



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DIURÉTICA Y CUANTIFICACIÓN DE
POLIFENOLES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) CULTIVADA EN
POMONA PASTAZA-ECUADOR”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

ALEX ANDRÉS NARANJO ANDRADE

RIOBAMBA – ECUADOR

2013

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar a este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos.

A mis padres por darme la vida y ser el motor impulsor hacia todas mis metas, también a mi tía Albita quien me apoyo incondicionalmente durante toda mi vida y carrera gracias ñaña Albita.

A mis dos hermanas y a Fernanda quien es una persona especial en mi vida.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por los conocimientos brindados.

A la Dra. Cumandá Játiva mi sincera gratitud por su valiosa colaboración y asesoramiento en la dirección durante el desarrollo y culminación de la presente Tesis. Gracias por todos sus conocimientos impartidos y cada uno de sus palabras

Al Dr. Carlos Pilamunga Miembros del Tribunal de Tesis por el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo.

A mis Amigos y Amigas que de alguna manera colaboraron a lo largo de este trabajo de investigación.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DIURÉTICA Y CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) CULTIVADA EN POMONA PASTAZA-ECUADOR”**, de responsabilidad del señor egresado Alex Andrés Naranjo Andrade, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Silvio Álvarez
DECANO DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS

Dr. Iván Ramos
DIRECTOR DE LA ESCUELA
BIOQUIMICA Y FARMACIA

Dra. Cumandá Játiva
DIRECTORA DE TESIS

Dr. Carlos Pilamunga
MIEMBRO DE TRIBUNAL

Tc. Carlos Rodríguez
DIRECTOR DEL CENTRO
DE DOCUMENTACIÓN

NOTA DE TESIS ESCRITA

Yo, Alex Andrés Naranjo Andrade, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

Alex Andrés Naranjo Andrade

ABREVIATURAS

AC	Anhidrasa Carbónica
°C	Grados Celsius
FC	Folin-Ciocalteu
FE	Fase estacionaria
FM	Fase móvil
g	Gramos
g/Kg	Gramos por cada Kilogramo
g/mL	Gramo por cada mililitro
h	Horas
INEC	Instituto Nacional de Estadísticas y Censo
Kg	Kilogramo
L	Litro
µL	Micro litro
mg/día	Miligramos por día
mg	Miligramos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
λ	Longitud de onda
PA	Presión Arterial
PDA	Enfermedad Arterial periférica
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
TLC	Cromatografía en capa fina
UV-vis	Ultravioleta visible
Rf	Relación frente
R ₁	Primera Repetición
R ₂	Segunda Repetición
R ₃	Tercera Repetición
R ²	Coefficiente de correlación lineal

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE CUADROS	
ÍNDICE DE GRÁFICOS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
INTRODUCCIÓN	

1.	MARCO TEÓRICO	- 1 -
1.2.	DIURÉTICOS	- 1 -
1.2.1.	CLASIFICACIÓN DE LAS DROGAS DIURETICAS	- 2 -
1.2.1.1.	Inhibidores de la reabsorción de sodio.....	- 2 -
1.2.1.2.	Diuréticos osmóticos.....	- 2 -
1.2.1.3.	Diuréticos inhibidores de la Anhidrasa carbónica	- 3 -
1.2.2.	LAS PLANTAS MEDICINALES COMO DIURÉTICOS	- 3 -
1.2.2.1.	Indicaciones de las Plantas medicinales como diuréticos	- 4 -
1.3.	Flor de Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.).....	- 4 -
1.3.1.	DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	- 6 -
1.3.1.1.	Hábitat	- 7 -
1.3.1.2.	Agricultura	- 7 -
1.3.1.3.	Taxonomía	- 8 -
1.3.1.4.	Usos medicinales atribuidos	- 8 -
1.3.1.5.	Otros usos populares	- 8 -
1.3.1.6.	Farmacología.....	- 9 -
1.3.1.7.	Composición química	- 9 -
1.3.1.8.	Farmacognosia	- 11 -
1.3.1.9.	Toxicología	- 11 -
1.3.2.	COMPUESTOS POLIFENOLICOS	- 12 -
1.3.2.1.	Flavonoides y antocianos	- 12 -
1.4.	EXTRACTOS VEGETALES	- 13 -
1.4.1.	MACERACIÓN.....	- 14 -
1.4.2.	PERCOLACIÓN O LIXIVIACIÓN	- 14 -
1.4.3.	CLASIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES.....	- 14 -

1.4.4.	PREPARACIÓN DE EXTRACTOS	- 15 -
1.4.5.	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTOS	- 16 -
1.4.6.	EXTRACTO HIDROALCÓHOLICO.....	- 16 -
1.5.	CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA	- 16 -
1.5.1.	RELACIÓN DE FRENTE (Rf)	- 17 -
1.6.	CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA	- 18 -
1.7.	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC) DE <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	- 19 -
1.8.	ESPECTROMETRÍA UV-Vis.....	- 22 -
1.8.1.	ESPECTRO ULTRAVIOLETA-VISIBLE	- 22 -
1.9.	EXPERIMENTACIÓN EN ANIMALES DE LABORATORIO.....	- 23 -
1.9.1.	MANIPULACIÓN DE LAS RATAS.....	- 25 -
1.9.2.	VÍAS DE ADMINISTRACIÓN	- 25 -
1.9.2.1.	Vía oral.....	- 25 -
1.9.2.2.	Vía intraperitoneal	- 25 -
1.9.2.3.	Vía intramuscular	- 26 -
1.9.2.4.	Vía subcutánea	- 26 -
2.	PARTE EXPERIMENTAL	- 28 -
2.1.	LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN	- 28 -
2.2.	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	- 28 -
2.2.1.	MATERIAL VEGETAL	- 28 -
2.2.2.	MATERIAL BIOLÓGICO	- 29 -
2.2.2.1.	Población.....	- 29 -
2.2.2.2.	Taxonomía	- 29 -
2.2.2.3.	Descripción	- 30 -
2.2.2.4.	Condiciones.....	- 30 -
2.2.3.	MATERIALES	- 30 -
2.2.4.	EQUIPOS.....	- 32 -
2.2.5.	REACTIVOS	- 33 -
2.3.	TÉCNICAS Y MÉTODOS	- 33 -
2.3.1.	CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA VEGETAL	- 33 -
2.3.1.1.	Determinación del contenido de humedad.....	- 34 -
2.3.1.3.	Determinación de las Cenizas Solubles en Agua.....	- 36 -
2.3.1.4.	Determinación de las Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico.....	- 36 -

2.3.2.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LA FLOR DE JAMAICA (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.).....	37 -
2.3.3.	CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS.....	38 -
2.3.3.1.	Determinación de los requisitos organolépticos	38 -
2.3.3.2.	Determinación de la densidad relativa	38 -
2.3.3.3.	Determinación del índice de refracción	39 -
2.3.3.4.	Determinación del pH del extracto	40 -
2.3.4.	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LA FLORE DE JAMAICA (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.).....	40 -
2.3.4.1.	Comprobación en TLC de las fracciones de la columna	42 -
2.3.5.	CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES EN EL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LAS FLORES DE JAMAICA.....	45 -
2.3.6.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DIURÉTICA EN RATAS WISTAR (<i>Rattus novergicus</i>).....	46 -
2.3.6.1.	Porcentaje de Diuresis Respecto al Blanco.....	47 -
2.3.6.2.	Acción Diurética de los Tratamientos.....	47 -
2.3.6.3.	Excreción Urinaria Volumétrica (E.U.V)	48 -
2.3.7.	TOXICIDAD AGUDA (DOSIS REPETIDA)	48 -
2.3.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	49 -
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50 -
3.1.	CONTROL DE CALIDAD DEL VEGETAL CRUDO, FLORES DE JAMAICA (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	50 -
3.1.1.	DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	51 -
3.1.2.	DETERMINACIÓN DE CENIZAS	51 -
3.2.	ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LA FLOR DE JAMAICA (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	52 -
3.3.	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS CROMATOGRAFÍAS DEL EXTRACTO Y FRACCIONES OBTENIDAS	53 -
3.4.	CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES	54 -
3.5.	ACTIVIDAD DIURÉTICA DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LAS FLORES DE JAMAICA (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	56 -
3.5.1.	RESULTADOS DE LA ADMINISTRACIÓN DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LAS FLORES DE JAMAICA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POLIFENOLES	56 -
3.5.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	62 -

3.5.3.	TOXICIDAD AGUDA (DOSIS REPETIDA) DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCES DE LAS FLORES DE JAMAICA.....	- 65 -
3.5.3.1.	Resultados de la Determinación de la Toxicidad aguda en Dosis Repetida	- 65 -
4.	CONCLUSIONES	- 67 -
5.	RECOMENDACIONES	- 69 -
6.	RESUMEN	- 70 -
7.	BIBLIOGRAFÍA	- 71 -
8.	ANEXOS	- 78 -

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Taxonomía De La Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	- 8 -
TABLA No. 2	Composición Proximal De Cálices De Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	- 10 -
TABLA No. 3	Contenido De Compuestos Polifenólicos De Los Cálices De La Flor De Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.).....	- 10 -
TABLA No. 4	Valores De Rf Del TLC, Flor De Jamaica (Figura No. 5)	- 20 -
TABLA No. 5	Valores De Rf Del TLC, Flor De Jamaica (Figura No. 6)	- 21 -
TABLA No. 6	Valores De Absorbancia Para Las BI Y BII De Los Diferentes Flavonoides.	- 23 -
TABLA No. 7	Valores De Rf Y Máximos De Absorción De Algunas Antocianidinas Comunes.....	- 23 -
TABLA No. 8	Taxonomía De Los Animales De Experimentación Empleados En El Estudio Farmacológico.....	- 29 -
TABLA No. 9	Descripción Anatómica De Los Animales De Experimentación Empleados En El Estudio Farmacológico.....	- 30 -
TABLA No. 10	Condiciones Ambientales Del Bioterio Durante El Ensayo Farmacológico.....	- 30 -
TABLA No. 11	Valores De Rf Obtenidos En La Placa Cromatográfica Del Extracto De Los Cálices De Jamaica	- 41 -
TABLA No. 12	Placas Cromatográficas Del Extracto De Los Cálices De Flor De Jamaica.	- 43 -
TABLA No. 13	Placas Cromatográficas De Las Fracciones De La Columna.....	- 44 -
TABLA No. 14	Valores De Rf Y UV-vis Obtenidos En La Placa Cromatográfica De Las Fracciones De La Columna.....	- 45 -

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Resultados De Los Análisis De Control De Calidad De Las Flores Frescas De Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.).....	- 50 -
CUADRO No. 2	Resultados De La Determinación De Los Parámetros Físico-Químicos Del Extracto De Los Cálices De La Flor De Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	- 52 -
CUADRO No. 3	Resultados De La Medición De Absorbancia En El Extracto De Los Cálices De Las Flores De Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	- 55 -
CUADRO No. 4	Concentración De Polifenoles En El Extracto Total Y Por Cada Gramo De Muestra Vegetal	- 56 -
CUADRO No. 5	Resultados Promedio Del Ensayo Farmacológico De Diuresis A Diferentes Concentraciones De Polifenoles Del Extracto De Los Cálices De La Flor De Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.).....	- 57 -
CUADRO No. 6	Porcentaje De Diuresis Respecto Al Blanco Del Extracto De Los Cálices De La Flor De Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) A Sus Diferentes Concentraciones De Polifenoles	- 59 -
CUADRO No. 7	Porcentaje De Acción Diurética Respecto Al Control Positivo Del Extracto De Los Cálices De La Flor De Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) A Sus Diferentes Concentraciones De Polifenoles	- 60 -
CUADRO No. 8	Calculo Del Volumen De Excreción Urinaria Para Cada Uno De Las Concentraciones De Polifenoles Del Extracto De Los Cálices De La Flor De Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	- 61 -
CUADRO No. 9	Análisis Estadístico De Los Tratamiento Utilizados En El Ensayo Farmacológico De La Actividad Diurética De Los Cálices De La Flor De Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	- 62 -
CUADRO No. 10	Análisis De Varianza Para Los Volúmenes Promedio Finales De Cada Tratamiento	- 63 -
CUADRO No. 11	Análisis De Comparaciones Múltiples (Test De Tukey), Para Los Volúmenes Promedio Finales De Cada Tratamiento.....	- 64 -
CUADRO No. 12	Valores Obtenidos De La Medición Del Peso En Gramos Durante El Análisis De Toxicidad Aguda (Dosis Repetida).....	- 66 -

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Curva De Calibración Del Ácido Gálico.....	- 55 -
GRÁFICO No. 2	Promedio De Los Volúmenes (Ml) Al Final Del Ensayo De Diuresis A Diferentes Concentraciones De Polifenoles Del Extracto De Los Cálices De La Flor De Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.).....	- 58 -
GRÁFICO No. 3	Porcentaje De Diuresis Respecto Al Blanco Del Extracto De Los Cálices De Las Flores De Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) A Sus Diferentes Concentraciones De Polifenoles.....	- 59 -
GRÁFICO No. 4	Porcentaje De Acción Diurética Respecto Al Control Positivo Del Extracto De Los Cálices De Las Flores De Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) A Sus Diferentes Concentraciones De Polifenoles.....	- 60 -
GRÁFICO No. 5	Calculo Del Volumen De Excreción Urinaria Para Cada Uno De Las Concentraciones De Polifenoles Del Extracto De Los Cálices De La Flor De Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.).....	- 61 -
GRÁFICO No. 6	Análisis Del Volumen Final De Los Tratamientos	- 63 -
GRÁFICO No. 7	Peso De Las Ratas Durante El Ensayo Toxicológico	- 66 -

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Estructuras De Los Compuestos De La <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	- 11 -
FIGURA No. 2	Fenol	- 12 -
FIGURA No. 3	Estructura Básica De Los Flavonoides	- 13 -
FIGURA No. 4	Estructura Básica De Una Antocianidina	- 13 -
FIGURA No. 5	TLC De <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	- 19 -
FIGURA No. 6	TLC (2) De <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	- 21 -

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1 Jamaica, Cultivada en Pomona-Pastaza.....	- 7 -
FOTOGRAFÍA No. 2 Rata Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>).....	- 26 -
FOTOGRAFÍA No. 3 Administración Intraperitoneal En Ratas	- 27 -
FOTOGRAFÍA No. 4 Administración Vía Oral En Ratas	- 27 -
FOTOGRAFÍA No. 5 Ratas Wistar De Experimentación.....	- 29 -
FOTOGRAFÍA No. 6 Cultivos Y Recolección De La Flor De Jamaica	- 78 -
FOTOGRAFÍA No. 7 Flores Frescas Y Cálices De Jamaica	- 79 -
FOTOGRAFÍA No. 8 Maceración De Los Cálices De La Flor De Jamaica.....	- 79 -
FOTOGRAFÍA No. 9 Concentración Del Extracto En Rotavapor	- 79 -
FOTOGRAFÍA No. 10 Fracciones Obtenidas Del Extracto	- 80 -
FOTOGRAFÍA No. 11 Concentraciones De A Gálico Reacción De FC.....	- 80 -
FOTOGRAFÍA No. 12 Lotes De Ratas del Ensayo Farmacológico	- 80 -
FOTOGRAFÍA No. 13 Administración Vo, De Los Tratamientos A Las Ratas	- 81 -
FOTOGRAFÍA No. 14 Recolección De La Orina En Las Jaulas Metabólicas.....	- 81 -
FOTOGRAFÍA No. 15 Espectro De La Fracción 8	- 82 -
FOTOGRAFÍA No. 16 Espectro De La Fracción 10	- 83 -
FOTOGRAFÍA No. 17 Espectro De La Fracción 15	- 83 -

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Recolección Del Material Vegetal	- 78 -
ANEXO No. 2	Preparación Del Extracto Hidroalcohólico De Las Flores De Jamaica	- 79 -
ANEXO No. 3	Cromatografía En Columna	- 80 -
ANEXO No. 4	Cuantificación De Polifenoles.....	- 80 -
ANEXO No. 5	Ensayo Farmacológico De Diuresis	- 80 -
ANEXO No. 6	Longitudes De Onda Máxima De Algunos Compuestos Antocianos.....	- 82 -
ANEXO No. 7	Espectros Ultravioleta De Las Fracciones	- 82 -

INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas medicinales y la venta de estas en mercados locales y nacionales por vendedores de hierbas y brebajes, para curar diferentes males que van desde cefaleas, fiebres, tos hasta hipertensión y cáncer ha entrado en auge en los últimos años y su empleo goza de una gran aceptación entre la población en general. Es así que la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) que es una planta silvestre de las regiones tropicales y subtropicales, hoy en día tiene una gran acogida por lo que está siendo cultivada dentro de la Amazonia Ecuatoriana, la cual podemos encontrarla en la parroquia de Pomona, provincia de Pastaza.

En dicha parroquia existen 392 habitantes de acuerdo al Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) en el 2010, según este censo tenemos un número de 136 personas que conforman la población económicamente activa de los cual se dedican en un 12% al cultivo de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) de la variedad de flores moradas. En la actualidad las flores de Jamaica están siendo procesadas para la obtención de bebidas refrescantes para su venta. Las flores frescas son expandidas en el mercado local del Puyo recomendando la infusión del cáliz de la flor para su uso como diurético.

La diuresis es un proceso importante para excretar metabolitos, mantener el equilibrio hidroelectrolítico y eliminar sustancias tóxicas. Dentro del uso farmacológico encontramos beneficios para los hipertensos a quienes permite disminuir y mantener su presión arterial en valores normales.

La Jamaica al ser un cultivo introducido es necesario hacer un estudio de actividad biológica y cuantificación de los polifenólicos totales presentes en la flor, las cuales le otorgan su actividad diurética según reportes bibliográficos como en la Revista de divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana volumen XXIII quien manifiesta que el conjunto de fenoles posee la acción diurética en las flores. La Revista Scientia et Technica Año XIII, No 33, comprueba su actividad en Ratas wistar a

Una dosis de 20mg/Kg de vegetal. También en 1999, Onyenekwe reportó que la administración de una infusión preparada con cálices de *H. sabdariffa* a dosis de 500 y 1000 mg/Kg disminuyó la PA y PAD, tanto en ratas normotensas como en ratas hipertensas, a la vez que mostró un efecto diurético del extracto ya que se incrementó la diuresis en las ratas expuestas al mismo. En el mismo año Onyenekwe reportó que la administración de 500 y 1000 mg/Kg de un extracto acuoso de *H. sabdariffa*, disminuyó los niveles séricos de glucosa en ratones. En el 2004, Herrera-Arellano y colaboradores comprueban que el extracto de *H. sabdariffa* estandarizado en 9.6 mg de antocianinas/día posee efecto hipotensivo, efectividad antihipertensiva y tolerabilidad equivalentes a captoril 50 mg/día, en pacientes con hipertensión arterial leve y moderada.

Con estos antecedentes del vegetal, la presente investigación realizada en los laboratorios de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH dará a conocer la evaluación diurética de la Jamaica cultivada en Pomona, Pastaza-Ecuador, la cuantificación de polifenoles totales presentes en el vegetal, como estos influyen en la diuresis a concentraciones de 10mg/Kg, 20mg/Kg, 30mg/Kg, 40mg/Kg y 80mg/Kg y el análisis toxicológico a dosis repetidas con el fin de aportar datos para el aprovechamiento de este cultivo como incentivo para los pequeños productores que podrán expenderlo en condiciones adecuadas y actividad comprobada.

El objetivo general planteado antes de iniciar el trabajo fue “La Determinación de la actividad Diurética y cuantificación de polifenoles en la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) Cultivada en Pomona Pastaza-Ecuador.”

La tecnología de extracción fue la maceración, la cuantificación de los polifenoles por espectroscopia UV-vis, la administración a los animales de experimentación por vía oral, el tratamiento en jaulas metabólicas y el análisis de resultados por ANOVA. Se comprobó la presencia de polifenoles que administrados en diferentes concentraciones a Ratas dieron efecto diurético, con 20 mg/Kg de polifenoles, se tiene 47% de diuresis respecto al control positivo.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. LAS PLANTAS COMO FITOMEDICAMENTOS

El auge en lo que se refiere al interés hacia las plantas medicinales ha sido la gran confianza hacia los remedios de origen natural en amplios sectores de la población, ya que en general ofrecen unos márgenes terapéuticos más amplios que los fármacos sintéticos con una menor porción de efectos secundarios. La fitoterapia constituye una herramienta que puede resultarnos muy útil como complemento terapéutico: unas veces será suficiente para prevenir o curar un estado patológico, otras como coadyuvante o simplemente como media paliativa de determinados síntomas. (19)

Una planta medicinal es cualquier planta que en uno o más órganos contienen sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica, para controlar y curar determinadas patologías del ser humano. Y como fitoterapia entendemos que es el estudio y uso de esas partes del vegetal o sus productos derivados para prevenir, controlar y curar estas patologías. (46)

1.2. DIURÉTICOS

Los diuréticos son fármacos que estimulan la excreción renal de agua y electrolitos, como consecuencia de su acción perturbadora sobre el transporte iónico a lo largo de la nefrona. Esta interferencia puede llevarse a cabo en uno o varios sitios del recorrido tubular y su objetivo fundamental es conseguir un balance negativo de agua, pero los diuréticos no actúan directamente sobre el agua, sino a través del sodio (diuréticos natriuréticos) o de la osmolaridad (diuréticos osmóticos).

De acuerdo con ello, la finalidad principal de los diuréticos se dirige al tratamiento de los edemas. Sin embargo, directa o indirectamente pueden modificar otros iones y alterar otras funciones, de ahí que se utilicen también en otras enfermedades, como la hipertensión arterial, las hipercalcemias, la diabetes insípida, el glaucoma, las intoxicaciones, entre otras. (16) (4)

1.2.1. CLASIFICACIÓN DE LAS DROGAS DIURETICAS

1.2.1.1. Inhibidores de la reabsorción de sodio.

A. Diuréticos Tiazídicos (Derivados de la benzotiadiazinas y congéneres). Son los diuréticos más importantes desde el punto de vista terapéutico, su uso es amplio en el tratamiento de todos los síndromes edematosos, en la hipertensión arterial, en la diabetes insípida y en la hipercalciuria con litiasis cálcica recurrente.

Entre en llenos tenemos los más comunes: Hidroclorotiazida, Clortalidona, Xipamida, Piretanida, Metolazona, Politiazida, Bendroflumetiazida, Hidroflumetiazida.

B. Diuréticos de Alta eficiencia. Son diuréticos que poseen una intensidad diurética mucho mayor que los tiazídicos su acción en si es el aumento de la excreción de sodio, cloruro, potasio y agua entre ellos encontramos la Furosemida, Bumetanida, Acido Etacrínico, Indapamida como Antihipertensivo.

C. Diuréticos Ahorradores de potasio, también se los conoce con el nombre de inhibidores de la aldosterona porque bloquean los receptores de esta hormona impidiendo la reabsorción de agua y sodio a nivel del túbulo contorneado distal entre los fármacos de este tipo tenemos: Amilorida, Triamtirene, Espironolactona.

1.2.1.2. Diuréticos osmóticos

Los diuréticos osmóticos como manitol y la urea, son sustancias que en solución son marcadamente hipertónicas. Estas drogas cuando se administran por vía intravenosa,

filtran por el glomérulo, no se reabsorben o lo hacen muy escasamente por los túbulos por lo que allí ejercen una presión osmótica, reteniendo agua. También interfieren con la reabsorción de sodio y cloruro. Ello produce en consecuencia, una intensa diuresis osmótica, El manitol es usado como diurético a concentraciones del 15 – 20 %.

1.2.1.3. Diuréticos inhibidores de la Anhidrasa carbónica

La Anhidrasa carbónica es una enzima que cataliza la reacción $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$. La enzima se encuentra distribuida ampliamente en todos los tejidos, y para que los inhibidores de la AC, sean efectivos debe inhibirse el 99% de la actividad enzimática. Encontramos Acetazolamida, Diclorfenamida Etoxizolamida, Metazolamida. (12)

1.2.2. LAS PLANTAS MEDICINALES COMO DIURÉTICOS

Existe un gran número de especies vegetales con acción diurética, así como principios activos responsables de esta actividad. Lo más destacable de estas plantas es que suelen producir una excreción, principalmente de agua, sin que generalmente se vea aumentada la eliminación de iones. Estas plantas presentan una acción suave y cuantitativamente inferior a la de los diuréticos de síntesis.

La acción diurética puede ser causada por principios activos de naturaleza química muy variada. Frecuentemente, la presencia de varios de estos principios en la misma droga es la responsable de la acción diurética, aunque no está claro el grado de contribución de cada uno de ellos a la actividad diurética total de la droga. Los principales principios activos que pueden intervenir en la acción diurética son aceites esenciales, flavonoides, saponósidos y sales de potasio.

En cuanto a su mecanismo de acción, parece ser que algunos aceites esenciales, saponósidos y flavonoides podrían actuar a nivel glomerular (más que en el túbulo), provocando un aumento de la circulación renal e incrementando así la tasa de filtración glomerular y la formación de orina primaria. El efecto obtenido sería, por tanto, una

acuareasis. Sin embargo, las sales de potasio podrían producir un efecto diurético gracias a un proceso osmótico.

Por otro lado, las bases xánticas o los heterósidos cardiotónicos son otros principios activos que también pueden presentar acción diurética, aunque su empleo en fitoterapia se debe a otro tipo de acciones. (49)(3)

1.2.2.1. Indicaciones de las Plantas medicinales como diuréticos

Las plantas diuréticas están recomendadas en afecciones bacterianas como inflamaciones de la pelvis renal y de las vías urinarias bajas. En estos casos se recurre a la denominada terapia de lavado, que consiste en forzar la diuresis con lo que se aumenta la excreción de agua. Esta terapia conlleva la administración de cantidades suficientemente elevadas de líquido. Es importante tener en cuenta que, en caso de edemas causados por insuficiencia cardíaca o renal, no deben realizarse tratamientos basados en la terapia de lavado.

En la prevención y tratamiento de arenillas y cálculos urinarios. En estos casos es recomendable utilizar preparados en forma de infusión, pudiéndose llegar hasta volúmenes de 2 litros por día.

En infecciones de las vías urinarias que cursen con fiebre, en el tratamiento con citostáticos y en caso de hipertensión arterial, su uso está indicado como coadyuvante.

En los regímenes de adelgazamiento. Se utilizan como tratamiento coadyuvante por favorecer la eliminación de líquidos.

Las plantas medicinales diuréticas se pueden emplear en preparados simples, aunque en fitoterapia es más frecuente utilizarlas en asociaciones de varias drogas vegetales. (47)

1.3. Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)

La flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es un vegetal usada desde hace siglos por diversas culturas como la Azteca y Africana con fines culinarios. Popularmente se le han atribuido propiedades diuréticas, antihipertensivas, antiparasitarias y laxantes. Pero en los

últimos años una serie de trabajos han demostrado la actividad antihipertensiva, hipolipemiante y antioxidante de sus cálices y cálculos.

Los extractos son ricos en flavonoides y antocianósidos los cuales ejercen una notable actividad antihipertensiva. (21)

La Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una especie de la familia de las Malváceas, originaria de África tropical cuyo cultivo se extendió a América Central en el siglo XVII y también al sudeste asiático. China y Tailandia son los mayores productores del mundo. En diferentes países es conocida con los nombres de roselle (Inglaterra), karkadé (Francia, Egipto, Arabia, Sudán y en general el norte de África), Jamaica o rosa de Jamaica (Latinoamérica). (21)

Se le cultiva principalmente por sus hojas, cálices carnosos, semillas y fibra; sin embargo el mayor interés comercial se centra en su flor debido a su potencial farmacéutico y alimenticio. Su uso es como alimento o como un colorante que sustituye a los sintéticos. (45)

La rosa o flor de Jamaica se puede cultivar en clima tropical y subtropical, con una altura sobre el nivel del mar de 0 a 1400 metros y temperatura de 22 a 25 °C, dado que su mayor germinación se encuentra a los 25 °C, en suelos pesados o arcillosos con humedad permanente. (43)

Esta planta crece bien en distintas clases de suelos y aún con bajo contenido de nutrientes (baja fertilidad), pero los más indicados son los suelos francos, con fertilidad moderada, principalmente en nitrógeno para evitar que la planta crezca demasiado y nos produzca el mayor número de cálices. (43)

El producto se comercializa mayormente en el mercado local a través de supermercados y comercio informal de manera natural o de campo (en racimos) por kg/libra, también se exporta deshidratada a países del área Centroamericana y Europa. (43)

La Jamaica tiene efecto para disminuir los niveles séricos del colesterol y triglicéridos en las hiperlipidemias realizando ensayos clínicos en pacientes con esta patología en la

ciudad de Oaxaca durante 14 meses, al final de este estudio se observó la disminución de colesterol total de 35% con aumento de colesterol de alta densidad y disminución de triglicéridos. Los extractos de las flores de Jamaica se emplean como colorantes naturales para los alimentos. (22)

Las flores de *Hibiscus sabdariffa* L, presentan en su composición un porcentaje importante de fibra dietética así como una elevada capacidad antioxidante. La infusión que se obtiene de la decocción de los cálices de Hibiscus, posee propiedades saludables para el consumo humano. (52)

También se ha demostrado que la fracción en etanol del extracto liofilizado y el Extracto total acuoso sin liofilizar (infusión) de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* presentan mayor efecto diurético, en ratas albinas machos cepa Wistar de peso promedio 295,1g; cuando se evaluaron concentraciones de 20 mg/kg de peso corporal comparados con el control positivo Hidroclorotiazida respectivamente. Y que el extracto de etanol presenta una diuresis de tipo no electrolítico de acuerdo a lo establecido por Stein, con comportamiento fisiológico diferente al del patrón positivo Hidroclorotiazida además el extracto total acuoso liofilizado en dosis de 400 mg/Kg de peso corporal no induce alteraciones macromorfológicas y tampoco histopatológicas al ser administrado en ratas albinas machos cepa Wistar. (32)

1.3.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA *Hibiscus sabdariffa* L.

La Jamaica es una hierba semileñosa, anual, erecta, 1 – 2 m de alto, corteza roja glabra. Hojas con peciolo cortos o largos lóbulos angostos, borde aserrado; nervadura central; glándula grande cerca de la base en el envés. Flores con bractéolas unidas al cáliz acrescentes en la fructificación forman una copa, carnosa, rojo oscuro, pedículos cortos. Cáliz de 2 cm de largo y un número de 5 pétalos, 4-5 cm de largo, amarillo pálido; estambres numerosos, ovario superior con 5 carpelos cerrados, placentación axial. Fruto en cápsula densamente estrigosa más corta que el cáliz. Semillas peberulentas. (2)



FOTOGRAFÍA No. 1: JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.), CULTIVADA EN POMONA - PASTAZA

1.3.1.1. Hábitat

Nativa de la India Oriental o Angola, naturalizada como maleza en América tropical, se cultiva en grandes extensiones de las partes secas del oeste de África central, Sudán, México y la India. En Guatemala se cultiva en tierras bajas. (15)

1.3.1.2. Agricultura

Crece en bosque seco y monte espinoso subtropical, clima cálido, terreno húmedo, pH 4.0 -5.8, suelo arenoso-arcilloso rico en materia orgánica; resistente a la sequía adaptable a lugares secos, se propaga por semillas; éstas se siembran en caja o cama a distancia de 8-10 cm en cuadro, se entierran a 1-2 cm de profundidad; a los 10-15 cm de alto se trasplanta en pilón al campo definitivo a distancia de 1-3 cm entre surcos y 0.9-1.5 m entre planta se cortan los cálices en plena madurez; el tallo se corta a 30 cm del suelo y vuelve a retoñar. (2)

Su ciclo es de 6 a 7 meses, la cosecha se realiza cada 3 meses cuando la planta inicia su estado de maduración, su producto se encuentra disponible durante todo el año.

1.3.1.3. Taxonomía

TABLA No. 1 TAXONOMÍA DE LA JAMICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) (2)

Reino:	Plantae
División:	Anthophyta
Clase:	Magnoliopsida
Familia:	Malvaceae
Género:	Hibiscus
Especie:	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.

FUENTE: Cáceres Armando 1999

1.3.1.4. Usos medicinales atribuidos

Con los cálices hervidos o macerados se preparan bebidas refrescantes, el cocimiento se bebe caliente para tratar afecciones gastrointestinales (disentería, dispepsia infección intestinal) y respiratorias (catarro, fiebre, gripa, tos), debilidad, afecciones renales. Las raíces son amargas y se utilizan para combatir el estreñimiento. La cataplasma de las hojas se aplica tópicamente para tratar abscesos, enfermedades exantemáticas. A las flores y cálices se les atribuye propiedad antiescorbútica, aperitiva, astringente, colagoga, digestiva, diurética, emoliente, laxante. (2) (29)

1.3.1.5. Otros usos populares

Con los cálices carnosos se preparan jaleas, dulces, jarabes, mermeladas y refrescos muy aromáticos, las semillas se comen tostadas; las hojas y tallos tiernos se comen cocidos. Aportando culinariamente el uso de este vegetal con el fin de aprovechar sus propiedades. (22)

1.3.1.6. Farmacología

Estudios antimicrobianos demuestran que varios de los extractos obtenidos de los cálices son activos contra bacterias gram-positivo (*S. aureus*, *S. lutea*, *M. Phlei*) y gram-negativos (*E. coli*, *P. aeruginosa* y *Neisseria spp*) estudios farmacológicos demuestran que el extracto acuoso (rendimiento 22%) tiene actividad diurética en ratas, aumentando la excreción de sodio, potasio y ácido úrico. El extracto acuoso induce actividad extrogénica en ratas inmaduras (500mg/Kg) por vía intraperitoneal e inhibe el tono de varios tejidos musculares.

El extracto acuoso de flores es relajante del músculo uterino y disminuye la presión sanguínea, el unguento a base de extracto tiene actividad antiflogística y antiedema. (29)
(23)

1.3.1.7. Composición química

En el hibisco destaca su contenido en ácidos orgánicos (15-30%), entre ellos los ácidos cítrico, málico, tartárico y la lactona del ácido - alohidroxícítrico, conocida como ácido hibiscico, que es característico de la droga.

El color rojo característico de la droga se debe a los antocianos (aproximadamente 1,5%): 3-O-sambubiosil-delfinidina (hibiscina), 3-O-glucosil-delfinidina, delfinidina, 3-O-sambubiosil-cianidina y 3-O-β-D-glucopiranosil-cianidina.

La droga contiene otros polifenoles, como flavonoides (quercetina, miricetina, hibiscetina, hibiscitrina y 3-O-glucosil-gosipetina) y ácidos fenoles (ácidos protocatéquico, o-coumárico, p-coumárico y ferúlico).

Contiene también polisacáridos mucilaginosos y pectinas, entre los que destaca un ramnogalacturonano, acompañado, en menor proporción, por un arabinogalactano y un arabinano. Otros componentes son: trazas de aceite esencial (con eugenol) y fitosteroles.

Las raíces tiene ácido tartárico y saponinas, las semillas contienen esteroides (beta-sitosterol 61.3%, camosterol 16.5%, ergosterol 3.2%). (2)(29)(22)

TABLA No. 2 COMPOSICIÓN PROXIMAL DE CÁLICES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) (G/100G DE MATERIA SECA)

	[11]	[1]	[5]
Proteína ^a	8,6	17,4	9,87
Lípidos	2,0	2,61	0,59
Cenizas	6,8	6,9	9,75
Fibra cruda	8,5	12,0	—
Fibra dietética total ^b	—	—	33,90
Fibra insoluble	—	—	29,04
Fibra soluble	—	—	4,87
Minerales y Vitaminas (mg/100g)			
Calcio	1263	1602	—
Potasio	2320	2732	—
Hierro	34,6	8,98	—
Magnesio	340	—	—
Zinc	6,3	—	—
Vitaminas			
Acido ascórbico	54,8	67	—
Niacina	—	3,76	—
Tiamina	—	0,117	—
Riboflavina	—	0,277	—

FUENTE: Componentes de la Rosa de Jamaica 2007

TABLA No. 3 CONTENIDO DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS DE LOS CÁLICES DE LA FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) (g/100g de materia seca) (14).

Polifenoles extraíbles	2,17 ± 0,04
Acidos Hidroxibenzoicos	32,60
Acidos Hidroxicinámicos	30,60
Anthocianidinas	30,80
Flavonoles	5,87
Polifenoles no extraíbles	
Proantocianidinas (taninos condensados)	3,38 ± 0,06
Polifenoles hidrolizables	0,58 ± 0,03

FUENTE: Sayago-Ayardi 2007

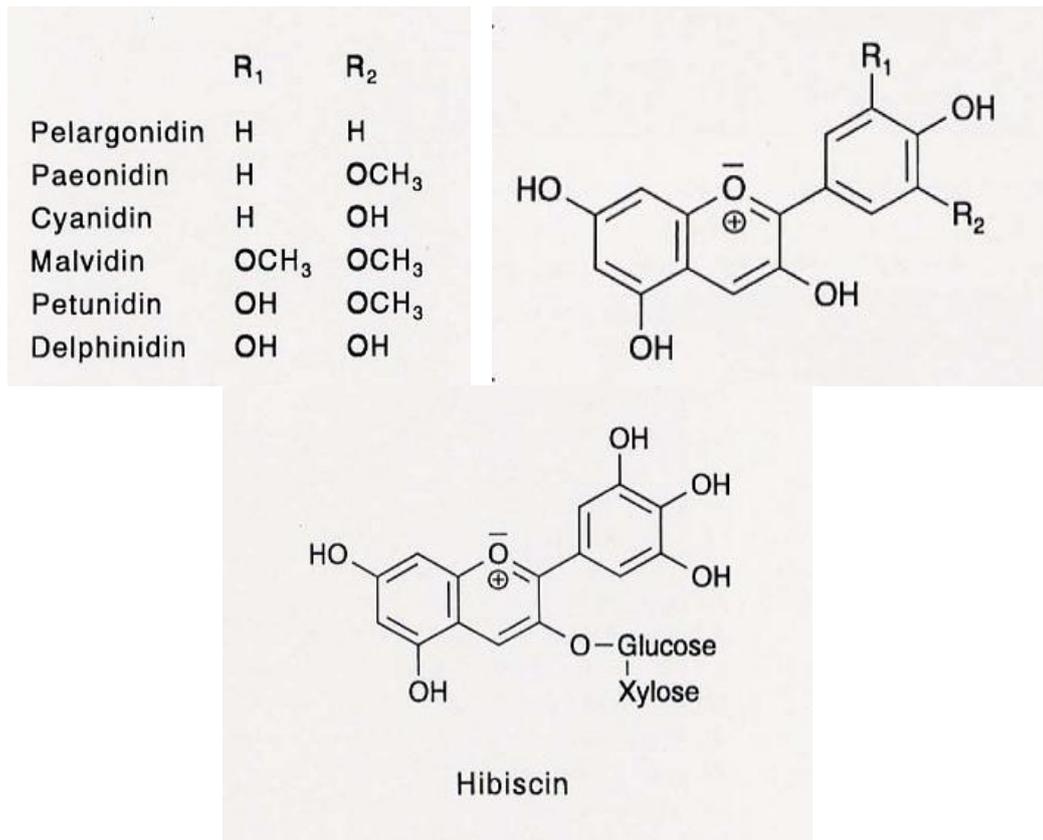


FIGURA No. 1 ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS DE LA *Hibiscus sabdariffa* L. (22)

1.3.1.8. Farmacognosia

La materia médica son los cálices bracteados secos, que no debe contener más del 2% de elementos extraños o frutos (rojos, cápsula gris-amarillento 5-locular, paredes consistentes de varias capas de fibra que corren en diferentes direcciones; semillas planas reniformes con superficie punteada).

A los flavonoides y derivados antociánicos se les atribuye actividad diurética, colerética, disminuye la viscosidad de la sangre, reduce la presión sanguínea, estimula la peristalsis intestinal, sedante y laxante. La actividad antiflogística se atribuye al contenido de mucilago. Las antocianidinas son los responsables del color vino tinto de la infusión.

1.3.1.9. Toxicología

La DL50 del extracto en la planta ratón por vía intraperitoneal es 750mg/Kg. (2)

1.3.2. COMPUESTOS POLIFENOLICOS

Los compuestos polifenólicos son los compuestos bioactivos antioxidantes más abundantes en la dieta. Se trata de un amplio grupo de compuestos, producto del metabolismo secundario de las plantas, donde desempeñan diversas funciones de protección al ataque de patógenos o herbívoros y son pigmentos que atraen a los polinizadores. (34)

Se caracterizan por presentar en su estructura un anillo benceno con, al menos, un grupo hidroxilo (fenólico), generalmente funcionalizado. Los compuestos fenólicos se pueden clasificar según su complejidad estructural y su origen biosintético, el grupo más sencillo corresponde a los fenoles propiamente dichos. Entre los grupos fenólicos tenemos a los flavonoides que se suponen aproximadamente la mitad de los compuestos fenólicos presentes en las plantas y que se pueden clasificar en 5 grupos diferentes: antocianinas (pigmentos), flavonoides menores (que incluyen flavonas, dihidroflavonoles y dihidrochalconas), flavonas y flavonoles, isoflavonoides y taninos. (25)

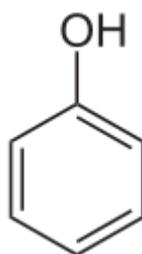


FIGURA No. 2 FENOL

1.3.2.1. Flavonoides y antocianos

Los flavonoides son derivados fenólicos sintetizados en cantidades sustanciales por las plantas. Comprenden alrededor de 4000 compuestos identificados, son derivados hidroxilados, metoxilados y glicosilados del 2-fenilbenzo- γ -pirano, que consiste en dos anillos benceno combinados por mediación del oxígeno contenido en el anillo pirano. Estos compuestos poseen actividad antioxidante y capacidad para capturar radicales libres, diurética al igual que las antocianidinas, acción laxante entre otras. (47) (10)

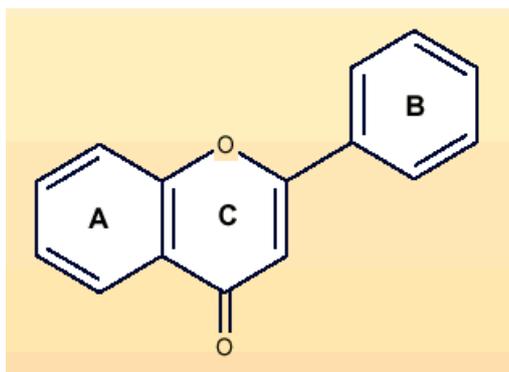


FIGURA No. 3 ESTRUCTURA BÁSICA DE LOS FLAVONOIDES

Dentro de los grupos de los flavonoides encontramos las antocianidinas. Son compuestos hidrosolubles, y constituyen uno de los grupos más importantes de pigmentos vegetales. Se encuentran principalmente como heterósidos con los tres anillos de su estructura conjugados. La glucosilación ocurre principalmente en la posición 3 del anillo C o en las posiciones 5 y 7 del anillo A. También es posible la glucosilación de las posiciones 3', 4' y 5' del anillo B, aunque esta glucosilación aparece con menos frecuencia. Las antocianidinas están ampliamente distribuidas en la dieta humana. Se pueden encontrar en ciertas variedades de cereales, en el vino tinto y en algunos vegetales, aunque aparecen mayoritariamente en las frutas. (25)(30)

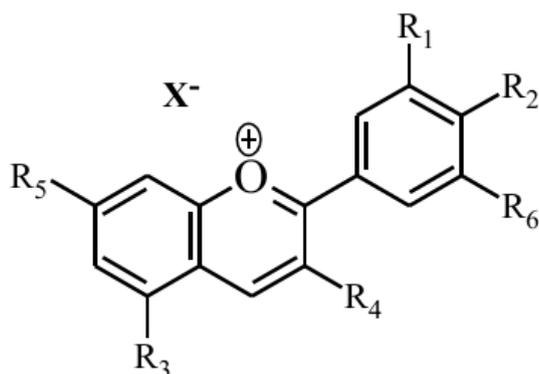


FIGURA No. 4 ESTRUCTURA BÁSICA DE UNA ANTOCIANIDINA

1.4. EXTRACTOS VEGETALES

Se define como extracto vegetal el producto líquido obtenido a partir de plantas o parte de ellas con varios procedimientos y con varios solventes (13)

La extracción sólido-líquido es una operación que está presente prácticamente en todos los procesos tecnológicos relacionados con la industria química y médico-farmacéutica; dentro de ésta, los métodos de extracción por maceración y la percolación o lixiviación son los más utilizados.(13) (9)

1.4.1. MACERACIÓN

El material crudo previamente triturado se pone en contacto duradero con cantidad suficiente de solvente, en un tanque cerrado a temperatura ambiente durante 2-14 días hasta el agotamiento de la droga vegetal. Puede utilizarse agitación. Posterior a este tiempo la mezcla es filtrada, el material insoluble es lavado con el mismo solvente y los filtrados se mezclan para concentrar y obtener el extracto. (13)(18)

1.4.2. PERCOLACIÓN O LIXIVIACIÓN

El material crudo previamente triturado se pone en contacto con cantidad suficiente de solvente de forma tal que el solvente cubra la capa de sólido en el tanque percolador. El solvente se renueva de modo continuo manteniéndose un gradiente de concentración, el disolvente puro desplaza al que contiene la sustancia extraída sin ser necesario aplicar presión. La droga residual es prensada y el fluido obtenido es combinado con el percolado para concentrar el extracto. (13)

1.4.3. CLASIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

Dependiendo del grado de concentración de los extractivos por percolación, los extractos pueden clasificarse en: (13)

- Extractos fluidos o líquidos 1g/1ml de solución
- Extractos semisólidos o blandos son siruposos y pastosos
- Extractos secos sólidos, polvos
- Tinturas 50%, 20%, 10%

Los extractos obtenidos por maceración dependen del solvente utilizado, del vegetal si es seco o es fresco y tenemos:

- Alcohólicos
- Hidroalcohólicos

1.4.4. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Para preparar un extracto es importante establecer los parámetros de extracción para así lograr la estandarización del proceso, esto garantizará la calidad, rendimiento, seguridad y eficacia del producto medicinal. (13)

En primer lugar debemos conocer la naturaleza química de la materia prima vegetal para determinar las características del metabolito o compuesto químico a extraer. Seguidamente la elección del solvente para definir, el solvente óptimo será el que logre extraer un mayor rendimiento del compuesto de interés. (36)

La relación sólido-líquido es la proporción más conveniente de trabajo será aquella con la que se alcancen los mayores rendimientos de extracción. Tamaño de partícula del sólido: de la forma y dimensión de los sólidos depende en gran medida el éxito de la lixiviación, a menor tamaño de partícula, mayor superficie de contacto entre la droga y el disolvente, y por tanto, mayor acceso de los principios activos al medio líquido; no obstante, tamaños de partícula muy pequeños conducen a la formación de polvos demasiado finos, que pueden causar problemas en el proceso de extracción como taponamiento de cribas.

La temperatura es un factor determinante al momento de preparar un extracto, el aumento de la temperatura favorece la extracción, hay que prestar especial atención cuando la sustancia de interés es termolábil o el menstruo es volátil, además, temperaturas elevadas pueden conducir a lixiviar cantidades excesivas de solutos indeseables. (16)

La velocidad de agitación y tiempo de extracción son parámetros en el que se determina el rendimiento del producto que se sometió a la extracción. A mayor tiempo de contacto, mayor capacidad tendrá el disolvente para alcanzar el equilibrio de concentraciones. (25)

1.4.5. CONCENTRACIÓN DE EXTRACTOS

Toda vez que se ha realizado la etapa de extracción y separación, se procede a eliminar parte del solvente de extracción para aumentar el contenido de sólidos en el extracto. Este proceso se realiza a presión reducida con lo que se disminuye la temperatura de calentamiento necesaria para la salida del solvente, el Rotavapor es una buena alternativa para trabajos en el laboratorio y es ampliamente usado mientras que sistemas análogos se utilizan a escala industrial (evaporadores, condensadores).

También pueden utilizarse métodos de precipitación del principio activo, combinados con etapas de filtración, extracción líquido-líquido, entre otras. (19) (9)

1.4.6. EXTRACTO HIDROALCÓHOLICO

La preparación consiste en pesar 100g de planta fresca y molida se coloca en un matraz erlenmeyer de 500mL y se deja macerar con suficiente cantidad de etanol para cubrir completamente la planta. Después se filtra (papel filtro No. 4) u algodón y en un Rotavapor se lleva a sequedad el extracto a 47 °C y a presión reducida. Se pesa el extracto seco y se coloca en un vial bien cerrado, en el refrigerador. (23) (1)

1.5. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

La cromatografía en general es un método muy utilizado en todas las ramas de la ciencia y que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Ningún otro método de separación es tan potente y de aplicación tan general como la cromatografía, este método tiene en común el uso de una Fase estacionaria y una fase móvil. (1)(15)

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente. (31)

La cromatografía en capa fina es un método en la que se emplea una capa plana y relativamente delgada de un material que a la vez es el soporte, o bien cubre una superficie de vidrio, plástico o metal. La fase móvil se desplaza por la fase estacionaria por acción capilar, la cromatografía en capa fina tiene un amplio uso en los laboratorios y es la estructura de apoyo de muchos estudios bioquímicos y biológicos. (31) (11)

1.5.1. RELACIÓN DE FRENTES (Rf)

Se define como la distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación hasta el frente del solvente, Este movimiento es constante y característico para cada sustancia en un sistema cromatográfico determinado y a una Temperatura determinada.

El Rf, al ser un cociente, nos permite medir el desplazamiento de cada sustancia, con un valor independiente del tiempo o las dimensiones de la placa o distancia de desarrollo. De la definición resulta que el valor de Rf va de 0 a 1, siendo 0.5 un valor medio. A menor Rf la sustancia queda más retenida en la FE, a mayor Rf la sustancia no está unida con fuerza a la FE y es arrastrada por la FM. Se establece como parámetros de Rf aceptable, entre 0.2 y 0.8 para extractos vegetales. (5) (37)

1.6. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Se emplea para la separación de mezclas o purificación de sustancias a escala reparatoria. Como fase estacionaria se usa, generalmente, gel de sílice o alúmina dentro de una columna. La elección del disolvente es crucial para una buena separación.

Una columna de cromatografía es un tubo de vidrio relleno con una sustancia sólida de propiedades adsorbentes constituida por pequeñas partículas: gel de sílice y alúmina son las más usadas. Este relleno es lo que se conoce en cromatografía como la fase estacionaria. A través de la columna se hará pasar una corriente de un disolvente o mezcla de disolventes denominada eluyente y/o fase móvil. (37)

Dicho disolvente pasa a través de la columna por efecto de la gravedad o bien por aplicación de presión (cromatografía flash). La columna se prepara mezclando el soporte con disolvente y se rellena la columna poniendo en el fondo de ésta un poco de algodón o lana de vidrio, para evitar que la sílica o la alúmina queden retenidas en la columna y que el disolvente se engrasada hasta el nivel del soporte, a continuación se introduce la muestra por la parte superior de la columna y se eluye con el disolvente elegido, recogién dose por lo general en tubos de ensayo.

La mezcla de compuestos a separar se disuelve en una pequeña cantidad de disolvente y se coloca sobre el adsorbente, en la parte superior de la columna, quedando adsorbida por el mismo. A continuación se pasa un flujo de eluyente a través de la columna. Los compuestos constituyentes de la mezcla son arrastrados por el eluyente a su paso, haciéndoles avanzar a lo largo de la columna. Sin embargo, no todos los compuestos avanzan a la misma velocidad, y esta es precisamente la clave de la cromatografía. Algunos compuestos se ven más fuertemente retenidos por el adsorbente (FE) y por lo tanto avanzarán más despacio. Por el contrario, otros apenas son retenidos y avanzarán a mayor velocidad. (37) (5)

1.7. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC) DE *Hibiscus sabdariffa* L.

A continuación se presenta los compuestos estandarizados para la flor de Jamaica con sus respectivos valores de R_f utilizando el sistema de solvente Acetato de etilo – ácido acético glacial – ácido fórmico - Agua (100:11:11:26). (Figura No. 5)

Fase estacionaria: Sílica Gel 60 F₂₅₄ (Merck)

Solvente de corrido: Acetato de etilo – ácido acético glacial – ácido fórmico - Agua (100:11:11:26)

Revelador: Sin tratamiento químico

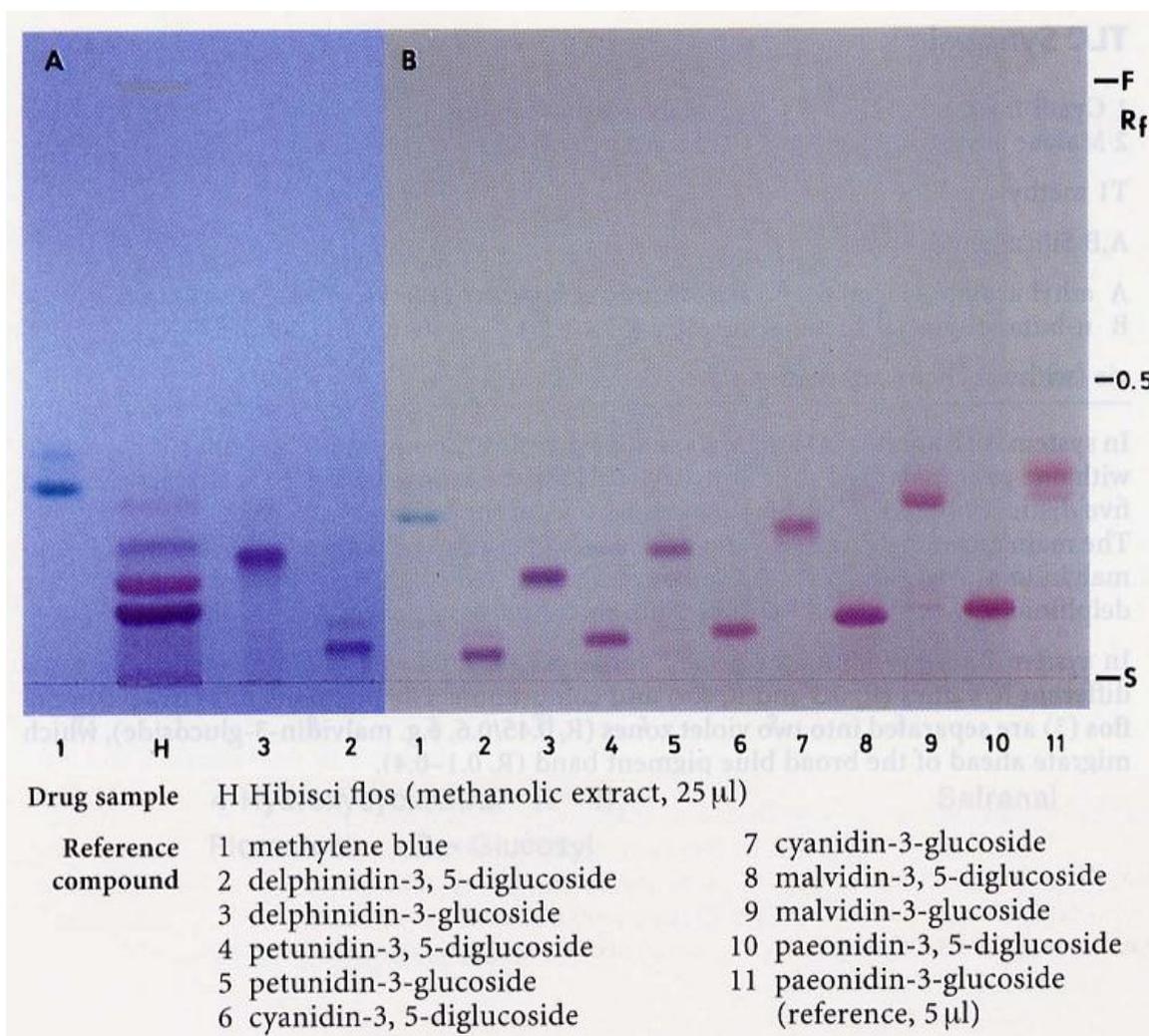


FIGURA No. 5 TLC DE *Hibiscus sabdariffa* L.
Fuente WAGNER.H.PAG 287

TABLA No. 4 VALORES DE R_f DEL TLC, FLOR DE JAMAICA (Figura No. 5)

No	COMPUESTO	R _f	No	COMPUESTO	R _f
H	Flor de Jamaica	0.15 – 0.2	6	Cianidina - 3, 5 - di-glucósido	0.08
2	Delfinidina -3, 5 - di-glucósido	0.04	7	Cianidina - 3 - glucósido	0.25
3	Delfinidina - 3 - glucósido	0.2	8	Malvidina -3, 5 - di-glucósido	0.11
4	Petunidina - 3, 5 - di-glucósido	0.07	9	Malvidina - 3 – glucósido	0.36
5	Petunidina - 3 - di-glucósido	0.26	10	Peonidina - 3, 5 - di-glucósido	0.12
			11	Peonidina - 3 - di-glucósido	0.34

Fuente WAGNER.H.PAG 287

El sistema de solvente revela claramente tres zonas pigmentadas (H) en un rango R_f 0.15 – 0.25. Las bandas con un R_f 0.15 – 0.2 son probablemente delfinidina-3-glucosido-xilosa (Hibiscina) y la cianidina-3-glucosido-xilosa, reportado como el pigmento mayoritario. El mono glucósidos delfinidina-3-glucosido (3) y cianidina-3-glucosido (7) fueron encontrados en un rango de R_f 0.2 – 0.35. (20)

La siguiente cromatografía muestra los compuestos estandarizados para la flor de Jamaica con sus respectivos valores de R_f utilizando el sistema de solvente n-Butanol – ácido acético – agua (50:10:20). (Figura No. 6)

Los pigmentos de las la flor de Jamaica aparecen en dos franjas con el sistema de solvente, una banda azul a R_f 0.2 típico de la delfinidina, petunidina, y cianidina (1-7) y una zona violeta a R_f 0.35. (20)

Fase estacionaria: Sílica Gel 60 F₂₅₄ (Merck)

Solvente de corrido: n-Butanol – ácido acético – agua (50:10:20)

Revelador: Sin tratamiento químico

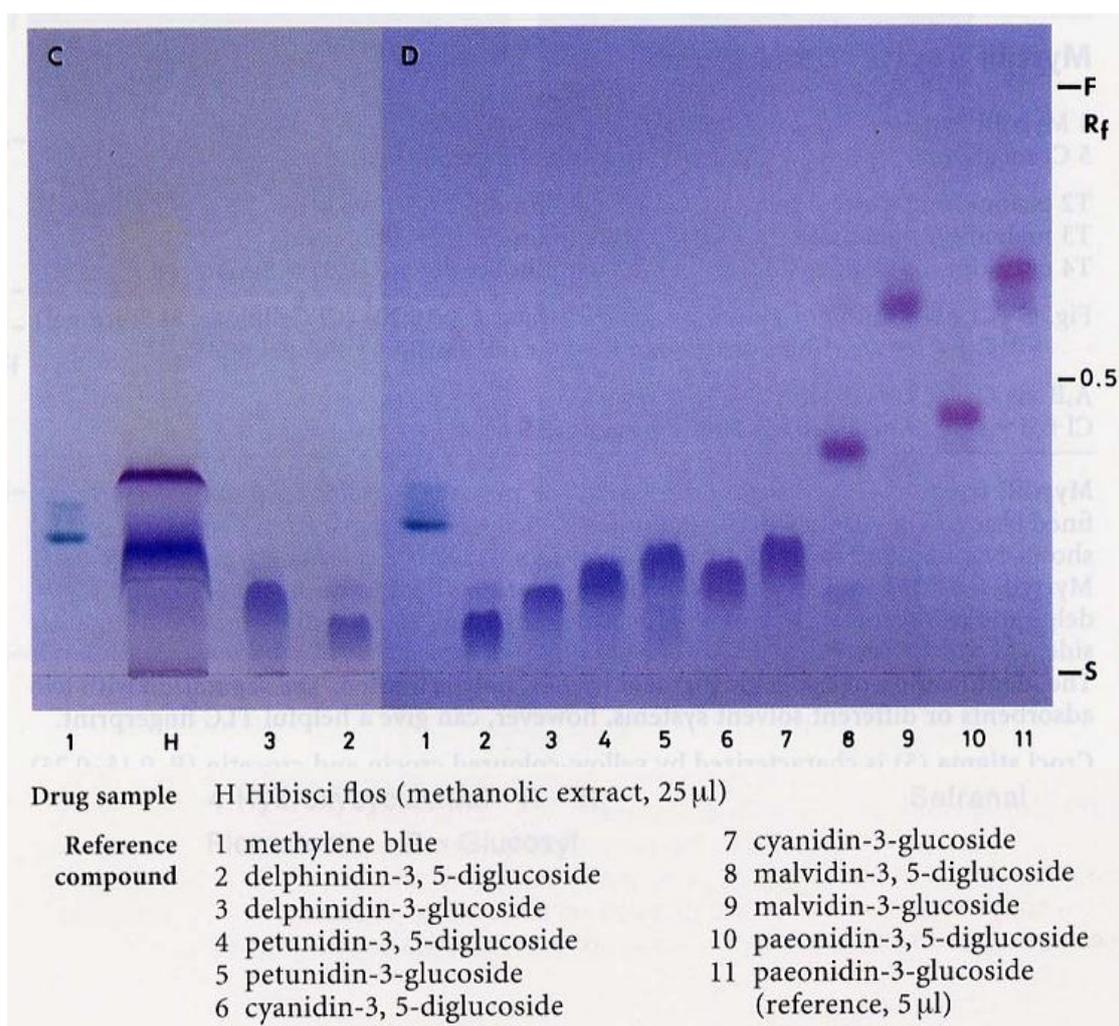


FIGURA No. 6 TLC (2) DE *Hibiscus sabdariffa* L.
Fuente WAGNER.H.PAG 287

TABLA No. 5 VALORES DE Rf DEL TLC, FLOR DE JAMAICA (Figura No. 6)

No	COMPUESTO	Rf	No	COMPUESTO	Rf
H	Flor de Jamaica	0.2 – 0.35	6	Cianidina - 3, 5 - di-glucósido	0.15
2	Delfinidina -3, 5 - di-glucósido	0.07	7	Cianidina - 3 - glucósido	0.2
3	Delfinidina - 3 - glucósido	0.11	8	Malvidina -3, 5 - di-glucósido	0.37
4	Petunidina - 3, 5 - di-glucósido	0.16	9	Malvidina - 3 – glucósido	0.63
5	Petunidina - 3 - di-glucósido	0.19	10	Peonidina - 3, 5 - di-glucósido	0.44
			11	Peonidina - 3 - di-glucósido	0.68

1.8. ESPECTROMETRÍA UV-Vis

La espectroscopia ultravioleta utiliza radiación electromagnética de las regiones visible, ultravioleta y se utiliza con fines de identificación de algunos grupos funcionales de moléculas y determinación cuantitativa de una gran cantidad de especies inorgánicas, orgánicas y biológicas. (5)

1.8.1. ESPECTRO ULTRAVIOLETA-VISIBLE

Es un gráfico de absorbancia de luz frente a la longitud de onda en el rango del ultravioleta o luz visible. Este espectro puede ser producido directamente por los espectrofotómetros, o bien pueden registrarse los datos de una sola longitud de onda. La longitud de onda se representa con el símbolo λ . (5) (9)

La espectroscopia ultravioleta-visible es la más limitada para la información de compuestos. Los compuestos que tengan un cromóforo o instauraciones son visibles en esta región. Los compuestos orgánicos, especialmente aquellos con un alto grado de conjugación, también absorben luz en las regiones del espectro UV. Los disolventes orgánicos pueden tener una significativa absorción de UV, por lo que no todos los disolventes son adecuados para su uso en espectrofotometría UV. El etanol absorbe muy débilmente en la mayoría de longitudes de onda. La polaridad y el pH del disolvente pueden afectar la absorción del espectro de un compuesto orgánico (11).

Los espectros de los flavonoides son determinados usualmente en solución metanólica. El espectro típicamente consiste de dos máximos de absorción en los rangos de 240-285 nm (Banda II) y 300-500 nm (Banda I). Podría indicarse como características de dihidroflavonas. Dihidroflavanoles e isoflavonas. (20)

TABLA No. 6 VALORES DE ABSORBANCIA PARA LAS BI Y BII DE LOS DIFERENTES FLAVONOIDES.

Banda II, nm	Banda I, nm	Tipo de flavonoide
250 - 280	310 - 350	Flavonas
250 - 280	330 - 360	Flavonoles
250 - 280	350 - 385	Flavonoles
245 - 275	310-330	Isoflavonas (5-deoxi-6,7 dioxi)
275 - 295	300-330	Isoflavonas, dihidroflavonoles
230-270(baja intensidad)	340-390	Chalconas
270-280	465-560	Antocianidinas, antocianinas

Fuente Olga Lock 1997.

TABLA No. 7 VALORES DE Rf Y MÁXIMOS DE ABSORCIÓN DE ALGUNAS ANTOCIANIDINAS COMUNES

Antocianidina	Rf(x100) en			Color Visible	$\lambda_{\text{máx}}$, nm en MeOH-HCl
	Forestal	Fórmico	BAW		
Pelargonidina	68	33	80	rojo	530
Cianidina	49		68	magenta	535
Peonidina	63	30	71	magenta	532
Delfinidina	32	13	42	púrpura	546
Petunidina	46	20	52	púrpura	543
Malvidina	60	27	58	púrpura	542

Fuente: Colorantes Naturales – Olga Lock 1997.

1.9. EXPERIMENTACIÓN EN ANIMALES DE LABORATORIO

Desde los principios de la Biología, la utilización de animales como reactivos biológicos en el ámbito de la investigación científica ha sido fundamental para el establecimiento de nuevos postulados y la constante validación de los mismos. Es así, como el desarrollo científico en las áreas biomédicas, está directamente relacionado con el nivel de desarrollo de la tecnología y experimentación animal. (35) (39)

Los animales de laboratorio son biomodelos experimentales que tienen la cualidad necesaria para dar respuesta al cuestionamiento de cómo estudiar las enfermedades que afectan al hombre, a la especie que está estudiando, y a las demás especies productivas y domésticas, y las ratas y ratones están entre los que responden más uniformemente a esos requerimientos, son de fácil manejo y poseen las características zootécnicas adecuadas.

Hay miles de líneas y sublíneas de ratones, que replican las enfermedades del ser humano. Hoy existen ratas y ratones para muchas de las enfermedades que padecemos: hay ratas obesas e hipertensas, ratones diabéticos, asmáticos, inmunodeficientes; unos por mutaciones espontáneas y otros inducidos por el hombre.

Los animales de laboratorio se utilizan, en los países avanzados en la biotecnología y la industria médico farmacéutica, para la obtención de productos biológicos (anticuerpos monoclonales, vacunas, etc.); en pruebas biológicas para el control de la calidad de estos; en los estudios toxicológicos; la experimentación, y la docencia. (50)

Por eso es importante contar con un programa de evaluación de actividad biológica de plantas para descubrir nuevos compuestos activos los cuales deben contar con un número de réplicas para evaluar estadísticamente y ser reportadas. (8)

La ciencia de animales de laboratorio surge como ayuda a la comunidad científica para mejorar todos los aspectos concernientes a la experimentación animal. Ya al partir del año 1959, los científicos ingleses W.M Russell y R.L Burch escribían en sus principios de técnicas de experimentación humanitaria que la excelencia científica y el uso humanitario de los animales de laboratorio estaban fuertemente ligados. Este dicho tratado describieron por primera vez y hoy es conocido con el lema de las tres “R” en usos de animales de experimentación: Reducción, refinamiento y remplazo. (12)

La rata Wistar (ver fotografía No. 2) es actualmente una de las cepas de ratas más populares utilizadas para la investigación de laboratorio. Se caracteriza por su cabeza ancha, orejas largas, y con una longitud de la cola que es siempre inferior a la longitud de su cuerpo. (41)

1.9.1. MANIPULACIÓN DE LAS RATAS

Existen diferentes formas de sujetar a la rata, estas son:

1. Tomar al animal por la cola, teniendo cuidado que no escale su propia cola y lo muerda. Apoyar la palma de la mano sobre el lomo del animal, colocar el dedo índice y medio a ambos lados de la mandíbula, de forma que la cabeza de la rata quede entre dichos dedos impidiendo su movimiento. Con la otra mano tome la parte posterior del cuerpo, así puede levantarla sujetándola firmemente.
2. Tomar la rata apoyando la mano alrededor del tórax, quedando una de las patas entre sus dedos índice y medio y la otra sobre el dedo pulgar. Con la otra mano, tome la parte posterior del cuerpo y levántela, sujetándola firmemente. (44)

1.9.2. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

1.9.2.1. Vía oral

Comúnmente usada para la administración de compuestos irritantes o imposibles de ser administrados por otras vías. Se utiliza una sonda de pequeño calibre previamente lubricada con vaselina o parafina médica, esta debe permitir la introducción del fármaco a la cámara gástrica por el hocico del animal, debe asegurarse en todo momento de no ingresar en la vía respiratoria buscando el mejor ángulo de la cabeza y el cuerpo para facilitar la administración (ver fotografía No. 4). (52)

1.9.2.2. Vía intraperitoneal

Es la segunda vía más rápida de absorción y se utiliza en situaciones de emergencia cuando no es posible hallar la vena en un animal muy enfermo. En esta vía también se pueden colocar grandes volúmenes de medicamento, pero cuando se trata de suero fisiológico, dextrosa o calcio intravenoso. El sitio de predilección para introducir la aguja es el cuadrante inferior izquierdo, con la aguja levemente inclinada, la misma se sentirá

flotar libremente en la cavidad peritoneal, de no ser así, no inyecte líquido, porque este caerá en el interior de una víscera o en un músculo de la pared abdominal (ver fotografía No. 3). (52)

1.9.2.3. Vía intramuscular

Se realiza con agujas de características similares a la anterior, de preferencia en las masas musculares de las extremidades superiores o inferiores. Se utiliza como una vía de administración sistémica, en estudios de liberación lenta (formulaciones oleosas) y en valoración de vacunas.

1.9.2.4. Vía subcutánea

Se realiza preferentemente bajo la piel del abdomen o del dorso con aguja de diámetro fino. Inyectada la sustancia, retire la aguja y masajee suavemente el sitio de la inyección, para prevenir el escape del fluido inyectado.

(52)



FOTOGRAFÍA No.2 RATA WISTAR (*Rattus norvegicus*)



FOTOGRAFÍA No. 3 ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL EN RATAS



FOTOGRAFÍA No. 4 ADMINISTRACIÓN VÍA ORAL EN RATAS

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en:

- Laboratorio de Fitoquímica de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1. MATERIAL VEGETAL

Flores de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) cultivada y recolectada en la Parroquia de Pomona, Pastaza – Ecuador.

Condiciones:

Temperatura promedio $24\text{ °C} \pm 2$

Latitud: $1^{\circ} 40' 60.00''$ S

Longitud: $77^{\circ} 52' 60.00''$ W

Clima: 18°C a 24°C

Se utilizó los cálices de la flor de Jamaica, la cual median aproximadamente de 2 – 3 cm de largo, de coloración purpura – roja, con un número de sépalos igual a 5, su aroma floral libre de olores extraños y su textura carnosa. (Ver Anexo No. 1)

2.2.2. MATERIAL BIOLÓGICO

2.2.2.1. Población

Población: Ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) provenientes del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH



FOTOGRAFÍA No. 5 RATAS WISTAR DE EXPERIMENTACIÓN

2.2.2.2. Taxonomía

TABLA No. 8 TAXONOMÍA DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EMPLEADOS EN EL ESTUDIO FARMACOLÓGICO.

Reino:	Animalia	Género:	<i>Rattus</i>
Phylum:	Chordata	Especie:	<i>norvegicus</i>
Clase:	Mammalia		
Orden:	Rodentia		
Familia:	Muridae		

Fuente: Animales de laboratorio Dr. Laureano Saiz

2.2.2.3. Descripción

TABLA No. 9 DESCRIPCIÓN ANATÓMICA DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EMPLEADOS EN EL ESTUDIO FARMACOLÓGICO.

Sexo:	Machos
Edad:	3 meses
Peso:	200 – 300 g
Lugar de Nacimiento	Bioterio Esc. BQF

2.2.2.4. Condiciones

TABLA No. 10 CONDICIONES AMBIENTALES DEL BIOTERIO DURANTE EL ENSAYO FARMACOLÓGICO

Humedad relativa	55 ± 10%
Temperatura	22 ± 2°C
Periodo	12 horas de luz, 12 horas de oscuridad
Cama con viruta	Cambio cada 72 horas

2.2.3. MATERIALES

No	DESCRIPCIÓN
1	- Agujas de insulina
2	- Algodón
3	- Aspersor (atomizador)
4	- Balón desmerilado de 500 mL
5	- Balones de aforo de 10 mL y 25 mL
6	- Bebederos

7	-	Cámara Cromatográfica
----------	---	-----------------------

8	-	Cámara fotográfica
----------	---	--------------------

9	-	Cánula de administración oral
----------	---	-------------------------------

10	-	Capsulas de porcelana
-----------	---	-----------------------

11	-	Crisoles
-----------	---	----------

12	-	Embudo
-----------	---	--------

13	-	Embudo de separación de 100 mL
-----------	---	--------------------------------

14	-	Espátula
-----------	---	----------

15	-	Frascos ámbar
-----------	---	---------------

16	-	Gradilla para Tubos
-----------	---	---------------------

17	-	Guantes de manejo
-----------	---	-------------------

18	-	Jaulas metabólicas adaptadas
-----------	---	------------------------------

19	-	Jaulas para Ratas
-----------	---	-------------------

20	-	Jeringuillas de 1 mL y 5 mL
-----------	---	-----------------------------

21	-	Mandil
-----------	---	--------

22	-	Mangueras
-----------	---	-----------

23	-	Mascarilla
-----------	---	------------

24	-	Mortero con Pistilo
-----------	---	---------------------

25	-	Papel aluminio
-----------	---	----------------

26	-	Papel Filtro
-----------	---	--------------

27	-	Pera de succión
-----------	---	-----------------

28	-	Picnómetro
-----------	---	------------

29	-	Pinzas universales
-----------	---	--------------------

10	-	Pipetas volumétricas de 1 mL, 5 mL y de 10 mL
-----------	---	---

31	- Pizeta
-----------	----------

32	- Probeta de 5 mL, 10 mL y 50 mL
-----------	----------------------------------

33	- Reverbero
-----------	-------------

34	- Trípode
-----------	-----------

35	- Tubos de Ensayo
-----------	-------------------

36	- Vaselina Pura
-----------	-----------------

2.2.4. EQUIPOS

No	DESCRIPCIÓN
1	- Balanza Analítica (ADAM)

2	- Balanza técnica (BOEHCO)
----------	----------------------------

3	- Bomba de vacío (GAST)
----------	-------------------------

4	- Desecador
----------	-------------

5	- Espectrofotómetro (HELYOS β)
----------	---------------------------------------

6	- Estufa (MEMMERT) para secado de material
----------	--

7	- Lámpara de onda larga y corta UV
----------	------------------------------------

8	- Mufla (SNOL)
----------	----------------

9	- pH-metro (HANNA)
----------	--------------------

10	- Refractómetro (BAUSCH)
-----------	--------------------------

11	- Refrigeradora (KELVINATOR)
-----------	------------------------------

12	- Rotavapor (HEIDOLPH)
-----------	------------------------

2.2.5. REACTIVOS

No	REACTIVO
1	- Agua Destilada
2	- Alcohol al 96°
3	- 2 – propanol
4	- Acetato de Etilo
5	- Ácido Fórmico
6	- Metanol
7	- Butanol
8	- Sílica Gel 60F254 (Merck)
9	- Amoniac
10	- Sulfato de Cerio
11	- Reactivo de Folin – Ciocalteu
12	- Solución de carbonato de sodio al 20%
13	- Estándar de Ácido gálico
14	- Cloroformo

2.3. TÉCNICAS Y MÉTODOS

2.3.1. CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA VEGETAL

Se define droga vegetal todo material de origen vegetal (planta, alga, hongo, resina o goma) o sus partes, fresco o deseca-do, entero o fraccionado (partido, picado o molido) o purificado (descascarado, descortezado, des-palillado, clasificado, etc.), apto para su uso con fines medicinales. Dentro del control de calidad tenemos los ensayos físico-químicos

cuantitativos que permiten valorar la droga vegetal los más generales que se debe realizar es (5):

- Determinación de Humedad
- Determinación de Cenizas Totales
- Determinación Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico
- Determinación de Cenizas Solubles en Agua

2.3.1.1. Determinación del contenido de humedad

FUNDAMENTO: El ensayo de contenido de humedad se entiende como la eliminación del agua libre que contiene el material vegetal después de ser desecada en una estufa. Para una buena conservación ha de ser inferior al 10%, para evitar los procesos enzimáticos, y para expresar la valoración de los principios activos referidos a materia seca. (3)

PROCEDIMIENTO: De la especie vegetal se pesa 2 g a 5 g con desviación permisible de 0,5 mg y se transfieren a una cápsula de porcelana previamente tarada y desecada a 105 °C hasta masa constante; seguidamente se deseca a 105 °C durante 3 horas. La cápsula se coloca en el desecador, donde se deja enfriar a temperatura ambiente y se pesa, colocándose nuevamente en la estufa durante 1h, volviéndose a pesar, hasta obtener una masa constante. El ensayo se realizó por triplicado. (25) (26)

Para el cálculo de los resultados se expresó en base a al siguiente formula:

$$\%H = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} * 100$$

Donde:

% H = pérdida de peso por desecación (%).

M₂ = Masa de la cápsula con la muestra del ensayo (g).

M₁ = Masa de la cápsula con la muestra del ensayo desecada (g).

M = Masa de la cápsula vacía.

100 = Factor matemático. (26)

2.3.1.2. Determinación de Cenizas Totales

FUNDAMENTO: El método de cenizas totales está diseñado para medir la cantidad total de materia que queda después de la ignición. Esto incluye tanto a las “cenizas fisiológicas”, que proceden del tejido mismo de las plantas, como a las “cenizas no fisiológicas”, que son el residuo de la materia extraña (ejemplo arena y tierra) adherida a la superficie de la planta. (26)

PROCEDIMIENTO: Se determinó la masa 2.0 g de la muestra de ensayo en un crisol de porcelana previamente tarado, a una temperatura no mayor de 450 °C hasta que esté libre de carbón, enfriar y pesar. Si no se puede obtener una ceniza libre de carbono de esta manera, añadir agua caliente a la masa quemada y recoger el residuo sobre papel filtro libre de cenizas, incinerar el mismo junto con el papel, luego añada el filtrado, evaporar a sequedad e incinerar a una temperatura no mayor de 450 °C. Se enfría el crisol en una desecadora y se pesa, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0,5 mg por g (masa constante). Para obtener la masa constante los intervalos entre calentamiento y pesada son de 30 min. Si el residuo presenta trazas de carbón, se le añaden unas gotas de solución de peróxido de hidrógeno concentrado, ácido nítrico o solución de nitrato de amonio al 10% m/v y se calienta hasta evaporar los solventes. Al enfriar el crisol el residuo es de color blanco o casi blanco. El ensayo se realizó por triplicado.

Para el cálculo de los resultados se expresó en base a al siguiente formula:

$$\%Ct = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} * 100$$

Donde:

C_t = Cenizas totales (%)

M = Masa del Crisol vacío (g)

M_1 = Masa del Crisol con la Muestra (g)

M_2 = Masa del Crisol con la Muestra carbonizada (g)

100 = Factor matemático (2)

2.3.1.3. Determinación de las Cenizas Solubles en Agua

A las cenizas totales obtenidas según el apartado anterior, se le añadieron de 15 a 20 mL de agua. El crisol se tapó y se calentó suavemente a la llama del mechero durante 5 min. La solución se filtró a través del papel de filtro libre de cenizas. El filtro con el residuo se transfirió al crisol inicial, se carbonizó en un mechero y luego se incineró en un horno mufla de 700 °C - 750 °C., durante 2 horas. Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repitió el procedimiento hasta alcanzar peso constante.

Para el cálculo de los resultados se expresó en base a la siguiente fórmula:

$$\%Ca = \frac{M_2 - M_a}{M_1 - M} * 100$$

Donde:

C_a = Porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

M = Masa del Crisol vacío (g)

M_1 = Masa del Crisol con la Muestra (g)

M_2 = Masa del Crisol con las cenizas totales (g)

M_a = Peso del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

100 = Factor matemático (2)

2.3.1.4. Determinación de las Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico

A las cenizas totales obtenidas según la técnica se le añadieron de 2 – 3 mL de ácido clorhídrico al 10%. El crisol se tapó con un vidrio reloj y se calentó sobre un baño de agua hirviente durante 10 min. Se lavó el vidrio reloj con 5 mL de agua caliente y se unió al contenido del crisol. La solución se filtra a través de un papel de filtro libre de

cenizas; se lava el residuo con agua caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido nítrico al cual se le añade una o dos gotas de solución de nitrato de plata 0.1M no muestren presencia de cloruros. El filtrado con el residuo se desecó de 100 a 105 °C., se transfiere al crisol inicial y se incineró en un horno mufla a una temperatura de 700-750 °C durante 2h (si no se señala otra temperatura en la norma específica). Posteriormente se colocó en una desecadora y una vez alcanzada la temperatura ambiente se pesa. Se repitió el procedimiento hasta obtener masa constante.

Para el cálculo de los resultados se expresó en base a al siguiente formula:

$$\%Cac = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} * 100$$

Donde:

C_{ac} = Porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada

M = Masa del Crisol con la porción de ensayo (g)

M_1 = Masa del Crisol con la Muestra (g)

M_2 = Masa del Crisol con las cenizas residuales (g)

100 = Factor matemático (2)

2.3.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LA FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

1. En un recipiente de vidrio con su respectiva tapa, se transfirió los cálices de las flores de Jamaica trozada y pesada, se humedeció directamente con etanol al 96° cubriendo los cálices de las flores de Jamaica. Se maceró durante 48 horas.
2. A las 48 horas se procedió a filtrar el contenido mediante el uso de un embudo previamente colocado algodón en la parte interna extracto obtenido se le colocó en un balón desmerilado (previamente tarado) para próxima concentración. El residuo obtenido de los cálices fueron licuados y vueltos a macerar con alcohol durante 1 hora para posteriormente someterlo a un nuevo filtrado (este proceso se repitió hasta extraer todo el colorante posible de los cálices de las flores).

3. Al filtrado se llevó a concentración en Rotavapor hasta eliminación del alcohol. Se envaso el extracto de los cálices de las flores de Jamaica en un recipiente ámbar para evitar al contacto directo con la luz.

2.3.3. CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS

2.3.3.1. Determinación de los requisitos organolépticos

A. DETERMINACIÓN DEL OLOR

Se tomó una tira de papel filtro de aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo y se introdujo en la muestra de ensayo. Se huele y se determina el olor característico del producto.

B. DETERMINACIÓN DEL COLOR Y ASPECTO

Se tomó un tubo de ensayo bien limpio y seco y lleno hasta 2 cm con la muestra de ensayo y se observa el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas y se informa los resultados.

C. DETERMINACIÓN DEL SABOR

Se colocó una pequeña cantidad de muestra en el borde de la plama de la mano o en el dedo índice e inmediatamente al contacto con la punta de la lengua se realiza la identificación de su sabor.

2.3.3.2. Determinación de la densidad relativa

FUNDAMENTO: Se entiende como densidad relativa a la relación entre masa de un volumen de la sustancia a ensayar y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Este término equivale a peso no específico.

PROCEDIMIENTO: Se pesó el picnómetro vacío y seco, posteriormente a ello se llena con la porción de ensayo y mantenemos a temperatura ambiente, si es preciso, con una tira de papel extraemos el exceso y secamos exteriormente el picnómetro. Se procede a pesar cuidadosamente el picnómetro con la porción del ensayo y se repite la operación con agua destilada después de limpiar el picnómetro. (26)

Los resultados son expresados mediante la siguiente fórmula:

$$D = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

Donde:

M_1 = peso del picnómetro con la muestra (g)

M_2 = peso del picnómetro con agua (g)

M = peso del picnómetro vacío (g)

Los resultados se aproximan hasta al tercera cifra (3) (2)

2.3.3.3. Determinación del índice de refracción

FUNDAMENTO: El índice de refracción es una constante característica de cada sustancia, la cual representa la relación entre el seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio.

Así los refractómetros utilizan como principio de medición, la determinación del ángulo límite el cual presenta en el campo visual un contraste claro y otro oscuro. La línea de separación entre ambos campos establece el ángulo límite de la luz incidente. (3)

PROCEDIMIENTO: Así se procedió a medir la muestra directamente en el refractómetro a una temperatura ambiente, observando la escala que trae el equipo para expresar el resultado. Se realizó por triplicado y se calcula el promedio de las mismas.

2.3.3.4. Determinación del pH del extracto

FUNDAMENTO: La acidez o la alcalinidad de las soluciones acuosas se caracterizan por el valor del índice de hidrógeno, pH. El pH es por tanto un índice numérico que se utiliza para expresar la mayor o menor acidez de una solución en función de los iones hidrógenos. Se calcula teóricamente mediante la ecuación:

$$pH = -\log a [H^+]$$

Donde, $a [H^+]$ = actividad de los iones hidrógeno.

En la práctica la medición del pH se lleva a cabo por medio de la lectura del pH en la escala de un instrumento medidor de pH. Esta lectura está en función de la diferencia de potencial establecida entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia usando como solución de ajuste de la escala del medidor de pH, una solución reguladora del mismo. (3)

PROCEDIMIENTO: Ajuste el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizará la determinación. Posteriormente se determinó el valor del pH de la muestra.

2.3.4. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LA FLORE DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Se realizó la cromatografía en capa fina (TLC) del extracto de los cálices de la flor de Jamaica en placas de Sílica Gel 60 F₂₅₄ de 10 x 2,5 cm y en una placa de óxido de aluminio de igual dimensiones previamente activadas.

Se aplicó 10 µL de la muestra (Extracto de Jamaica concentrado), aplicando varias repeticiones en la placa cromatográfico.

A continuación se colocó la placa en la cámara cromatográfica previamente ambientada en el sistema de solvente utilizado en Bibliografía para el análisis de los compuestos de la

flor de Jamaica, sistema de solvente 1, acetato de etilo – ácido acético glacial – ácido fórmico – agua (100:11:11:26), v/v). Se dejó correr la placa hasta que frente el frete de solvente, se dejó secar, se observó en el UV-Vis y se reveló la placa con sulfato de Cerio. Se calentó la placa en el reverbero para facilitar la identificación de las manchas obtenidas y se calcularon los Rf de cada mancha. (Ver Placa TLC No. 1)

Al comparar la cromatografía del extracto obtenido con su similar en Bibliografía, determinamos que dos manchas son similares en color y en Rf siendo de esta manera:

TABLA No. 11 VALORES DE RF OBTENIDOS EN LA PLACA CROMATOGRÁFICA DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE JAMAICA

Compuestos*	Rf*	RESULTADO	Rf
Delfinidina-3-glucosido- Xilosa (hibiscina)	0,15	Delfinidina-3-glucosido	0,17
Cianidina-3-glucosido- Xilosa	0,2	Cianidina-3-glucosido	0,23

*Fuente WAGNER.H.PAG 286

Según datos de bibliografía la mancha color morado-violeta corresponde al compuesto delfinidina-3-glucosido-xilosa (hibiscina) con Rf de 0.15; mientras que la cianidina-3-glucosido –xilosa Rf 0.2 (Tabla No. 11).

También se procedió a realizar el fraccionamiento en columna de Sílica Gel a 3 mL de muestra de extracto de cálices de flor de Jamaica el solvente de elución utilizado que presente mejor separación en la columna fue con el sistema de solvente 2, acetato de etilo – 2-propanol – agua – ácido fórmico (6:2:2:1 v/v.) (Ver TLC No. 2)

La elución de la columna isocrática con acetato de etilo – 2-propanol – agua – ácido fórmico (6:2:2:1 v/v.) dio 14 fracciones, después se incrementó la polaridad a MeOH obteniendo las fracciones 15 -16 y finalmente con agua obteniendo las fracciones 17 – 21.

La identificación de cada una fracción se procedió mediante el uso de cromatografía en capa fina (TLC).

2.3.4.1. Comprobación en TLC de las fracciones de la columna

Las fracciones de la 1 a la 9 se utilizó un solvente de corrido acetato de etilo – ácido acético glacial – ácido fórmico – agua (100:11:11:26), v/v). Y rebelado con sulfato de cerio, mostrando en la placa que las fracciones 1, 2 y 4 no presento ningún compuesto, la fracción 3 un mancha a un Rf de 0,52. En las fracciones 7, 8 y 9 se obtuvo manchas redondas de color rosado a un Rf 0.30, 0.31, 0.30 respectivamente; se procedió a unir estas fracciones ya que presentaron igual valor de Rf. (ver TLC No. 3)

La cromatografía de las fracciones 10 – 14 presentaron tres manchas cada uno a los mismos Rf de 0.14, 0.21, 0.28 (ver TLC No. 4). Las muestras 15, 16, 17 y 18 corrieron con el solvente n-butanol – ácido acético – agua (50:10:20), dando para la fracción 15 dos manchas muy cercanas a Rf 0.06 y 0.16; la fracción 16 un Rf a 0.16 y la fracción 18 Rf 0.17. La fracción 17 no presentó ninguna mancha, a las fracciones 16 y 18 posiblemente contengan los mismos compuestos de la fracción 15 por lo que se unen estas fracciones.

Se realizó la comparación de cada uno de los Rf obtenidos para las fracciones con el fin de determinar sus posibles compuestos junto con las lecturas de la espectroscopia ultravioleta, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla No. 14, con cada una de las referencias para los posibles compuestos.

TABLA No. 12 PLACAS CROMATOGRÁFICAS DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE FLOR DE JAMAICA.

TLC No. 1	TLC No. 2
Fase estacionaria: Sílica Gel F ₂₅₄	Fase estacionaria: Sílica Gel F ₂₅₄
Muestra: Extracto de flor de Jamaica	Muestra: Extracto de flor de Jamaica
Solvente de recorrido: ácido acético glacial – ácido fórmico – agua (100:11:11:26), v/v)	Solvente de recorrido: Acetato de etilo – 2-propanol – agua – ácido fórmico (6:2:2:1 v/v.)
Revelador: Sulfato de Cerio	Revelador: Sulfato de Cerio

	1	2
		

Rf: 0.15
0.2

TABLA No. 13 PLACAS CROMATOGRÁFICAS DE LAS FRACCIONES DE LA COLUMNA.

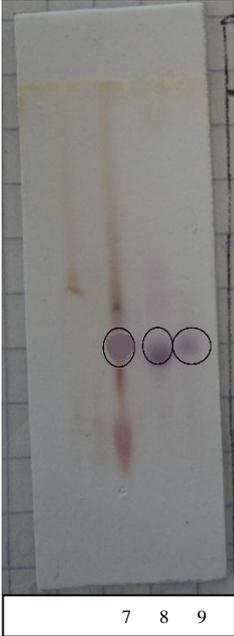
TLC No. 3	TLC No. 4	TLC No. 5
Fase estacionaria: Silicagel F ₂₅₄ Muestra: Fracciones 7 - 9 Solvente de recorrido: ácido acético glacial – ácido fórmico – agua (100:11:11:26), v/v) Revelador: Sulfato de Cerio	Fase estacionaria: Silicagel F ₂₅₄ Muestras: Fracciones 10 - 14 Solvente de recorrido: ácido acético glacial – ácido fórmico – agua (100:11:11:26), v/v) Revelador: Sulfato de Cerio	Fase estacionaria: Silicagel G F ₂₅₄ Muestras: Fracciones 15 – 17 Solvente de recorrido: n-butanol – ácido acético – agua (50:10:20) Revelador: Sulf Cerio
		
R _{f7} : 0.30 R _{f8} : 0.31 R _{f9} : 0.30	R _{f10-14} : 0,14 – 0,21 – 0,28	R _{f15} : 0,06 – 0,16 R _{f16} : 0,16 R _{f18} : 0,17

TABLA No. 14 VALORES DE RF Y UV-vis OBTENIDOS EN LA PLACA CROMATOGRÁFICA DE LAS FRACCIONES DE LA COLUMNA).

COMPUESTO	ESPECIFICACIÓN (Rf) *	UV-vis λ_{max} (nm)**	FRACCIONES	Rf	UV-vis (nm)
Peonidina - 3 - glucósido	0.34	534	7	0.30	225, 266
			8	0.31	222, 264
			9	0.30	225, 266
Peonidina - 3, 5 - di- glucósido	0.12	532	10 - 14	0.14	207, 225
Petunidina - 3 - glucósido	0.21	543	10 - 14	0.21	223, 231, 258
Cianidina - 3 - glucósido	0.25	523	10 - 14	0.28	210, 227
Delfinidina - 3 - glucósido	0.2	543	15	0.16	203, 320
			16	0.16	212, 275
			18	0.17	207, 273
Delfinidina - 3, 5 - di- glucósido	0.07	534	15	0.06	204, 285

*Fuente WAGNER.H.PAG 286

**Fuente: Colorantes Naturales – Olga Lock 1997.

2.3.5. CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES EN EL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LAS FLORES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Se realizó la cuantificación de los fenoles totales en el extracto de los cálices de la flor de Jamaica mediante el reactivo de Folin – Ciocalteu (FC). Este reactivo contiene una mezcla de ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) y el ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$) que se reduce por oxidación de los fenoles, originando óxido de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}), de color azul. La coloración azul producida es proporcional a la

concentración de compuestos fenólicos presentes y posee un absorbancia máxima a 756 nm.

El procedimiento emplea ácido gálico como compuesto de referencia para elaborar la curva de calibración.

Para la elaboración de la curva de calibración utilizando como referencia el ácido gálico se preparó soluciones de 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm de concentración.

Para la realización de la cuantificación en el extracto de los cálices de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), se preparó las muestras en el siguiente orden en un matraz de 10 mL aforado (38) (16)

1. 100 μ L de muestra (Extracto)
2. 5000 μ L de agua destilada
3. 500 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu
4. 2000 μ L de Carbonato de sodio al 20%
5. Aforar la mezcla con agua destilada
6. Esperar por 30 min para estabilizar la reacción
7. Leer la mezcla en el espectrofotómetro a 765 nm.

2.3.6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DIURÉTICA EN RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*)

Para la evaluación se utilizó el método de Naik y col, modificado por Saravia con algunos cambios en la metodología. Se utilizaron 19 ratas Wistar con peso promedio de 200 – 300 gramos, del mismo sexo dividido en grupos de 3 ratas cada para los tratamientos y 2 para el control positivo y blanco con un ayuno de 24 horas para todos los tratamiento, durante un periodo de experimentación de 5 días. La identificación de cada rata se realizó mediante marcas de azul de metileno en el lomo del animal a diferentes posiciones.

Los tratamientos a diferentes concentraciones de polifenoles se administraron por vía oral con solución salina (NaCl 0,9%) en un volumen igual a 4,5 mL; el lote control recibió

solución salina al igual que el bloque control positivo más una dosis de furosemida 20mg/Kg peso por vía intraperitoneal, en el mismo volumen de 4,5 mL; una vez hidratadas con todos los tratamientos se las colocaron en jaulas metabólicas adaptadas para la recolección de orina durante un periodo de 6 horas, se midió el volumen de orina cada dos horas hasta cumplir con el tiempo establecido para el ensayo. (43)

Durante todo el ensayo las ratas no recibieron agua ni alimento. Al finalizar el ensayo en los 5 días se realizó los siguientes cálculos a partir de la media de los datos obtenidos.

2.3.6.1. Porcentaje de Diuresis Respecto al Blanco

Es la cantidad de orina de cada tratamiento en relación a la orina promedio del blanco, se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de diuresis respecto al blanco} = \frac{X - \text{Control blanco}}{\text{Control blanco}} * 100$$

Donde:

X = al Volumen de orina del tratamiento X

Control blanco = volumen de orina del blanco

2.3.6.2. Acción Diurética de los Tratamientos

Es el porcentaje de diuresis respecto al grupo control positivo se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Acción diurética} = \frac{\text{Excreción urinaria del grupo tratado}}{\text{Excreción urinaria del grupo control}} * 100$$

2.3.6.3. Excreción Urinaria Volumétrica (E.U.V)

Es el volumen total excretado en relación al volumen total administrado, se calcula con la siguiente formula:

$$\text{Excreción urinaria} = \frac{\text{Volumen total excretado}}{\text{Volumen total administrado}} * 100$$

Una vez recolectado los datos se procede a un análisis estadístico para comprobar si existe diferencia alguna entre los diferentes tratamientos realizados, comparando estos con el control positivo de actividad comprobada. (24) (15)

2.3.7. TOXICIDAD AGUDA (DOSIS REPETIDA)

Se usó este estudio para hacer una validación estimada y experimental de las propiedades toxicológicas del extracto de los cálices de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) aportando información acerca de los riesgos para la salud, resultantes de una exposición a dosis repetida vía oral. Este ensayo se realizó de acuerdo a las técnicas recomendada por Adamaris Saravia. (24) (13)

Se utilizó un lote de 4 ratas machos, una rata utilizada como blanco y las 3 ratas utilizada para cada tratamiento, los animales tenían 2 a 3 meses de edad y fueron acondicionados en jaulas individuales, cumpliendo previamente un periodo de readaptación de 3 días. Se alimentó con fórmula peletizada y agua *ad libitum*.

Se administró por vía oral el extracto de la dosis que presento mejor efecto, a doble concentración en un volumen igual de 4 mL de extracto. Tras administrados los animales fueron privados de alimentos y agua durante un periodo de 4 horas.

El periodo de observación fue de 14 días, los primeros tres días de administración del extracto se realizó una observación cuidadosa del animal de cada animal a las 30, 60,

120, 240 y 360 minutos después de la administración, transcurrido los tres días la observación se realizó periódicamente cada 24 horas hasta completar los 14 días, se registraron los signos clínicos como el peso de los animales. (30)

2.3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el test de ANOVA (Análisis de varianza), que permite comparar las medias de n grupos. El modelo ANOVA presupone que las varianzas de los grupos son iguales y que los residuos o errores son aleatorios, independientes e idénticamente distribuidos siguiendo la ley normal con media 0 y desviación constante. La hipótesis nula de la prueba ANOVA de un factor es:

H_0 = las medias de los n grupos son iguales

H_a = Al menos unas de las medias es diferente

Esta prueba se basa en la comparación de la suma de los cuadrados medias, debido a la variabilidad entre grupos y a la variabilidad intra grupos. Ambas sumas son estimaciones independientes de la variabilidad global, de manera que si el cociente entre la primera y la segunda es grande, se tendrá mayor probabilidad de rechazar la hipótesis nula.

La hipótesis nula de igualdad de medias se rechaza en el caso que p valor $< 0,05$ caso contrario no hay evidencia suficiente para poder rechazarla.

Con ayuda del test de Tukey nos permite probar todas las diferencias entre las medias de tratamientos de una experimentación, colocando a los diferentes tratamientos en grupos homogéneos o heterogéneos dependiendo el caso, normalmente se trabaja con un nivel de confiabilidad del 95%.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se expondrán en cuadros los datos experimentales con una media de los valores obtenidos de cada uno de las determinaciones analizadas.

3.1. CONTROL DE CALIDAD DEL VEGETAL CRUDO, FLORES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Para el análisis se recolectó el material vegetal en la parroquia de Pomona, Provincia de Pastaza. Se realizó la comprobación taxonómica e identificación macro-morfológica del material vegetal.

Se realizó los análisis de control de calidad de las flores frescas de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), con muestras por triplicado para cada prueba, con la que se obtuvo los siguientes resultados:

CUADRO No. 1 RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS FLORES FRESCAS DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

PARÁMETRO	%	LÍMITES*
Contenido de Humedad	88.25	8 -14%
Contenido de Cenizas totales	5.02	≤ 12%
Contenido de Cenizas solubles en agua	3.47	≤ 7%
Contenido de Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	0.01	≤ 5%

*Farmacopea Española 2002

3.1.1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Se observó que las flores de Jamaica en estado fresco presentaban un contenido de humedad promedio de 88.25% este valor experimental es cercano a los reportados por otros autores como Duke (1983) de 84.5%, Babalola et (2001) de 86.50% y el Departamento de agricultura de Estados Unidos (USDa 2004) de 86,58%. Es de resaltar que la variación del valor experimental promedio respecto a los reportados oscila entre 1.75 y 3.75 %.

Para un almacenamiento a futuro de los cálices de las flores de Jamaica es recomendable secarlas para que el contenido de humedad no afecte su estado de almacenamiento evitando el crecimiento bacteriano conllevando al deterioro de las flores, según la Real Farmacopea Española (2002) el porcentaje de humedad debe encontrarse entre los límites 8 a 14% para productos naturales.

3.1.2. DETERMINACIÓN DE CENIZAS

Para esta determinación se utilizó las flores de Jamaica secadas en la estufa.

En lo que corresponde a las cenizas totales se obtuvo un valor promedio de 5.02%, el cual indica que no está constituida mayormente por componentes inorgánicos como metales pesados. Muchas de las plantas medicinales de uso tradicional poseen un valor de cenizas totales oscilantes entre 3-5%, por lo que los valores encontrados para la flor de Jamaica pueden considerarse dentro de los límites establecidos. Si dicho valor sobrepasara el 12 % que establece la Farmacopea española (2002), el vegetal deberá ser rechazado ya que puede existir contaminación en la misma que no es el caso del vegetal analizado.

Para las cenizas solubles en agua, tenemos un valor promedio de 3.47%, que da un indicativo de la calidad de las flores antes de ser utilizadas el cual es inferior al 7% límite establecido por la Real Farmacopea Española (2002).

El contenido de cenizas insolubles en ácido se obtuvo un valor promedio de 0.01% el cual representa el contenido de material inorgánico extraño como tierra o arena al igual que los anteriores analices este se encuentra dentro de los límites establecidos por la Real Farmacopea Española (2002).

3.2. ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LA FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Se muestra en el siguiente cuadro los resultados en cuanto a las propiedades físico-químicas del extracto de los cálices de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)

CUADRO No. 2 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LA FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

PARÁMETRO	RESULTADO
Requisitos organolépticos	Olor característico, libre de olores extraños Sabor amargo Color Rojo intenso Aspecto Líquido homogéneo
Densidad relativa (g/mL)	1.0272
Índice de Refracción	1.343
pH	3.2
°Brix	6.9

Las propiedades organolépticas en el extracto Hidroalcohólico de los cálices de las flores de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), dio como resultado que presentaban un olor característico libre de olores extraños y sabor amargo, una coloración rojo intenso, su aspecto fue líquida homogénea sin presencia de fases.

La densidad relativa obtenida fue de 1.0272 g/mL la cual es aproximadamente igual a la densidad del agua 1 g/mL por esta razón el extracto es de aspecto líquido. El índice de refracción fue de 1.343, la cual nos indica un contenido notorio de sólidos totales en

comparación al índice de refracción del agua que es de 1.333 y se concuerda con el resultado de los °Brix 6.9.

El pH del extracto de los cálices de las flores de Jamaica obtenido fue de 3.2 indicando que es un extracto ácido, este parámetro concuerda con el valor de expuestos por el autor Duke (1983) que va de 3 a 4.

3.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS CROMATOGRAFÍAS DEL EXTRACTO Y FRACCIONES OBTENIDAS

En la placa cromatográfica del extracto de los cálices de Jamaica (TLC No. 1) con el solvente de corrido: acetato de etilo – ácido acético glacial – ácido fórmico – agua (100:11:11:26), v/v) para fines comparativos con bibliografía, presentaron Rf similares que podrían pertenecer a los compuestos delfinidina-3-glucosido-xilosa (hibiscina) a Rf 0.17 y cianidina-3-glucosido-xilosa a Rf 0.23 encontrados como compuestos mayoritarios en la fuente bibliográfica del autor (Wagner. H, 1929)

Para la realización de la columna cromatográfica se utilizó como fase móvil el solvente: acetato etilo – 2-propanol – agua – ácido fórmico (6:2:2:1 v/v.) ya que presento una buena separación de cada uno de los compuestos presentes (TLC No. 2)

A las fracciones de la columna, 1 a la 9 se realizaron sus respectivas cromatografías utilizando el solvente de corrido acetato de etilo – ácido acético glacial – ácido fórmico – agua (100:11:11:26), v/v), la placa presento manchas definidas para la fracción 3 a un Rf de 0.52. Las fracciones 7, 8 y 9 se observó una solo mancha para cada una a un Rf 0.30, 0.31, 0.30 de coloración morada - azulado al revelar con sulfato, este cambio de color es característico de los flavonoides, posiblemente puede pertenecer Peonidina-3-glucósido (Ver Tabla No. 14); al presentar similares Rf se procedió a unir estas fracciones (TLC N° 3).

En las fracciones 1, 2 y 4 no se observaron ninguna mancha cromatográfica al revelar la placa por lo que se asume que no existe ningún compuesto presente.

La cromatografía de las fracciones 10 a la 14 presentaron tres manchas cada una al utilizar el solvente: acetato de etilo – ácido acético glacial – ácido fórmico – agua (100:11:11:26 v/v), obteniéndose los Rf para cada mancha de 0.14, 0.21, 0.28 (TLC No. 4) de coloración azul al revelar con sulfato de cerio, siendo posiblemente los siguientes compuestos Peonidina-3, 5- di-glucósido, Petunidina-3-glucósido y Cianidina-3- glucósido respectivamente (Tabla No. 14), de igual manera el revelador nos indica la presencia de flavonoides por el cambio de coloración.

Para las fracciones 15, 16, 17 y 18 se utilizó el solvente de corrido: n-butanol – ácido acético – agua (50:10:20, v/v), dando así para la fracción 15: dos manchas de coloración azulada al revelar con sulfato de cerio, muy cercanas a Rf 0.06 y 0.16 que posiblemente pueden pertenecer a Delfinidina-3, 5-di-glucósido y Delfinidina-3-glucósido respectivamente, la fracción 16 presento una mancha azulada a un Rf a 0.16 y la fracción 18 de igual forma a un Rf 0.17.

3.4. CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

La cuantificación se realizó según la técnica descrita en el capítulo II, con un promedio de tres repeticiones para el extracto de las los cálices de la flor de Jamaica. El extracto tubo una disolución previa a la medición de 1/10. Para la obtención del extracto total se partió de 240g de muestra (cálices de la flor de Jamaica).

El cálculo de la concentración de polifenoles se obtuvo a partir de la ecuación de la curva de calibración de ácido gálico realizada previamente al ensayo. Los resultados obtenidos tanto como de la curva de calibración y las lecturas de absorbancia para las muestras se muestran a continuación:

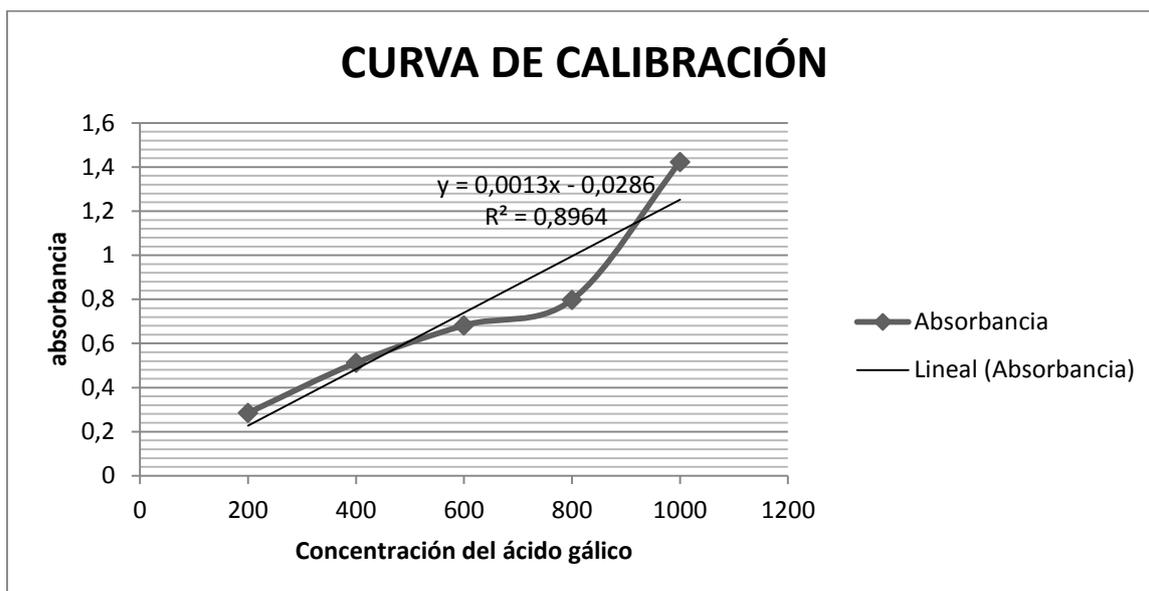


GRÁFICO No. 1 CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ÁCIDO GÁLICO

La gráfica No. 1 muestra la curva de calibración obtenida de ácido gálico a las concentraciones de 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm; Los valores de absorbancia obtenidos aumentan de acuerdo a la concentración del ácido tiendo así al ecuación de la curva $y = 0,0013x - 0,0286$ que permite calcular la concentración de polifenoles para las muestras problemas.

CUADRO No. 3 RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DE ABSORBANCIA EN EL EXTRACTO DE LOS CÁLICES DE LAS FLORES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Muestra	Absorbancia
1	0,536
2	0,530
3	0,533
Promedio	0,533

Remplazando el valor de la absorbancia promedio en la ecuación de la curva de calibración y calculando para el extracto sin disolución tenemos:

CUADRO No. 4 CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES EN EL EXTRACTO TOTAL Y POR CADA GRAMO DE MUESTRA VEGETAL

Absorbancia	Concentración (ppm)	Concentración en el extracto
		Total mg/mL
0,533	432	4,32
Concentración de polifenoles por cada gramo de muestra		
2,916 mg/g de muestra		0,29%

El cuadro No. 4 muestra el contenido de polifenoles en mg por cada mL de extracto teniendo un resultado de 4,32 mg/mL de una muestra total de 240g de cálices de flor de Jamaica. El contenido de polifenoles por gramo de muestra de cálices fue de 2,916mg/g representando el 0,29% dentro de la muestra fresca.

3.5. ACTIVIDAD DIURÉTICA DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LAS FLORES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

3.5.1. RESULTADOS DE LA ADMINISTRACIÓN DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LAS FLORES DE JAMAICA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POLIFENOLES

En este estudio se administró el extracto de los cálices de la flor de Jamaica a diferentes concentraciones de polifenoles como tratamiento para cada uno de los grupos de ratas a analizar, al grupo control positivo se le administro el diurético furosemida (20 mg/Kg peso) y al blanco solución salina al 0,9%. Los tratamientos fueron inoculados por vía oral usando una cánula que depositó el extracto directamente en el estómago de la rata. La furosemida se administró vía intraperitoneal (IP) en el grupo control. Para todos los tratamientos el volumen de administración VO fue de 4,5 mL.

El ensayo farmacológico tuvo una duración de 6 horas en las cuales se recogió la orina según la metodología descrita en el capítulo II cada dos horas, realizando la medición del volumen a estos tiempos y obteniendo un volumen total de diuresis al final del ensayo (a las 6 horas) para cada grupo de tratamiento.

Una vez medido el volumen total en una probeta se realizó un promedio de las tres replicas para cada uno de los bloques de tratamiento, los resultados obtenidos se muestran en el siguiente cuadro:

CUADRO No. 5 RESULTADOS PROMEDIO DEL ENSAYO FARMACOLÓGICO DE DIURESIS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POLIFENOLES DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LA FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

VOLUMEN DE ORINA DE DE LOS BLOQUES POR DÍA								
TRATAMIENTOS	BLOQUES	1	2	3	4	5	PROMEDIO	PROMEDIO DE VOLUMEN FINAL
BLANCO (SF)	B1	2,0	2,2	1,8	1,8	2,0	2,0	2,0
	B2	2,2	2,0	1,8	1,8	2,2	2,0	
CONTROL POSITIVO	C1	9,9	6,8	6,4	8,0	9,0	8,0	8,0
	C2	8,5	7,0	7,0	8,5	9,0	8,0	
T1	RA1	1,7	1,8	1,6	1,5	1,7	1,7	1,6
	RA2	1,6	1,4	1,6	1,5	1,6	1,5	
	RA3	1,5	1,6	1,5	1,4	1,5	1,5	
T2	RB1	3,2	3,6	3,0	3,0	3,5	3,3	3,5
	RB2	3,9	3,5	3,4	3,0	3,5	3,5	
	RB3	3,8	3,8	3,6	3,4	3,6	3,6	
T3	RC1	3,0	3,0	3,0	2,8	3,2	3,0	2,9
	RC2	3,0	3	3,0	2,8	3,0	3,0	
	RC3	2,8	2,8	2,8	3,0	2,8	2,8	
T4	RD1	1,4	4,2	4,0	2,4	1,4	2,7	1,9
	RD2	1,1	1,9	1,2	1,6	1,1	1,4	
	RD3	1,1	2,0	2,0	1,2	1,1	1,5	
T5	RE1	0,6	0,8	0,8	0,8	0,9	0,8	0,9
	RE2	0,7	1,0	0,8	0,8	0,5	0,8	
	RE3	1,2	1,4	1,4	0,5	1,0	1,1	

Blanco = Suero Fisiológico o solución salina

Control positivo = Furosemida (20mg/Kg)

T1 = Extracto de Jamaica a una concentración de polifenoles, 10 mg/Kg

T2 = Extracto de Jamaica a una concentración de polifenoles, 20 mg/Kg

T3 = Extracto de Jamaica a una concentración de polifenoles, 30 mg/Kg

T4 = Extracto de Jamaica a una concentración de polifenoles, 40 mg/Kg

T5 = Extracto de Jamaica a una concentración de polifenoles, 80 mg/Kg

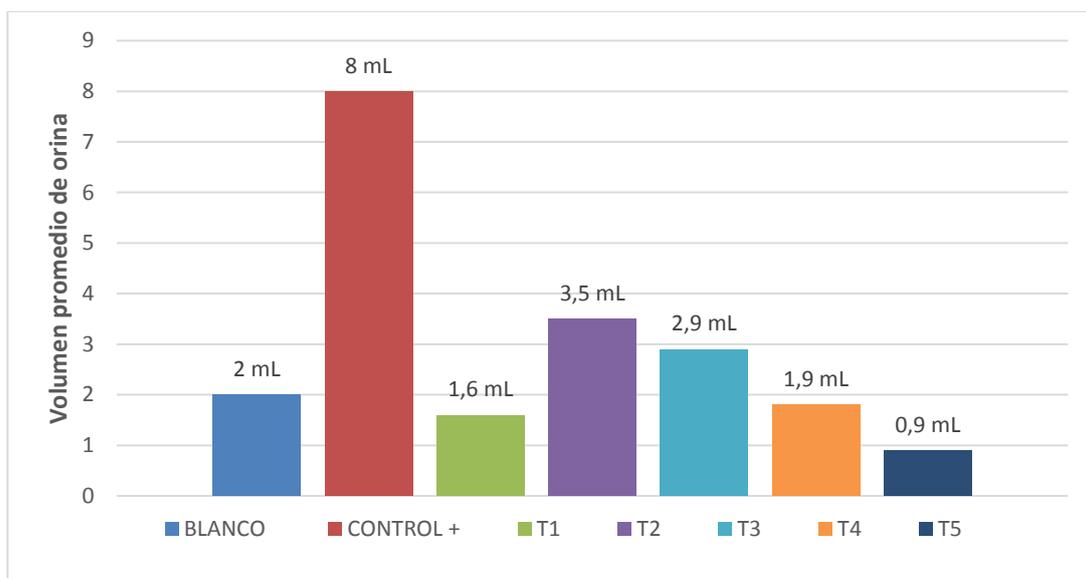


GRÁFICO No. 2 PROMEDIO DE LOS VOLÚMENES (mL) AL FINAL DEL ENSAYO DE DIURESIS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POLIFENOLES DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LA FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Análisis de resultados:

En la gráfica No. 2 se nota claramente que el promedio del volumen del control positivo del fármaco furosemida es mayor a todos los tratamientos incluyendo al blanco en una cantidad igual a 8 mL, el volumen de orina promedio del blanco es de 2 mL, los volúmenes de orina promedios obtenidos para cada uno de los tratamientos son T1 = 1,6 mL, T2 = 3,5 mL, T3 = 2,9 mL, T4 = 1,9 mL, T5 = 0,9 mL siendo el T2 el grupo que presento mayor volumen de orina en comparación con los otros tratamientos seguidamente del tratamiento T3; los tratamientos T1, T4 y T5 poseen un volumen inferior al del tratamiento blanco por lo que al parecer no muestran actividad diurética.

CUADRO No. 6 PORCENTAJE DE DIURESIS RESPECTO AL BLANCO DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LA FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) A SUS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POLIFENOLES

TRATAMIENTOS	VOLUMEN PROMEDIO FINAL (mL)	%
T1	1,6	-20
T2	3,5	75
T3	2,9	45
T4	1,9	-5
T5	0,9	-55

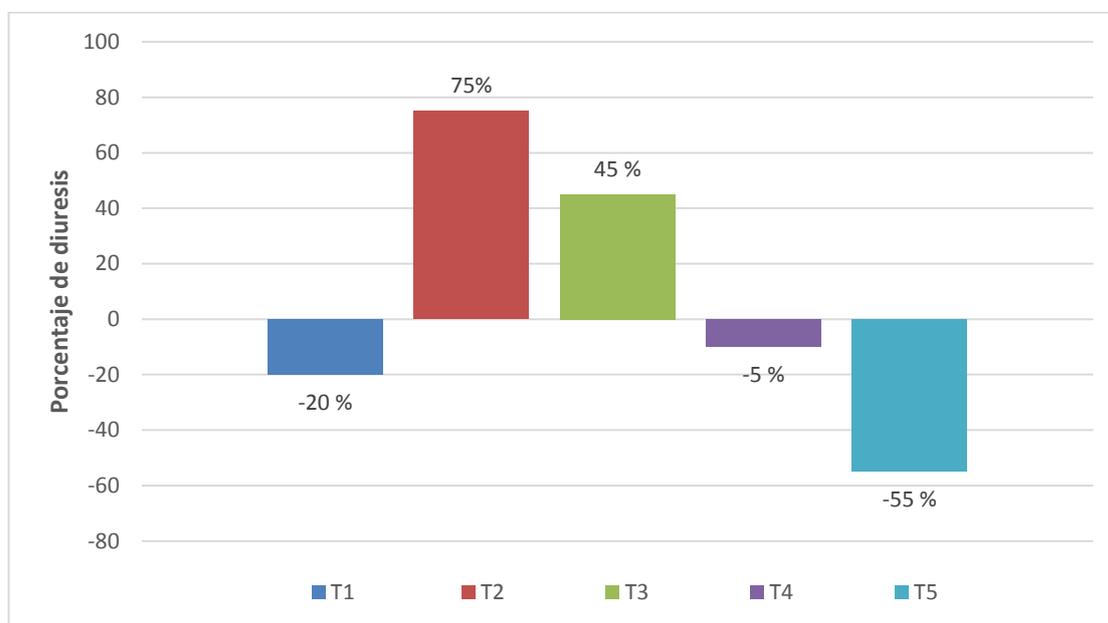


GRÁFICO No. 3 PORCENTAJE DE DIURESIS RESPECTO AL BLANCO DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LAS FLORES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) A SUS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POLIFENOLES

Análisis de resultados:

La gráfica No. 3 muestra el porcentaje de diuresis respecto al blanco observándose que el tratamiento T2 posee una buena actividad diurética del 75% respecto al volumen del blanco que es de 2 mL, seguidamente del T3 con el 45%. Los tratamientos T1, T4 y T5 poseen porcentaje negativo ya que su valor de diuresis promedio obtenido fue inferior a los 2 mL de orina del blanco.

CUADRO No. 7 PORCENTAJE DE ACCIÓN DIURÉTICA RESPECTO AL CONTROL POSITIVO DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LA FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) A SUS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POLIFENOLES

TRATAMIENTOS	VOLUMEN PROMEDIO FINAL (mL)	%
T1	1,6	21
T2	3,5	47
T3	2,9	39
T4	1,8	25
T5	0,9	12

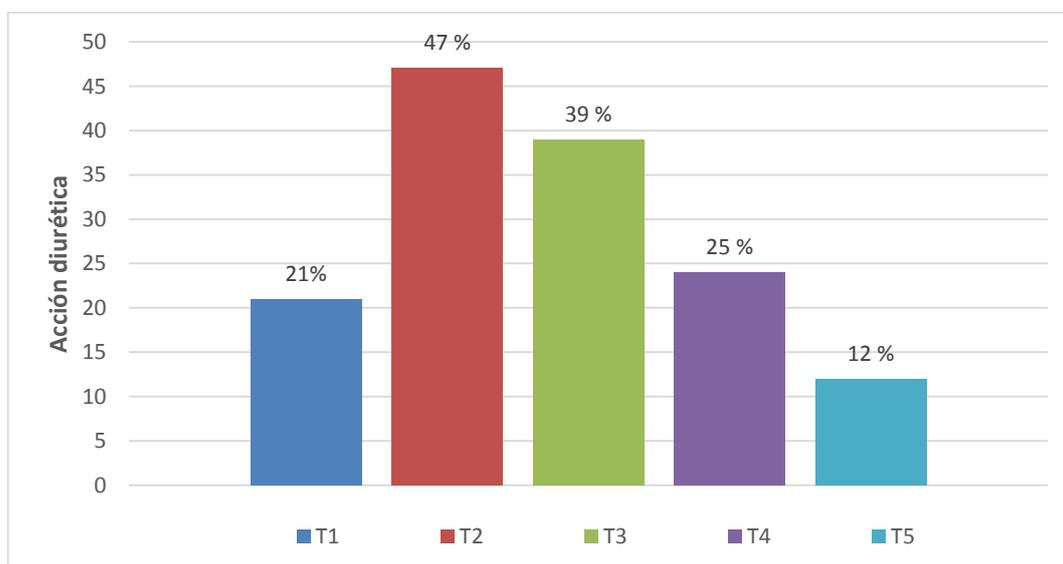


GRÁFICO No. 4 PORCENTAJE DE ACCIÓN DIURÉTICA RESPECTO AL CONTROL POSITIVO DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LAS FLORES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) A SUS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POLIFENOLES

Análisis de resultados:

La gráfica No. 4 muestra en porcentaje la acción diurética respecto al control positivo (furosemida) teniendo así para el T1 un 21%, T2 un 47%, T3 un 39%, T4 un 25% y para el T5 un 12%; de esta manera el T2 posee el mayor porcentaje de acción diurética frente a los demás tratamientos seguidamente del T3, sin embargo el T2 solo se aproximadamente el 50% de actividad diurética en relación al control positivo (furosemida) a una concentración de 20mg/mL de polifenoles.

CUADRO No. 8 CALCULO DEL VOLUMEN DE EXCRECIÓN URINARIA PARA CADA UNO DE LAS CONCENTRACIONES DE POLIFENOLES DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LA FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.).

TRATAMIENTOS	VOLUMEN PROMEDIO FINAL (mL)	%
BLANCO	2	44
CONTROL POSITIVO	8	178
T1	1,6	36
T2	3,5	78
T3	2,9	64
T4	1,8	42
T5	0,9	20

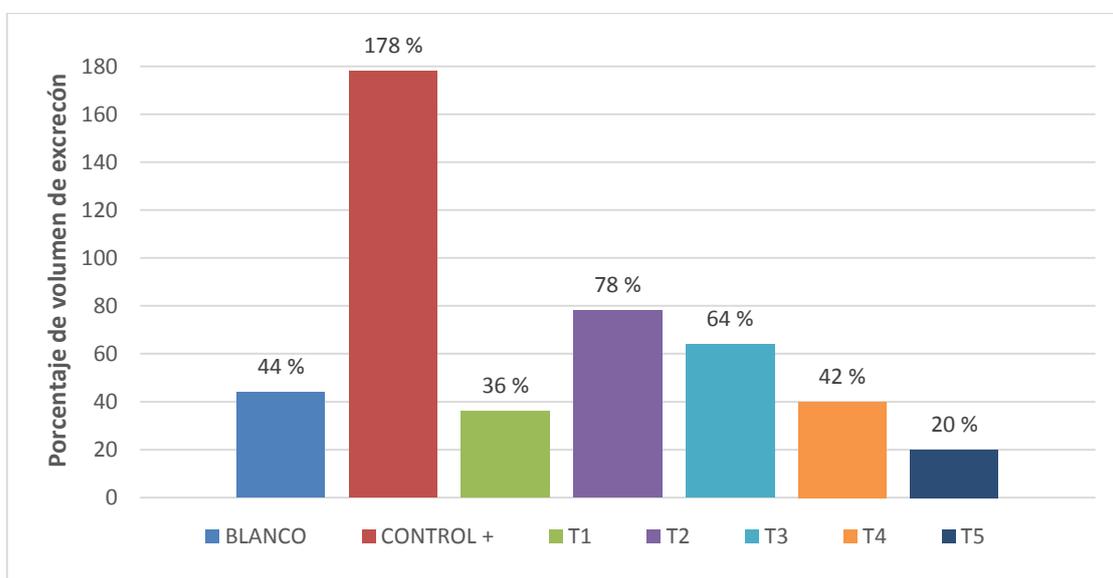


GRÁFICO No. 5 CALCULO DEL VOLUMEN DE EXCRECIÓN URINARIA PARA CADA UNO DE LAS CONCENTRACIONES DE POLIFENOLES DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LA FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.).

Análisis de resultados:

La gráfica No. 5 indica la cantidad de orina excretada en relación al volumen administrado (4,5 mL) en cada uno de los tratamientos incluyendo al blanco y al control positivo, teniendo de esta manera en porcentaje el volumen excretado de orina para el blanco que es del 44%, para el control positivo (furosemida) 178%, y para cada uno de los tratamientos T1 = 36%, T2 = 78%, T3 = 64%, T4 = 42%, T5 = 20%; podemos apreciar que el control positivo presenta mayor volumen de excreción orina en relación al

volumen administrado que es de 4,5 mL, en los tratamientos el que mejor volumen de excreción tuvo fue el T2 que elimino en un 78% el volumen administrado presentando una diuresis efectiva, seguidamente del T3, los demás tratamientos presentan porcentajes inferiores al del blanco por lo que se podemos considerar una retención de líquidos.

3.5.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A continuación se muestra el análisis estadístico para los volúmenes promedio finales a las 6 horas de ensayo de cada uno de los tratamientos aplicados, los valores estadísticos expuestos fueron obtenidos mediante la utilización del software G-STAT Student el cual también se utilizó para el análisis de varianza ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples TUKEY.

CUADRO No. 9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS TRATAMIENTO UTILIZADOS EN EL ENSAYO FARMACOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD DIURÉTICA DE LOS CÁLCICES DE LA FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Tratamientos	Blanco	Control positivo	T1	T2	T3	T4	T5
N	2	2	3	3	3	3	3
Media	2,0333	8,0033	1,5667	3,4667	2,9333	1,8667	0,9000
Mediana	2,0000	8,0000	1,5000	3,5000	3,0000	1,5000	0,8000
Varianza	0,0033	0,0003E-1	0,0133	0,0233	0,0133	0,5233	0,0300
Desviación típica	0,0577	0,0058	0,1155	0,1528	0,1155	0,7234	0,1732
Mínimo	2,0000	8,0000	1,5000	3,3000	2,8000	1,4000	0,8000
Máximo	2,1000	8,0100	1,7000	3,6000	3,000	2,7000	1,1000

Análisis de resultados:

El cuadro No. 9 presenta los valores estadísticos obtenidos en el software G-STAT Student para cada uno de los tratamientos, obteniéndose de esta manera las medias expuestas en el cuadro No 1 con una cifra decimal

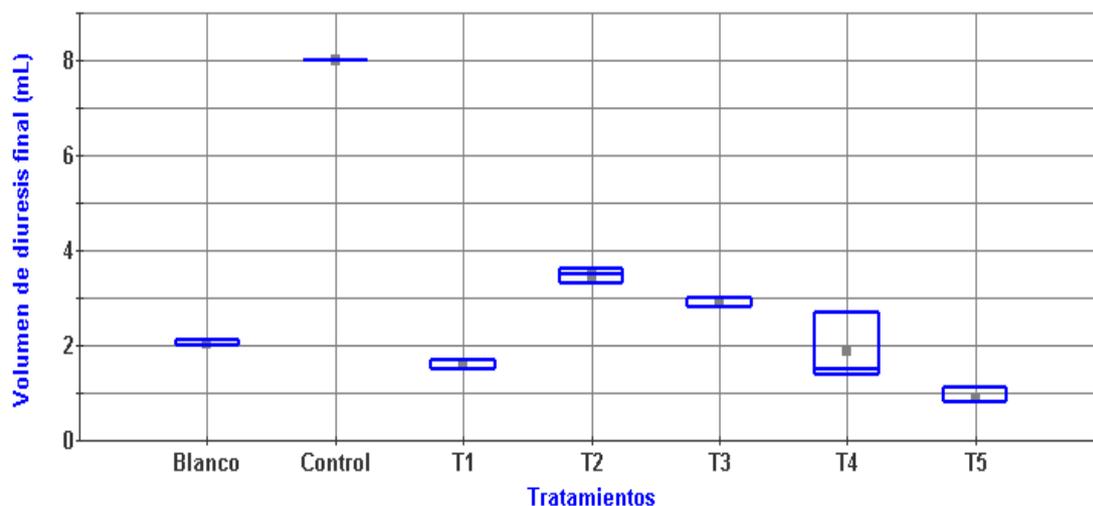


GRÁFICO No. 6 ANÁLISIS DEL VOLUMEN FINAL DE LOS TRATAMIENTOS

Análisis de resultados:

La gráfica No. 6 presenta el esquema de alambres y cajas para los tratamientos en ella observamos que todos los tratamientos tienen una buena uniformidad de datos acercándose al centro de la caja a excepción del T4 que posee una mayor dispersión en comparación a los demás, también indica que el mayor volumen de orina es del control positivo seguidamente del T2 y T3, el tratamiento T4 aparenta igual similitud al blanco, los tratamientos T1 y T5 se muestran en volumen inferior al del blanco.

CUADRO No. 10 ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LOS VOLUMES PROMEDIO FINALES DE CADA TRATAMIENTO

	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
ENTRE GRUPOS	101,7940	6	16,9657	195,7470	0,0001E-8
DENTRO GRUPOS	1,2134	14	0,0867		
TOTAL (Corr.)	103,0074	20			

Análisis de resultados:

En el cuadro No. 10 observamos el análisis de ANOVA para el estudio farmacológica de diuresis obteniendo un valor de $p=0,0001E-8$ a un nivel de significancia de 0,05 lo que significa que los resultados de los tratamientos son estadísticamente significativos y por tanto rechazaríamos al H_0 de que todos los extractos son iguales y no presentan diferencias, aceptando de esta manera al H_a la cual nos indica que al menos de los grupos son diferentes.

CUADRO No. 11 ANÁLISIS DE COMPARACIONES MÚLTIPLES (TEST DE TUKEY), PARA LOS VOLUMES PROMEDIO FINALES DE CADA TRATAMIENTO

TRATAMIENTOS	MEDIA	GRUPOS HOMOGÉNEOS
T5	0,9000	X
T1	1,5667	XX
T4	1,8667	X
BLANCO	2,0003	X
T3	2,9333	X
T2	3,4667	X
CONTROL POSITIVO	8,0033	X

Análisis de resultados:

El cuadro No. 11 observamos el análisis de comparaciones múltiples (TUKEY) a un nivel de confianza del 95%, mostrando que el control positivo que es el de mayor actividad (volumen de orina) presenta un grupo diferente a las demás tratamientos en cuanto a su media, los tratamientos T2 y T3 forman un grupo homogéneo siendo T2 el de mayor actividad dentro del grupo; el blanco junto con el T4 y T1 son considerados otro grupo homogéneo, el tratamiento T5 es el que posee menor media y por lo tanto menor actividad y mantiene homogeneidad con el T1.

3.5.3. TOXICIDAD AGUDA (DOSIS REPETIDA) DEL EXTRACTO DE LOS CÁLICES DE LAS FLORES DE JAMAICA

3.5.3.1. Resultados de la determinación de la toxicidad aguda en dosis repetida realizado en el Bioterio de la escuela de bioquímica y farmacia, facultad de Ciencias ESPOCH Marzo a Abril 2013

CARACTERÍSTICA	*VALORACIÓN	GRUPO DE ESTUDIO			
		Blanco	R1	R2	R3
Actividad general	4	4	4	4	4
Grito	0	0	0	0	0
Irritabilidad	0	0	0	0	0
Respuesta de toque	4	4	4	4	4
Huida	4	4	4	4	4
Contorciones	0	0	0	0	0
Patas posteriores	0	0	0	0	0
Enderezamiento	0	0	0	0	0
Tono corporal	4	4	3	3	3
Actividad prensil	4	4	4	4	4
Ataxia	0	0	0	0	0
Reflejo pineal	4	4	4	4	4
Reflejo corneal	4	4	4	4	4
Tremores	0	0	0	0	0
Convulsiones	0	0	0	0	0
Estimulaciones	4	4	4	4	4
Straub	0	0	0	0	0
Hipnosis	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0
Lagrimación	0	0	0	0	0
Ptoxis	0	0	0	0	0
Micción	4	4	6	6	6
Defecación	4	4	4	4	4
Pilo erección	0	0	0	0	0
Hipotermia	0	0	0	0	0
Respiración	4	4	4	4	4
Cianosis	0	0	0	0	0
No de muertos		0	0	0	0

*Los valores son atribuidos arbitrariamente a partir de aquellos que son considerados normales. Así los parámetros cuyos valores iniciales reciban una anotación de 4, pueden disminuir hasta 0, en el caso de desaparición de una respuesta analizada, o aumentar hasta 8, en el caso de un aumento de la respuesta. Para aquellas repuestas con una anotación normal 0 sólo podrá haber un aumento del efecto analizado que puede tener un record

máximo de 4. Mientras mayor es la distancia entre el máximo obtenido y el valor original más toxica es la sustancia. (24)

CUADRO No. 12 VALORES OBTENIDOS DE LA MEDICIÓN DEL PESO EN GRAMOS DURANTE EL ANÁLISIS DE TOXICIDAD AGUDA (DOSIS REPETIDA)

Grupo	Día 1	Día 2	Día 5	Día 7	Día 9	Día 11	Día 13	Día 14
Blanco	253,3	252,1	253,4	253,1	252,1	249,4	249,3	249,5
R1	256,4	254,3	254,4	253,4	252,3	252,4	251,4	250,2
R2	182,7	183,2	180,1	180,7	179,8	180,1	178,7	179,5
R3	235,2	235,5	230,3	230,2	229,5	230,1	228,2	229,9

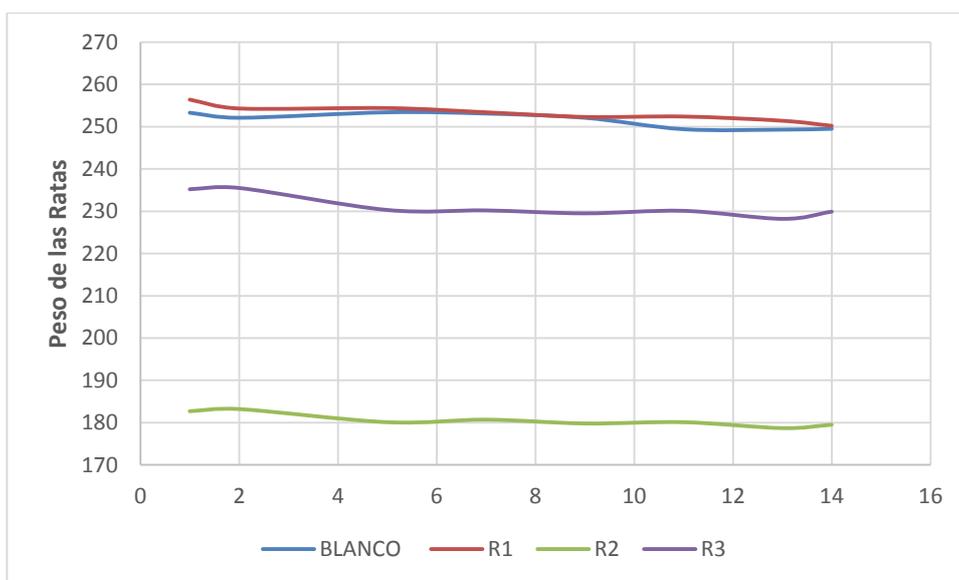


GRÁFICO No. 7 PESO DE LAS RATAS DURANTE EL ENSAYO TOXICOLÓGICO

Análisis de resultados: Observamos que el tratamiento toxicológico los parámetros a analizar no manifiestan ningún cambio a excepción de la micción que aumento durante el ensayo farmacológico. La gráfica No. 7 muestra la variación de peso durante el tratamiento toxicológico indicando que no existió ninguna variación significativa de este, pero muestra una ligera tendencia a la disminución del peso al final del ensayo la cual puede considerarse debido a la diuresis existente.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

- 1) Se confirmó la hipótesis a un nivel de confiabilidad del 95%, en ANOVA, dando que el mejor de los tratamientos es del 20 mg/Kg de polifenoles con una actividad diurética del 47% respecto al control + (furosemida) y un 75% en relación al Blanco (solución salina 0.9% NaCl) en los cálices de la flor de Jamaica cultivada en Pomona Pastaza.
- 2) Los resultados obtenidos en el control de calidad de los cálices de Jamaica, indica, humedad 88.25%, cenizas totales 5.02 %, cenizas solubles en agua 3.47% y cenizas insolubles en ácido 0.01%. El control de calidad del extracto hidroalcohólico indico un olor característico, de color rojo intenso, sabor amargo, densidad de 1.0272g/mL, índice de refracción de 1.343, pH de 3.2 y °Brix de 6.9.
Cuadro No. 2
- 3) El análisis cromatográfico del extracto de los cálices de la flor de Jamaica realizado sobre placa Sílica Gel F254 con el sistema de solventes acetato de etilo – ácido acético glacial – ácido fórmico – agua (100:11:11:26), v/v), dan Rf entre (0.17 - 0.23) comparados con los Rf de referencia (0.15 y 0.2) pertenecientes posiblemente a los compuestos del finidina-3-glucosido-xilosa y cianidina-3-glucosido-xilosa (Wagner).

La separación de los compuestos del extracto hidroalcohólico en la columna isocratica con el sistema de solventes acetato de etilo – 2-propanol – agua – ácido fórmico (6:2:2:1 v/v.), dio las fracciones: 7, 8 y 9 un Rf a 0.30, 0.31, 0.30 que, posiblemente puede pertenecer Peonidina-3-glucósido, 10 a la 14 presentaron tres manchas cada una a Rf de 0.14, 0.21, 0.28

Posiblemente, Peonidina-3, 5- di-glucósido, Petunidina-3-glucósido y Cianidina-3- glucósido respectivamente, utilizando el solventes acetato de etilo – ácido acético glacial – ácido fórmico – agua (100:11:11:26), v/v). Para las fracciones 15 con Rf 0.06 y 0.16, la 16, 18 con Rf a 0.16 y 0.17 que posiblemente pueden pertenecer a Delfinidina-3, 5-di-glucósido y Delfinidina-3-glucósido al ser corridas con n-butanol – ácido acético – agua (50:10:20, v/v).

- 4) Mediante el ensayo de Folin – Ciocalteu se pudo determinar que el extracto de los cálices de la flor de Jamaica posee un contenido de polifenoles igual 4,32mg/mL equivalente 0.29% de vegetal.
- 5) El ensayo farmacológico dio como resultado que los tratamientos T2 (20mg/kg) y T3 (30mg/kg) presentan una mejor acción diurética, con un 47% y 39% respecto al control + (furosemida) y un 75%, 45% en relación al blanco, respectivamente. T2 es el mejor tratamiento dentro del ensayo pudiendo considerarse como coadyuvante diurético. Además se confirmó que la acción diurética no es directamente proporcional a la concentración de polifenoles.
- 6) El ensayo toxicológico a dosis repetida que controla 27 parámetros no demostró efectos colaterales para el extracto de los cálices de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L) a una dosis de 40mg/kg durante 14 días lo cual se puede considerar como no toxico.

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

- 1) Se recomienda que para un almacenamiento prolongado de la flor de Jamaica es necesario deshidratarlo, controlando la temperatura para evitar degradación de compuestos, ya que su alto contenido de agua podría acelerar el deterioro del vegetal.
- 2) Se sugiere realizar el estudio de actividad antioxidante del extracto por la cantidad de compuestos polifenoles en el vegetal encontrados durante la realización de este ensayo y también un estudio sobre uso como colorante natural para futuras aplicaciones.
- 3) Se recomienda tomar todas las precauciones al momento de cuantificar los polifenoles como es un ambiente libre de luz para evitar la degradación de estos compuestos o la lectura al tiempo determinado en la técnica.
- 4) Se aconseja tomar en cuenta todas las características encontradas a lo largo del estudio, tales como la actividad diurética a concentración de 20mg/Kg de polifenoles, para poder profundizar el mecanismo de acción del extracto.

CAPÍTULO VI

6. RESUMEN

La evaluación de la actividad diurética y cuantificación de polifenoles de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) se llevó a cabo en laboratorios de Fitoquímica, Bioterio, e Instrumental de la facultad de Ciencias de la ESPOCH utilizando los cáliz de la flor para el efecto diurético en *Rattus norvegicus* con pesos promedio de 250 g tratadas en jaulas metabólicas, mediante el método experimental.

El objetivo de este trabajo fue conocer el efecto diurético del extracto hidroalcohólico de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. Administrados vía oro faríngea, en 6 lotes de ratas representando a los grupos: Blanco, Control positivo y los diferentes tratamientos RA, RB, RC, RD con diferentes concentraciones de fenoles.

La cuantificación de los polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu dio 0.29%. la identificación de los posibles metabolitos se realizó por cromatografía en capa fina y columna, con el solvente Acetato de etilo – 2-propanol – agua – ácido fórmico (6:2:2:1 v/v.) determinando la presencia de delfinidina-3-glucosido-xilosa (Hibiscina) y la cianidina-3-glucosido-xilosa.

La diuresis del Blanco es 2 mL, el control positivo (furosemida) da 8 mL, los polifenoles 10, 20, 30, 40, 80 mg/Kg dan 1.6; 3.5; 2.9; 1.9; 0.9 mL de orina respectivamente.

Se concluyó que con 20mg/Kg que posee un porcentaje de diuresis en relación al blanco del 75% y frente al control de un 47%, con un volumen de excreción al administrado de 78% y que el extracto no presenta toxicidad alguna.

Se recomienda continuar con el estudio para comprobar el mecanismo de acción del extracto hidroalcohólico de los cálices de Jamaica en su acción diurética.

SUMMARY

The diuretic activity evaluation and quantification of polyphenols Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) was carried out in laboratories of Phytochemistry, Vivarium, and Instrumental of the Faculty of Sciences ESPOCH, using the calyx into flower for *Rattus norvegicus* diuretic effect on average weights 250 g treated in metabolic cages using the experimental method.

The aim of this study was to determine the diuretic effect of hydroalcoholic extract of the calyxes of *Hibiscus sabdariffa* L. administered via oropharyngeal, in 6 batches of rats representing groups: White, Positive control and the different treatments RA, RB, RC, RD with different concentrations of phenols.

The quantification of polyphenols by the Folin-Ciocalteu method gave 0.29%. identification of potential metabolites was performed by thin layer chromatography on and column with the solvent ethyl acetate – 2-propanol – water – formic acid (6:2:2:1 v/v) determining the presence of delphinidin-3-glucoside-xylose (Hibiscina) and cyanidin-3-glucoside-xylose.

White diuresis is 2 mL, positive control (furosemide) gives 8 mL, polyphenols 10, 20, 30, 40, 80 mg/Kg given 1.6, 3.5, 2.9, 1.9, 0.9 mL of urine, respectively.

It was concluded that 20 mg/Kg possessing a diuresis percentage relative to the target of 75% and to control by 47%, with an administered volume of the excretion of 78% and that the extract does not present any toxicity.

It is recommended to continue the study to test the action mechanism of the hydroalcoholic extract of the calyxes of Jamaica in its diuretic effect.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **BALLVÉ, CECILIA A. NORMA, S.,** Plantas medicinales de uso popular, atlas Farmacognóstico., Sao paulo-Brasil., Ulbra., 2004., Pp 17-18
2. **CACERES, A.,** Plantas de uso medicinal en Guatemala., Guatemala-Guatemala., Editorial Universitaria., 1999., Pp. 322-324
3. **CASTILLO, E.,** Manual de fitoterapia., Barcelona-España., Elsevier Masson., 2007., Pp. 57-63, 69
4. **DONALD, C.,** Essentials of Pharmaceutical Chemistry., 3ra ed., Londres-Inglaterra., Pharmaceutical Press., 2008., Pp 62
5. **DOUGLAS, A.,** Principios de Análisis Instrumental., 6ta ed., México DF-México., Cengage learning., Inc., 2008., Pp 848-850.
6. **HALVERSON, M.,** Guía para cuidados y uso de Animales de Experimentación., Buenos Aires-Argentina., Ed Universitaria., 2005., Pp 90

7. **HANS, G.**, Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays., 3ra ed., Berlín-Alemania., Springer., 2007., Pp 458-461
8. **JIMÉNEZ, E.**, Evaluación de Fármacos y Medicamentos II., México DF-México., Universitaria., 2012., Pp. 35-38
9. **MARCANO, D Y MASAHISA, H.**, Fitoquímica orgánica., 2da ed., Caracas-Venezuela., Universitaria., 2002., Pp 29, 32, 61, 81, 84
10. **MARTÍNEZ, A.**, Flavonoides., Medellín-Colombia., Ed universitaria., 2005., Pp 37 - 46
11. **MÉXICO, SECRETARIA DE SALUD. COMISIÓN PERMANENTE DE LA FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS.**, Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos., D.F. México – México., Secretaria de salud., 2001., Pp. 57-58
12. **NICANDRO MENDOZA, P.**, Farmacología médica., México DF-México., Medica panamericana., 2008., Pp 529-531
13. **NIKOLAI SHARAPIN.**, Fundamentos de tecnología de productos Fitoterapéuticos., Medellín-Colombia., CAB., 2000., Pp. 20-22, 40, 50-53
14. **OLGA LOCK, S.**, Colorantes Naturales., Lima-Perú., Universitaria., 1997., Pp. 95- 107

15. **POLL, E.**, Plantas comestibles y tóxicas de Guatemala., 2da ed., Guatemala-Guatemala., Centro de estudios conservacionistas (CECON)., 1984., Pp. 45
16. **ROSALES, M.**, Los diuréticos: aspectos básicos y clínicoterapéuticos., Caracas-Venezuela., Med-ULA., 1994., Pp 75 -78
17. **SARAVIA, A.**, Manual de Ensayos Toxicológicos y Farmacológicos experimentales in vivo e in vitro., Guatemala-Guatemala., Edición Universitaria., 2005., Pp.504-505
18. **SOLÍS, P.**, Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos., Organización de los Estados Americanos., 2001., Pp. 43-68, 77-78, 84-91
19. **VANACLOCHA BERNAT.**, Fitoterapia Vademécum de Prescripción., 3ra ed., Madrid-España., 2003., Pp. 29
20. **WAGNER, H.**, Plant Drug Analysis., 2da ed., Berlín-Alemania., Springer., 1996., Pp. 286-287
21. **BLANQUER HERNÁNDEZ, A.**, Rdf revista de fitoterapia., Interés de la flor de hibisco en problemas cardiovasculares., México DF-México., Rf ed., 2009., Pp.25-32

22. **CARVAJAL OCTAVIO.**, Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana., Los usos y maravillas de la Jamaica., México DF-México., Universitaria., 2006., Pp. 1-3
23. **KOMAITIS.**, Agric Food Chem., Análisis de los componentes polifenólicos de extractos de plantas., Londres-Inglaterra., Universitaria., 2005., Pp. 1190-1195.
24. **PROESTOS, C.**, OFFARM., Hibisco *Hibiscus sabdariffa* L. (malváceas). Plantas medicinales y drogas vegetales., Madrid-España., OFFARM., 2003., Pp. 185-186
25. **ARRIAGA, I.**, Caracterización, extracción y estabilidad de los colorantes naturales presentes en el cáliz de *Hibiscus sabdariffa* L. (rosa de Jamaica) como alternativa del consumo como colorante artificial., Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia., Química Farmacéutica., Universidad San Carlos de Guatemala., Guatemala-Guatemala., TESIS., 2007., Pp. 4, 24
26. **ARRIAGA IRMA, L.**, Caracterización, extracción y estabilidad de los colorantes naturales presentes en el cáliz de *Hibiscus sabdariffa* L. (rosa de Jamaica) como alternativa del consumo como colorante artificial., Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia., Química Farmacéutica., Universidad San Carlos de Guatemala., Guatemala-Guatemala., TESIS., 2007., Pp. 4, 24

27. **ARRANZ, S.**, Compuestos Polifenólicos (Extraíbles Y No Extraíbles) En Alimentos De La Dieta Española: Metodología Para Su Determinación e Identificación., Facultad de Farmacia., Bromatología., Universidad Complutense de Madrid., Madrid-España., TESIS., 2010., Pp. 19-23

28. **CORTÉS CABRERA, J.**, Actividad biológica de extractos de plantas usadas para el tratamiento del cáncer e infecciones en Tepatepec, Hidalgo., Facultad de Biología., Biología., Universidad autónoma del Estado de Hidalgo., Tepatepec., TESIS., 2005., Pp.14-15

29. **HERRERA, A.**, Evaluación clínica de la tolerabilidad, seguridad y efectividad antihipertensiva de un extracto estandarizado de *Hibiscus sabdariffa* L. (Jamaica) en pacientes ambulatorios., División de ciencias biológicas y salud., Ciencias Biológicas., Universidad Autónoma Metropolitana., México DF-México., TESIS., 2006., Pp. 16-22

BIBLIOGRAFÍA INTERNET

30. **ACCIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS FLAVONOIDES.**
<http://www.elergonomista.com/fitoterapia/flavonoidesaccion.htm>
2013/03/02

31. **ACTIVIDAD DIURÉTICA Y ANTIPIRÉTICA DE UN EXTRACTO FLUIDO DE *Rosmarinus officinalis*. L. EN RATAS**
[http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/actividad_diu
retica_y_antipiretica_de_un_extracto_fluido_de_rosmarin
us_officinalis_l_en_ratas.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/actividad_diu
retica_y_antipiretica_de_un_extracto_fluido_de_rosmarin
us_officinalis_l_en_ratas.pdf)
2013/05/01

32. **ACTIVIDAD DIURÉTICA DEL EXTRACTO TOTAL ACUOSO DE LOS CÁLCICES DE *Hibiscus sabdariffa* L. ADMINISTRADO EN RATAS ALBINAS VARIEDAD WISTAR.**
[http://www.drscope.com/privados/pac/generales/desequili
brio/diurético.htm](http://www.drscope.com/privados/pac/generales/desequili
brio/diurético.htm)
2013/02/11

33. **ADMINISTRACIÓN POR VÍA ORAL DOSIS REPETIDAS (14 DÍAS) EN RATAS.**
[http://www.geamed.com/archivos/5.3.FR-
91.RENOVEN.BIO-BAC.pdf](http://www.geamed.com/archivos/5.3.FR-
91.RENOVEN.BIO-BAC.pdf)
2013/05/15

34. **APLICACIÓN DE MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS AL ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DE LOS COMPONENTES POLIFENÓLICOS PRESENTES EN VINOS.**
[http://bddoc.csic.es:8080/detalles.html?id=137233&bd=I
CYT&tabla=docu](http://bddoc.csic.es:8080/detalles.html?id=137233&bd=I
CYT&tabla=docu)
2013/04/22

35. **CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE JAMAICA (*Hibiscus Sabdariffa* L.)**

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1027-152X2008000200004&script=sci_arttext
2013/04/17

36. **CUANTIFICACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES EN EXTRACTOS NATURALES.**

http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf
2013/06/17

37. **CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.**

<http://es.scribd.com/doc/11642417/Cromatografia-Fundamentos-y-Aplicaciones>.
2013/06/14

38. **CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.**

<http://es.scribd.com/doc/14172697/6-Cromatografia-en-Columna>.
2013/06/17

39. **CROMATOGRAFÍA: R_f RELACIÓN DE FRENTE.**

<http://profefarmacognosia.blogspot.com/2009/05/cromatografia-rf-relacion-de-frentes.html>
2013/06/10

40. **EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES.**
http://ecosofia.org/2006/03/experimentacion_animales_la_boratorios_empresas
2013/06/14
41. **FARMACOGNOSIA DEFINICIONES**
<http://www.elergonomista.com/fitoterapia/definiciones.htm>
2013/04/16
42. **FLAVONOIDES**
<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001>
2013/04/24
43. **GUÍA: FLOR DE JAMAICA.**
<http://www.adeesnic.org/wp-content/uploads/2012/02/Gu%C3%ADa-Flor-de-Jamaica.pdf>
2013/02/20.
44. **GRUPO MODELOS EXPERIMENTALES PARA LAS CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DEL TOLIMA.**
<http://neurocienciaut.jimdo.com/bioterio/>
2013/04/15
45. **LA JAMAICA.**
<http://fundacionproducegro.org.mx/wp-content/uploads/2012/05/04-Jamaica.pdf>
2013/06/15

46. **LAS PLANTAS MEDICINALES Y LA SALUD HUMANA.**
<http://plantas-medicinales.servidor-alicante.com/docs/las-plantas-medicinales-y-la-salud-humana.pdf>
2013/02/16.
47. **LABORATORIO DE ENSAYOS BIOLÓGICOS, PRODUCCIÓN ANIMAL.**
http://lebi.ucr.ac.cr/index.php?option=com_content&view=article&id=43&Itemid=44
2013/05/22
48. **MANEJO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.**
<http://fisiologiafarmacia.wikispaces.com/file/view/laboratorios2012.pdf>
2013/05/13
49. **PLANTAS MEDICINALES CON ACCIÓN DIURÉTICA.**
http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13761&pident_usuario=0&pident_revista=4&fichero=04v20n01a01015pdf001.pdf&ty=81&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es
2013/03/01.
50. **PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS ANTOCIANIDINAS.**
<http://www.biocetnia.uson.mx/revistas/articulos/16-BIO-11-DPA-06.pdf>
2013/04/15

51. **RATAS DE LABORATORIO**

<http://www.profesorenlinea.cl/fauna/RatasLaboratorio.htm>

2013/04/05

52. **SÁYAGO-AYERDI.** *Hibiscus sabdariffa* L.: Fuente de fibra antioxidante.

<http://www.scielo.org.ve/pdf/alan/v60n1/art12.pdf>

2013/02/20

53. **VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS EN ANIMALES DE LABORATORIO.**

http://lebi.ucr.ac.cr/index.php?option=com_content&view=article&id=146&catid=21&Itemid=51

2013/05/23

CAPÍTULO VIII

8. ANEXOS

ANEXO No. 1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL



FOTOGRAFÍA No. 6 CULTIVOS Y RECOLECCIÓN DE LA FLOR DE JAMAICA EN POMONA-PASTAZA

ANEXO No. 2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS FLORES DE JAMAICA



FOTOGRAFÍA No. 7 FLORES FRESCAS Y CÁLCICES SEPARADOS DE LA FLOR DE JAMAICA



FOTOGRAFÍA No. 8 MACERACIÓN DE LOS CÁLCICES DE LA FLOR DE JAMAICA



FOTOGRAFÍA No. 9 CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO EN ROTAVAPOR

ANEXO No. 3 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA



FOTOGRAFÍA No. 10 FRACCIONES OBTENIDAS DEL EXTRACTO DE LOS CÁLCICES DE LA JAMAICA

ANEXO No. 4 CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES



FOTOGRAFÍA No. 11 CONCENTRACIONES DE ÁCIDO GÁLICO MEDIANTE LA REACCIÓN DE FOLIN-CIOCALTEU

ANEXO No. 5 ENSAYO FARMACOLÓGICO DE DIURESIS



FOTOGRAFÍA No. 12 LOTES DE RATAS UTILIZADOS EN EL ENSAYO FARMACOLÓGICO



FOTOGRAFÍA No. 13 ADMINISTRACIÓN VO, DE LOS TRATAMIENTOS A LAS RATAS

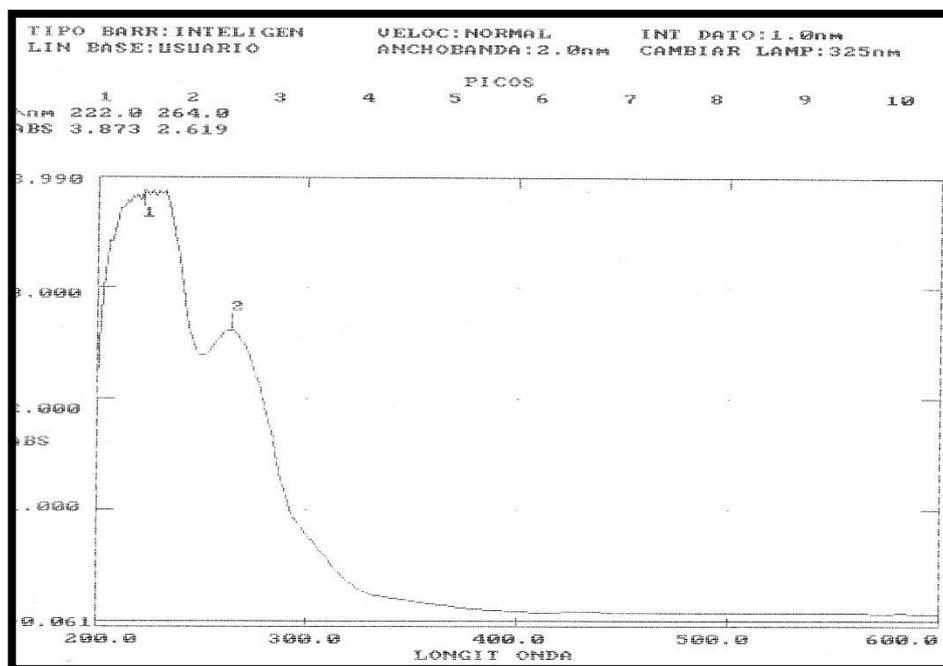


FOTOGRAFÍA No. 14 RECOLECCIÓN DE LA ORINA EN LAS JAULAS METABÓLICAS

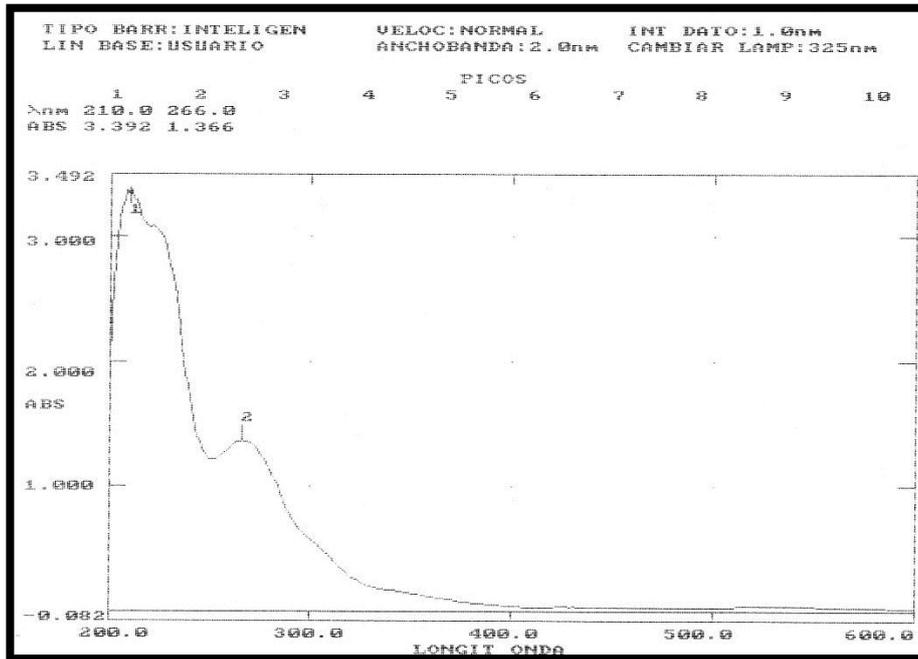
ANEXO No. 6 LONGITUDES DE ONDA MÁXIMA DE ALGUNOS COMPUESTOS ANTOCIANOS

Antocianina	Rf(x100)				$\lambda_{\text{máx}}$ nm en MeOH-HCl
	BAW	Bu.HCl	HOAc-HCl	1%HCl	
Pelargonidin-					
3-glucósido	44	38	35	14	506
3,5-diglucósido	31	14	45	23	504
5-glucósido	51	49	57	18	513
7-glucósido	46	51	—	15	508
3,7-diglucósido	30	10	70	38	497
Cianidin-					
3-glucósido	38	25	42	07	523
3,5-diglucósido	28	06	40	16	522
3-galactósido	37	24	26	07	
Malvidin-					
3-glucósido	38	15	29	06	534
3-galactósido	36	15	29	06	
3,5-diglucósido	31	03	61	34	
Delfinidin-					
3-glucósido	26	11	18	03	534
3-galactósido	23	11	18	03	
3,5-diglucósido	15	03	32	08	

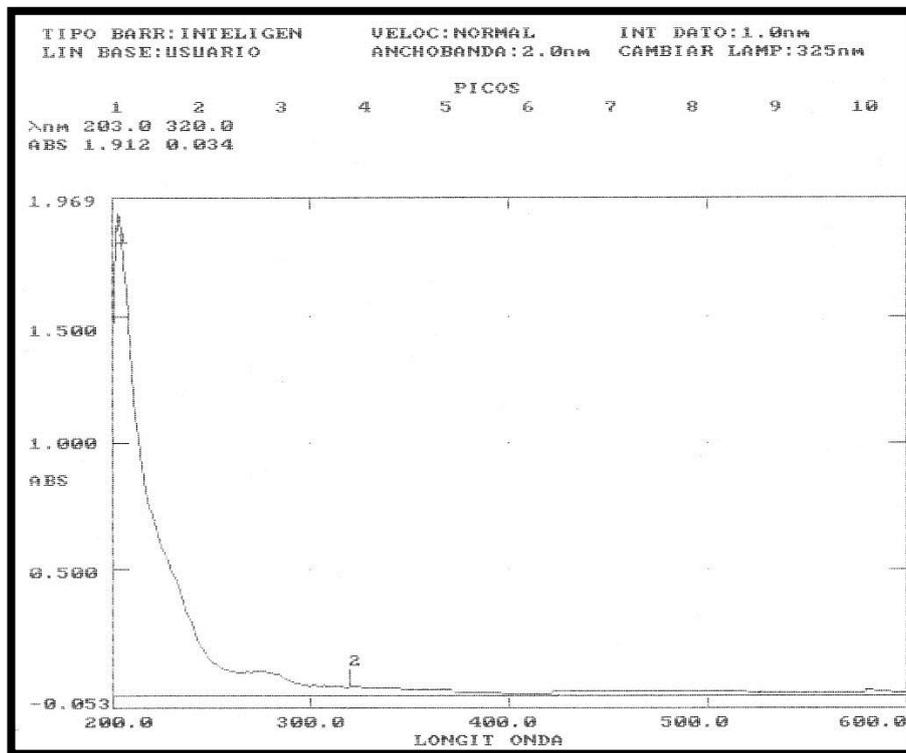
ANEXO No. 7 ESPECTROS ULTRAVIOLETA DE LAS FRACCIONES



FOTOGRAFÍA No. 15 ESPECTRO DE LA FRACCIÓN 8



FOTOGRAFÍA No. 16 ESPECTRO DE LA FRACCIÓN 10



FOTOGRAFÍA No. 17 ESPECTRO DE LA FRACCIÓN 15