.63 ±0.0078
	2	Naranja/celeste	0.97 ±0.0092
Agua Desmineralizada	1	Verde pálido	0.25 ±0.0068
	2	Verde	0.64 ±0.0079
	3	Celeste	0.97 ±0.0093
Etanol	1	Verde	0.65 ±0.0079
	2	Naranja/celeste	0.96 ±0.0092
Rojo # 40	1	Rojo	0.18 ±0.0067

Tabla No. 32
Balance de masa de extracción etanólica

Volumen agregado (L)	Volumen destilado (L)	Volumen perdido (L)	Peso extracto seco (g)	Peso restante de rizoma (g)
4.000	2.992	1.008	161.15	338.85

Tabla No. 33
Balance de masa de extracción fraccionada

Disolvente	Volumen agregado (L)	Volumen decantado (L)	Volumen perdido en rizoma (L)	Volumen destilado (L)	Volumen perdido destilación (L)	Peso extracto seco (g)	Peso restante de rizoma (g)
Hexano	1.513	1.15	0.363	1.15	0	0.374	299.63
Cloroformo	1.284	1.1	0.184	1.062	0.038	0.488	299.14
Acetato de Etilo	1.392	1.275	0.117	1.21	0.065	1.071	298.07
Metanol	2.416	2.12	0.296	2.02	0.1	48.39	249.68
Agua	1.61	1.3	0.310	1.17	0.13	10.149	239.53

Tabla No. 34
Costos unitarios de la extracción etanólica

Costo materia prima	Costo disolvente	Costo energético	Costo total
Q0.08/g	Q0.03/g	Q0.29/g	Q0.40/g

Tabla No. 35
Costos unitarios de la extracción fraccionada

Disolvente	Costo materia prima	Costo disolvente	Costo energético	Costo total
Hexano	Q 34.49/g	Q164.03/g	Q11.89/g	Q210.41/g
Cloroformo	Q26.43/g	Q60.89/g	Q 9.11/g	Q96.44/g
Acetato de Etilo	Q12.04/g	Q62.07g	Q4.15/g	Q78.27/g
Metanol	Q0.27/g	Q1.51/g	Q0.18/g	Q1.96/g
Agua	Q1.27/g	Q0.03/g	Q0.66/g	Q1.96/g
Costo total	Q0.21/g	Q288.53/g	Q26/g	Q 314.74/g

Tabla No. 36
Costos de tinción con base en 20 gramos

Concentración	Costo
100%	Q. 0.86
50%	Q. 4.00
25%	Q. 2.00