

**ESTUDIO DE LA BIOACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE *Gardenia Jasminoides*
OBTENIDOS EMPLEANDO CO₂ SUPERCRÍTICO**

SHEYLA PAOLA BUENAÑOS LOZANO

Cod: 52.335.751

YOHANA LOPEZ CIFUENTES

Cod: 1.013.636.312

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar por el título de

“Químico”

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA - UNAD

ESCUELA DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA

PROGRAMA DE QUÍMICA

BOGOTA D.C

2019

**ESTUDIO DE LA BIOACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE *Gardenia Jasminoides*
OBTENIDOS EMPLEANDO CO₂ SUPERCRÍTICO**

SHEYLA PAOLA BUENAÑOS LOZANO

Cod: 52.335.751

YOHANA LOPEZ CIFUENTES

Cod: 1.013.636.312

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar por el título de

“Químico”

Director

DIEGO BALLESTEROS VIVAS

Licenciado en química

MSc. Ciencias-Química

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA - UNAD

ESCUELA DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA

PROGRAMA DE QUÍMICA

BOGOTA D.C

2019

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Bogotá D. C., _____ de _____ de 2019

Dedicatoria

A Dios por ser nuestro creador y darnos las capacidades y habilidades para terminar con éxito esta etapa de nuestra vida, a nuestros padres por habernos formado con valores como la responsabilidad, el compromiso, la perseverancia y la paciencia, fundamentales para avanzar en cada uno de los objetivos que nos hemos trazado, a nuestros esposos e hijos quienes han sacrificado de su tiempo para vernos alcanzar este sueño, que dejo de ser personal para convertirse en un sueño familiar, a nuestros maestros por su dedicación y por ayudarnos a crecer en este ámbito, aportando cada quien un granito de arena para llegar a convertirnos en las profesionales que somos.

Agradecimientos

Agradecemos a Dios por permitirnos desarrollar cada etapa de este proceso hasta llevarlo a buen término, por darnos la fortaleza y sabiduría para avanzar en cada semestre y finalmente convertirnos en profesionales.

Damos gracias a nuestros padres quienes con esfuerzo nos apoyaron tanto económicamente como con sus consejos, enseñanzas y motivación para lograr alcanzar este sueño.

Agradecemos a nuestros esposos por su apoyo incondicional, por su tiempo, paciencia y colaboración a lo largo de este proceso. A nuestros hijos, quienes son el motor de nuestras vidas.

De manera especial, agradecemos al profesor Diego Ballesteros por ser parte fundamental en nuestra formación profesional, como docente de diversas asignaturas y particularmente como el asesor y guía de este proyecto de investigación, más que realizar un acompañamiento se comprometió para llevarlo a feliz término.

De igual forma agradecemos a todos y cada uno de los profesores que hicieron parte de este proceso de formación, sus orientaciones y conocimientos contribuyeron a desarrollarnos como profesionales.

Tabla de contenido

Resumen.....	10
Introducción.....	11
1. Marco de Referencia.....	13
1.1. <i>Gardenia jasminoides</i>	13
1.2 Aceite esencial de <i>G. jaminoides</i>	16
1.3 Actividad Antioxidante	19
1.5 Actividad Antiplaquetaria	24
2. Justificación	26
3. Planteamiento del Problema.....	28
4. Objetivos	30
4.1. Objetivo General.....	30
4.2. Objetivos Específicos.....	30
5. Metodología.....	31
5.1. Diagrama del diseño de la investigación	31
5.2. Lugar de Ejecución	32
5.3. Materiales y Métodos	32
5.3.1. Recolección del material vegetal	32
5.3.2. Preparación de la muestra:.....	33
5.3.3. Extracción por Hidrodestilación	33
5.3.4. Extracción con CO ₂ supercrítico.....	35
5.3.5. Diseño experimental.....	35
5.3.6. Determinación de la actividad antioxidante de Extractos	36
A. Ensayo DPPH.....	36
B. Ensayo de FRAP.....	37
5.3.7. Actividad antiplaquetaria.....	38
6. Análisis de resultados	39
6.1. Rendimiento de extracción	39
6.2. Determinación de la actividad antioxidante.....	40
6.2.1. Método DPPH.....	40
6.2.2. Método FRAP.....	42

	7
6.3. Actividad antibacteriana	45
6.4. Actividad antiplaquetaria	47
Conclusiones.....	50
Recomendaciones.....	51
Referencias Bibliográficas	52

Lista de figuras

Figura 1. Diagrama de fases de una sustancia pura. Tomada de Brunner, 2005.....	17
Figura 2. Solubilidad de un analito en función de la temperatura y la presión. Tomada de Brunner, 2005	18
Figura 3. Esquema de un equipo SFE. 1. Cilindro CO ₂ ; 2. Bomba CO ₂ ; 3. Precalentador; 4. Celda de extracción; 5. Separador; 6. Controlador de temperatura; 7. Colector de extracto; a-f. Válvulas de paso; h- j. Manómetros. Tomada de (Castro-Vargas, Rodríguez-Varela, Ferreira, & Parada-Alfonso, 2010)...	19
Figura 4. Mecanismos HAT y SET. Tomado y adaptado de (Prior, Wu, & Schaich, 2005).	20
Figura 5. Reacción de decoloración del DPPH. Tomado y adaptado de (Alam, et al., 2012)	22
Figura 6. Reacción del método FRAP. Tomado y adaptado de (Prior et al., 2005).....	23
Figura 7. Mecanismo de agregación plaquetaria Tomada de (Cacheda, 2011)	24
Figura 8. Esquema general.....	31
Figura 9. Recolección y cultivo de flores de G. Jasminoides	32
Figura 10. Ubicación geográfica finca San Pablo, Fusagasugá	33
Figura 11. Equipo de extracción por hidrodestilación: (1) resistencia de calentamiento, (2) balón de fondo plano de dos bocas con desprendimiento de 500 mL, (3) termómetro, (4) condensador con enfriamiento y (5) embudo de recolección y separación del extracto	34
Figura 12. Diagrama esquemático y fotografía del equipo de extracción supercrítica con CO ₂ : (1) cilindro de CO ₂ ; (2) bomba Nova Werke AG CH-8307 Effretikon; (3) baño de precalentamiento; (4) válvula reguladora de presión (BPR), (5) celda de extracción; (6) una chaqueta de calentamiento y regulador de temperatura; (7) manómetro y (8) colector de extracto.	35
Figura 13. Diagrama de Pareto Rendimiento (g/100g)	39
Figura 14. Diagrama de Pareto DPPH (mg Eq/100g)	41
Figura 15. Diagrama Pareto FRAP (mg Eq/100g)	43
Figura 16. Coeficiente de correlación DPPH vs FRAP	44
Figura 17. Diagrama de Pareto Inibición E. Coli (mm).....	45
Figura 18. Diagrama de Pareto Inhibición (mm)	46
Figura 19. Diagrama de Pareto Tiempo de coagulación (s).....	48

Lista de tablas

Tabla 1. Actividad biológica de extractos y compuestos de <i>G. jasminoides</i>	14
Tabla 2. Algunos compuestos representativos de <i>G. jasminoides</i>	15
Tabla 3. Otras técnicas de extracción empleadas para la obtención de aceite esencial de <i>G. jasminoides</i> . Tomada y adaptada de Xiao et al., 2017	16
Tabla 4.. Métodos analíticos para el análisis de la actividad antioxidante. Tomado y adaptado de (Pisoschi & Negulescu, 2012).	21
Tabla 5. Inhibidores plaquetarios Tomada de (Palomo, et al., 2008)	25
Tabla 6. Características geográficas de la muestra	32
Tabla 7. Condiciones de presión y temperatura utilizadas en la extracción con CO ₂ supercrítico	36
Tabla 8. Resultados experimentales.....	39
Tabla 9. ANOVA	49

Resumen

En este trabajo se evaluó el proceso de extracción de aceite de flores de *G. jasminoides* procedentes de la finca San Pablo, ubicada en Fusagasugá Cundinamarca. El aceite se obtuvo mediante la tecnología de extracción con fluidos supercríticos utilizando CO₂ como solvente. Se evaluaron diferentes condiciones de presión y temperatura, utilizando un diseño factorial 2², sobre el rendimiento de extracción, la actividad antioxidante (DPPH y FRAP), la actividad antibacteriana por difusión en agar nutritivo y la actividad antiplaquetaria utilizando como patrón heparina. Las mejores condiciones de extracción de aceite de *G. Jasminoides* fueron 325 bar y 65°C, en las cuales se obtuvo un rendimiento de 8,61% en aceite. La actividad antioxidante se evidenció con un valor de 2,8 mg equivalente a Trolox/100g de muestra seca por el método DPPH, para el método FRAP se obtuvo un valor de 3,2 mg equivalente a Trolox/100g de muestra seca. La actividad antibacteriana reportó halos de inhibición de 4,5 mm para la bacteria *E. Coli* y 6,5 mm para la bacteria *S. aureus* y en la actividad antiplaquetaria la muestra de sangre no mostró agregamiento plaquetario y se coagulo después de 180 segundos.

Palabras claves: (Antioxidante, gardenia, aceite esencial, actividad antibacteriana, dióxido de carbono, DPPH, FRAP, fluidos supercríticos)

Introducción

La gardenia (*Gardenia jasminoides*) es una especie de hoja perenne perteneciente a la familia Rubiaceae y originaria de Asia Oriental, particularmente de China, la cual ha sido usada principalmente en la medicina tradicional y también como árbol ornamental (Yin & Liu, 2018).

La importancia del aceite esencial de gardenia radica en sus propiedades relajantes, antiinflamatorias, sedantes y altamente antioxidante capaz de retrasar el crecimiento de los radicales libres que son causados por las especies ROS. Varios componentes químicos de *G. Jasminoides* han sido aislados y caracterizados, incluyendo iridoides, glucósidos iridoides, triterpenoides, ácidos orgánicos y compuestos volátiles, los cuales le confieren propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antibacterianas y antitrombóticas.

Sus antioxidantes contribuyen a evitar el envejecimiento celular inhibiendo el daño producido por los radicales libres, por lo tanto, al evidenciar una alta actividad antioxidante en este extracto es posible utilizarlo en la industria alimenticia y así enriquecer algunos alimentos y hacerlos útiles en este sentido para diversos seres vivos.

La determinación de sus actividades antibacteriana y antiplaquetaria es fundamental, ya que se podría utilizar en la industria farmacéutica específicamente como principio activo en la fabricación de antibióticos y antiagregantes plaquetarios.

Adicionalmente en la extracción del aceite esencial es muy frecuente el uso de solventes orgánicos los cuales resultan tóxicos para el ambiente, razón por la cual el proyecto se enfoca en obtener aceite esencial de *G. Jasminoides* a partir de la utilización de un solvente inocuo y de bajo costo como lo es el CO₂ en estado supercrítico.

La obtención del aceite de esta forma ambientalmente amigable y la determinación de sus

bioactividades podrían contribuir a optimizar el uso del aceite de gardenia en beneficio de la sociedad.

1. Marco de Referencia

En este apartado se contextualizan los conceptos más relevantes para el desarrollo de este trabajo, tales como *Gardenia jasminoides*, sus propiedades biológicas y químicas, las características de su aceite esencial, las técnicas de extracción de éste y las propiedades bioactivas de interés para esta propuesta: la actividad antioxidante, antibacteriana y antiplaquetaria.

1.1. *Gardenia jasminoides*

Gardenia jasminoides o gardenia es una especie de hoja perenne perteneciente a la familia Rubiaceae y es originaria de Asia Oriental. *G. jasminoides* ha sido usada ampliamente en la medicina tradicional China por sus propiedades biológicas y también como árbol ornamental (J. Liu & Yin, 2015). En este sentido, se han documentado diferentes actividades farmacológicas de extractos y compuestos aislados de diferentes órganos de *G. jasminoides* (Yin & Liu, 2018), tales como: antioxidante, hepatoprotectora, antiinflamatoria, neuroprotectora, antidiabética, bactericida, antitumoral, vasoprotectora, entre otras. En la tabla 1 se resumen algunas de las actividades biológicas mencionadas. En dicha tabla se relaciona la bioactividad estudiada con los extractos y/o compuestos identificados, así como los órganos asociados a *G. jasmonoides*. Como se puede observar, la amplia gama de bioactividades estudiadas dan cuenta del gran potencial de esta especie como fuente de compuestos de interés farmacéutico. En la tabla 2 se presentan algunos compuestos representativos presentes en diferentes órganos de *G. jasminoides*. Como se puede apreciar, se trata de metabolitos tipo terpeno y glucósidos de iridoideas. Los terpenos de *G. jasminoides* han sido identificados en los aceites esenciales de esta especie y han sido

relacionados con el aroma de la misma así como con diversas actividades biológicas (Tabla 1) (Xiao, Li, Wang, & Ho, 2017). Por otra parte, los iridoides son otra familia representativa de metabolitos que se caracterizan por presentar un esqueleto base de ciclopenta[c]pirano abierto (Rios, 2016). En *G. jasminoides* se ha establecido la presencia de iridoides sustituidos con glucosa (J. Liu & Yin, 2015).

Bioactividad	Extracto/Compuesto	Órgano	Modelo/Método	Referencia
Antioxidante	Crocina	Fruto	<i>In vitro</i> /Tiocianato férrico	(Chen et al., 2008b)
	Derivados del ácido quínico	Fruto	<i>In vitro</i> /DPPH	(Kim et al., 2006)
	Glicoproteínas	Fruto	<i>In vitro</i> /DPPH; peroxidación lipídica, anión superóxido y radicales hidroxilo.	(Lee et al., 2006b)
Antiviral	Extracto obtenido por decocción acuosa	Raíces	<i>In vitro</i> /Virus sicial respitatorio	(Ma et al, 2002)
	Extracto hidroalcohólico obtenido por maceración	Fruto	<i>In vivo</i> /Influenzavirus	(Wang et al, 2006)
	Iridoides glicosidados	Fruto	<i>In vitro</i> /Virus H1N1	(Li et al., 2013)
Anticáncer	Penta-acetil-genipósido	Fruto	<i>In vivo</i> /Glioma C6	(Chang et al., 2004)
	Fracción butanólica	Fruto	<i>In vivo</i> /Corioalantoidea de embrión de pollo	(Koo et al., 2004a)
	Fracción diclorometanólica	Fruto	<i>In vitro</i> /Línea KB oral	(Lim et al., 2010)
Antiinflamatoria	Genipina, genipósido	Fruto	<i>In vivo</i> /Edema planar murino	(Koo et al., 2006)
Antiplaquetaria	Genipina, genipósido	Fruto	<i>In vitro</i> /Plaquetas murinas	(Suzuki et al. 2001)
	Extracto acuso	Fruto	<i>In vitro</i> /Trompo murino	(Zhang et al., 2013a)
Antimicrobiana	Iridoide 1	Fruto	<i>In vitro</i> /Candida alibans; Escherichia coli; Pseudomonas aeruginosa; Staphylococcus aureus	(Ragasa et al., 2007)
	Genipina, genipósido	Hojas	<i>In vitro</i> /Fusarium oxysporum; Corynespora cassicola	(Lelono et al., 2009)

Tabla 1. Actividad biológica de extractos y compuestos de *G. jasminoides*

Dadas las propiedades bioactivas señaladas y los compuestos químicos relacionados con las mismas, *G. jasminoides* es aceptado por la legislación china como alimento medicinal homólogo (*Medicine Food Homology*) y también es utilizado como colorante para fideos y aditivo en confitería y derivados de avena en países orientales (Han, Wen, Zhou, & Fan, 2015).

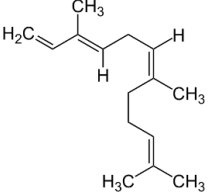
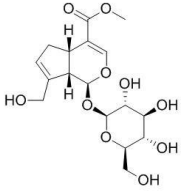
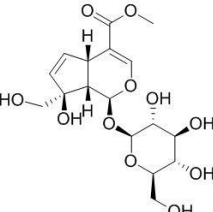
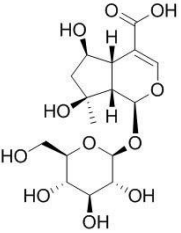
Órgano	Clase de metabolito	Compuestos representativos	Estructura
Flor	Terpenos Sesquiterpenos	Acetato de bencilo Hidroxicitronelal Eugenol, α -Farneseno Guaiol (Z)-3-hexenil tiglato Bulnesol Benzoato de cis-3-hexenilo <i>trans</i> - β -ocimeno α -terpineol	 α -Farneseno
Fruto	Terpenos Glucosidos iridoides	Genipósido Genipin-1- β -D-gentiobiósido Shanzhisido 5 β -hydroxigeniposido 10-acetilgenipósido Ácido picrocrocínico	 Genipósido
Hojas	Terpenos Glucósidos de iridoides	Gardenósido Genipósido 7 β , 8 β -epoxy-8 α -dihidrogenipósido 8-epiapodantherósido Galiósido 8-O-metilmonotropeina Cerbinal.	 Gardenósido
Otros órganos	Terpenos Glucósidos de iridoides	Shanzhiside Escandósido Shanzhisido Gentiobiósido Tarenósido Ácido geniposídico D-manitol Estigmasterol Ácido betulínico Ácido oleanólico Ácido sirínico	 Shanzhisido

Tabla 2. Algunos compuestos representativos de *G. jasminoides*

Otro producto derivado de *G. jasminoides* es el aceite esencial, el cual posee interés cosmético, farmacéutico y alimentario. Sus generalidades se presentan a continuación.

1.2 Aceite esencial de *G. jasmínoides*

El aceite esencial de *G. jasmínoides* es obtenido generalmente a partir de sus flores y fruto (Lim, 2014) y sus componentes volátiles son ácidos alifáticos, cetonas, aldehídos, ésteres, alcoholes, derivados aromáticos y productos de la transformación de los iridoides (Xiao et al., 2017). La técnica de extracción más empleada para la obtención del aceite esencial es la hidrodestilación empleando aparatos tipo-Clevenger, con la cual se han obtenido composiciones tales como: α -farneseno (28.41 %), guaiol (5.89 %), (*Z*)-3-hexenil-tiglato (5.47 %), bulnesol (5.03 %), *cis*-3-hexenil benzoato (4.21 %), linalool (22.05 %), *trans*- β -ocimeno (10.59 %), α -terpineol (9.03 %), metil tiglato (2.66 %), tetracosano (5.64 %), germacreno D (0.03 %), germacreno B (0.08 %), β -cariofilleno (0.05 %), calareno (0.14 %), nerol (0.4 %), α -thujene (0.03 %), *cis*-3-hexenol (0.22 %), mirceno (0.02 %), α -pineno (0.02 %), β -pineno (0.02 %), entre otros (Obuzor & Nwaokolo, 2010). El aceite esencial de *G. jasmínoides* también ha sido obtenido mediante otras técnicas como se resume en la tabla 3.

Técnica de extracción	Parámetros de extracción	Resultados (%)
Extracción con fluidos supercríticos	Presión: 36.8 MPa	Ácido linoléico 44
	Temperatura: 65 °C	Ácido palmítico 26.4
	Flujo sc-CO ₂ : 15 Kg/h	Ácido oléico 24.6
	Presión: 29,8 MPa	16 componentes mayoritarios identificados.
Extracción con fluidos supercríticos	Temperatura: 49,9 °C	
	Tiempo: 93,8 min	
	Presión: 30 MPa	Ácido linoléico 44.3
	Temperatura: 55 °C	Ácido oléico 24.9
Extracción con fluidos subcríticos	Flujo sc-CO ₂ : 15 Kg/h	Ácido palmítico 24.8
		Ácido esteárico 2.5
		Ácido linoléico 1.3
Extracción asistida por microondas	Presión: 12-25 MPa	Rendimiento aceite 12
	Temperatura: 45 °C	
Extracción con fluidos subcríticos	<i>n</i> -Butano	Ácidos grasos 77.6
Extracción asistida por microondas	28 kHz-100 W	Rendimiento aceite 16.5

Tabla 3. Otras técnicas de extracción empleadas para la obtención de aceite esencial de *G. jasmínoides*. Tomada y adaptada de Xiao et al., 2017

Como se puede observar en la tabla 3, se han aplicado diferentes técnicas de extracción para la obtención de aceites esenciales a partir de *G. jasminoides*. Cabe resaltar que la técnica de extracción y el disolvente empleado inciden significativamente sobre la composición del aceite y el porcentaje de recuperación del mismo.

Dado el interés de la técnica de extracción con fluidos supercríticos para este trabajo, a continuación, se realiza una descripción de los conceptos fundamentales relacionados con la técnica.

1.3 Extracción con fluidos supercríticos

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) es una técnica de amplia difusión en el campo de los productos naturales gracias a las ventajas que presenta. SFE se basa en el uso de una sustancia (disolvente) por encima de sus valores críticos de temperatura (T_c) y presión (p_c), en los cuales no hay variaciones de estado (Brunner, 2005), como se observa en la figura 1.

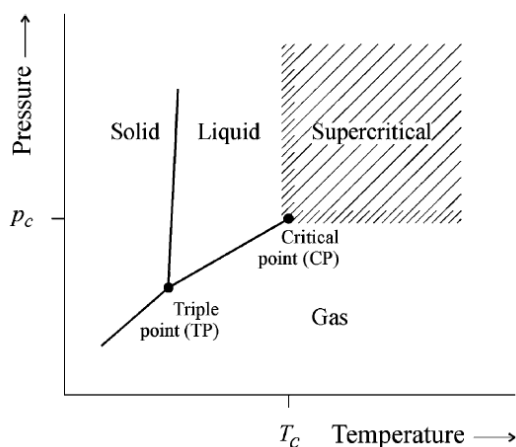


Figura 1. Diagrama de fases de una sustancia pura. Tomada de Brunner, 2005

En condiciones supercríticas la solubilidad de un analito de baja volatilidad en un fluido subcrítico ($T < T_c$) o supercrítico ($T > T_c$) es función de la temperatura y de la presión del

proceso (Brunner, 2005). En la figura 2 se observa este fenómeno y la dependencia de la densidad del fluido (líneas punteadas) en función de la presión (líneas segmentadas).

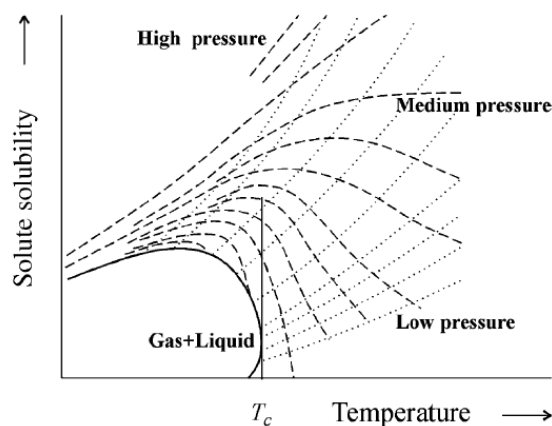


Figura 2. Solubilidad de un analito en función de la temperatura y la presión. Tomada de Brunner, 2005

Dado este fenómeno, dos de las variables más importantes que afectan un proceso de extracción con fluidos supercríticos son la temperatura y la presión, por lo que son factores a optimizar.

Uno de las sustancias más empleadas en SFE es el dióxido de carbono porque presenta condiciones supercríticas bastante asequibles en términos energéticos ($T_c = 31.2\text{ °C}$ y $p_c = 71.3\text{ MPa}$), es químicamente inerte, reciclable, gaseoso a condiciones normales, no es inflamable, ni tóxico (Singh, Dhanani, & Kumar, 2017).

La instrumentación básica de un equipo SFE se ilustra en la figura 3, la cual consiste de un cilindro que provee el dióxido de carbono, una bomba que lleva el fluido a condiciones de presión, un precalentador que lleva el fluido a condiciones de temperatura, una celda de extracción en el que se coloca la muestra, un separador en el cual el dióxido de carbono pierde las condiciones supercríticas y se separa de la muestra como gas y un colector de extracto.

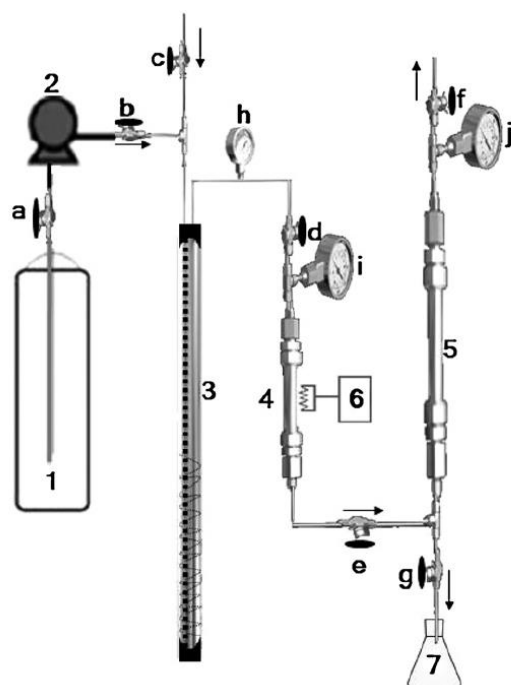


Figura 3. Esquema de un equipo SFE. 1. Cilindro CO₂; 2. Bomba CO₂; 3. Precalentador; 4. Celda de extracción; 5. Separador; 6. Controlador de temperatura; 7. Colector de extracto; a-f. Válvulas de paso; h-j. Manómetros. Tomada de (Castro-Vargas, Rodríguez-Varela, Ferreira, & Parada-Alfonso, 2010)

SFE también ha sido empleado para la obtención de aromas y aceites esenciales dada la gran eficiencia de la técnica para extraer compuestos volátiles y termolábiles, asegurando el potencial bioactivo de los mismos (Capuzzo, Maffei, & Occhipinti, 2013).

Dado que en este trabajo se estudia el potencial antioxidante, antibacterial y antiplaquetario del aceite de *G. jasminoides* empleando SFE, a continuación se definen las generalidades de estas bioactividades.

1.3 Actividad Antioxidante

Los antioxidantes son sustancias que pueden impedir, retrasar o inhibir el proceso de oxidación que ocurre por influencia del oxígeno atmosférico o por las especies reactivas de oxígeno: O₂^{•-}, O₂, HO[•], NO[•], ONOO⁻, HOCl, RO(O)[•], LO(O)[•]. Los antioxidantes son usados para

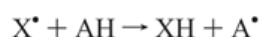
estabilizar productos alimenticios, cosméticos, farmacéuticos e incluso derivados petroquímicos.

Los antioxidantes están implicados en los mecanismos de defensa del organismo contra patologías asociadas a los radicales libres, de ahí el interés generalizado por el estudio y búsqueda de sustancias con actividad antioxidante. Si bien existen antioxidantes endógenos de naturaleza enzimática (p. e: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) y no enzimática (p. e: ácido úrico, bilirrubina, albúmina, metaloproteínas), que protegen al organismo frente a los radicales libres, también es posible encontrar antioxidante exógenos que coadyuvan con dicho rol, tales como vitaminas (p. e: E, C, D, K), carotenoides (p. e: β -caroteno), minerales (p. e: Cu, Mn, Zn, Fe, Se), flavonoles (p. e: quercetina, rutina), terpenos (p. e: limoneno, terpineno), entre otros.

En los últimos años se han desarrollado métodos químicos (*in vitro*) para aproximarse al potencial antioxidante de una sustancia, algunos de los cuales están basados en sistemas químicos de transferencia de átomos de hidrogeno (HAT) y de electrones (SET). Los mecanismos de HAT y SET se ilustran en la Figura 4.

Transferencia de átomos de hidrógeno

HAT



Transferencia de sólo un electrón

SET

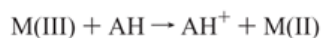
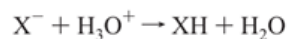
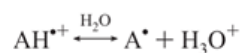
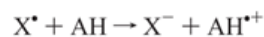


Figura 4. Mecanismos HAT y SET. Tomado y adaptado de (Prior, Wu, & Schaich, 2005).

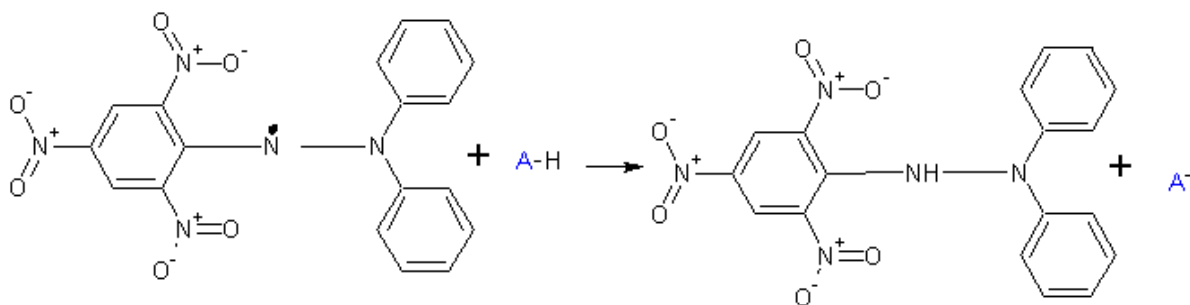
A través de un método HAT se mide la capacidad de un antioxidante de atrapar radicales libres (X^*) mediante la donación de un átomo de hidrógeno (donde AH es cualquier donador de H). Mientras que en un sistema SET se estudia la capacidad de un antioxidante para transferir un electrón y reducir cualquier compuesto, incluidos metales (M), carbonilos y radicales. Algunas las técnicas que se fundamentan en mecanismos HAT y SET se resumen en la Tabla 4.

Ensayo de capacidad antioxidante	Principio del método	Determinación del producto final
	Espectrometría	
DPPH	Reacción antioxidante con un radical orgánico	Colorimetría
ABTS	Reacción antioxidante con un radical catiónico orgánico	Colorimetría
FRAP	Reacción antioxidante con un complejo de Fe (III).	Colorimetría
PFRAP	Reducción de ferricianuro de potasio por antioxidantes y posterior reacción de ferrocianuro de potasio con Fe^{3+}	Colorimetría
CUPRAC	Reducción de Cu (II) a Cu (I) por antioxidantes.	Colorimetría
ORAC	Reacción antioxidante con radicales peroxilo, inducida por APPH (2,2 - azobis-2-amidino-propano)	Pérdida de fluorescencia de la fluoresceína.
HORAC	Capacidad antioxidante para apagar los radicales OH, generados por un sistema tipo Fenton basado en Co (II).	Pérdida de fluorescencia de la fluoresceína.
TRAP	Capacidad antioxidante para eliminar los radicales derivados del luminol, generados a partir de la descomposición APPH	Extinción de quimioluminiscencia
Fluorimetría	Emisión de luz por una sustancia que ha absorbido luz u otra radiación electromagnética de diferente longitud de onda	Registro de espectros de excitación / emisión de fluorescencia.

Tabla 4. Métodos analíticos para el análisis de la actividad antioxidante. Tomado y adaptado de (Pisoschi & Negulescu, 2012).

Uno de los métodos más usados para estudiar la actividad antioxidante de compuestos y extractos es el método colorimétrico del DPPH. El DPPH * (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) es

un radical libre estable debido a la deslocalización de la esfera electrónica que envuelve a la molécula, por lo que no dimeriza como ocurre con la mayoría de los radicales. La deslocalización electrónica del DPPH[•] causa su color púrpura característico con una banda de absorción máxima a 520 nm. Cuando el DPPH[•] reacciona con un átomo de hidrógeno de una fuente donora (sustancia o extracto antioxidante), el radical es reducido a su forma molecular con la consecuente desaparición del color púrpura (Ver Figura 5). De esta manera la disminución en la absorbancia depende linealmente de la concentración del antioxidante. El Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) es usado como antioxidante de referencia en este método.



1,1 - difenil-2-picrilhidrazilo (radical libre)

Púrpura

1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (no radical)

Amarillo

Figura 5. Reacción de decoloración del DPPH. Tomado y adaptado de (Alam, et al., 2012)

Otro método de gran importancia para la evaluación de la actividad antioxidante de compuestos y extractos es el método del potencial reductor férrico-FRAP. FRAP se basa en el potencial que tiene una sustancia o un extracto para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} , para lo cual se emplea el complejo ion férrico-TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) (Ver Figura 6). La unión entre el ligando y el ion ferroso genera un color azul marino intenso. La absorbancia se puede medir para probar la cantidad de hierro reducida y se puede correlacionar con el potencial antioxidante de la

sustancia o extracto evaluado. El Trolox o el ácido ascórbico son empleados como referencias.

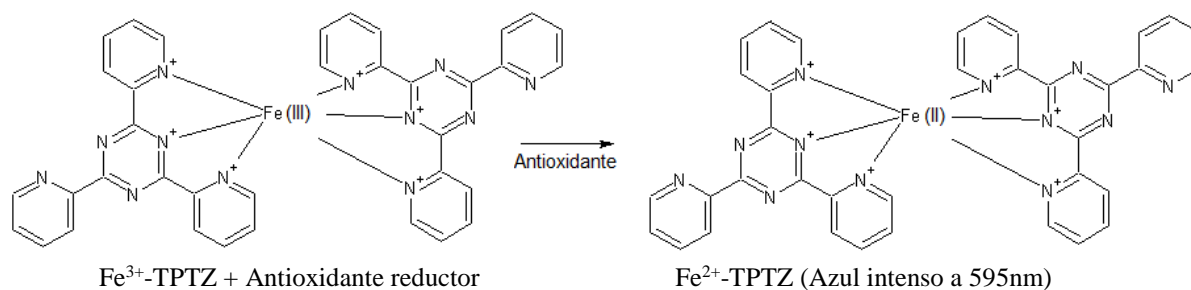


Figura 6. Reacción del método FRAP. Tomado y adaptado de (Prior et al., 2005)

Tanto el método DPPH como FRAP son habitualmente usados para evaluar sustancias de mediana y baja polaridad como las que se pueden encontrar aceites de origen vegetal.

1.4. Actividad Antibacteriana

La actividad antibacteriana de un compuesto o extracto está relacionada con la capacidad de este para inhibir el crecimiento de una población bacteriana bien sea por un efecto bacteriostático o bactericida (Quesada, 2013). La actividad antibacteriana se evalúa sometiendo a una población bacteriana que crece en agar a una sustancia o extracto de interés. *S. aureus* y *E. coli* son los organismos de prueba más utilizados para realizar actividades contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, respectivamente (Cervantes García & García González). La susceptibilidad de la bacteria puesta en prueba está directamente relacionada con el tamaño de la zona de inhibición en milímetros. Se considera que la bacteria es susceptible cuando el diámetro de la zona es mayor a 30-35 mm; intermedios cuando el diámetro de la zona varía entre 20 a 30 mm y resistentes cuando la zona es menor a 15 y 20 mm. (Herrera, 1999). *S. aureus* es considerado un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el humano y en los animales. *S. aureus* es una especie virulenta, responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van

desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves que amenazan con la vida. El impacto de las cepas de *S. aureus* sobre la salud es la resistencia que puede presentar a múltiples antibióticos (Cervantes-García, García-González, & Salazar-Schettino, 2014). Por otra parte *E. coli* es responsable de toxoinfecciones alimentarias generadas a partir de productos cárnicos contaminados. Existen numerosas cepas de *E. Coli* que se pueden encontrar en patología humana y que presentan una virulencia marcada. Son conocidas como agentes responsables de gastroenteritis infantil, especialmente en países en vías de desarrollo, causando la muerte de cerca de un millón de niños cada año debido a deshidratación y a otras complicaciones (Canet, 2016).

1.5 Actividad Antiplaquetaria

Los antiplaquetarios son un grupo de sustancias que tienen como función evitar que las plaquetas se agrupen y formen coágulos sanguíneos (figura 7). Los coágulos se pueden formar cuando se presentan lesiones bien sea externa por ejemplo en el caso de una cortadura o interna que es cuando se presenta dentro de los vasos sanguíneos, en este último caso es cuando se dan los infartos vasculares (Perez, 2008).

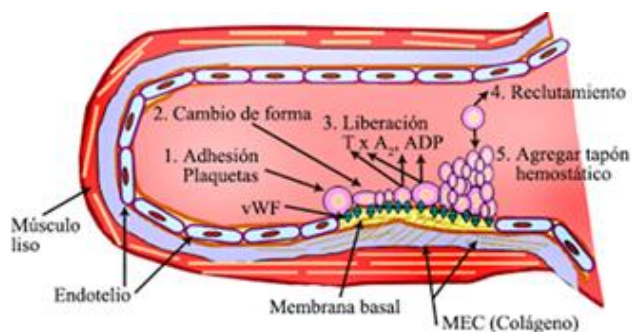


Figura 7. Mecanismo de agregación plaquetaria Tomada de (Cacheda, 2011)

A continuación, se presentan los fármacos más conocidos que presentan inhibición plaquetaria y su mecanismo de acción, siendo la aspirina el más comúnmente usado a nivel mundial.

Fármaco	Mecanismo de acción
Aspirina	Inhibición irreversible de la ciclooxigenasa, lo que provoca la disminución del TxA ₂ , y disminución en la formación de prostaciclina en el endotelio vascular que es un importante inhibidor de la agregación plaquetaria.
Trifusal	Variante de la aspirina.
Dipiridamol	Bloquea la fosfodiesterasa plaquetaria, se produce un aumento del AMPc que bloquea al calcio que interviene en la agregación.
Ticlopidina	Inhiben los receptores de ADP de plaquetas y por tanto bloquean la activación plaquetaria inducida por el ADP.
Abciximal, etifibatide y tirofiban	Antiagregantes que basan su acción en el bloqueo de la GPIIb / IIIa.

Tabla 5. Inhibidores plaquetarios Tomada de (Palomo, et al., 2008)

Para determinar la actividad antiplaquetaria se emplea una aproximación inicial que consiste en exponer una muestra de sangre a una sustancia o extracto de interés, para observar el tiempo de coagulación. Esta coagulación es comparada la de una muestra de sangre sin tratar y con otra muestra tratada con heparina (Quesada, et al., 2013).

2. Justificación

En la extracción de aceites esenciales es muy frecuente el uso de metodologías que resultan costosas y de bajo rendimiento, razón por la cual este proyecto se enfoca en obtener aceite esencial de *G. Jasminoides* a partir de la utilización de un solvente inocuo y de bajo costo como lo es el CO₂ en estado supercrítico.

También se pretende caracterizar las bioactividades de este extracto y compararlas con el obtenido de manera tradicional. Entre las bioactividades a analizar tenemos en primer lugar la actividad antioxidante de la cual se han desarrollado estudios y se ha comprobado que es alta en el extracto de esta planta, los antioxidantes contribuyen a evitar el envejecimiento celular inhibiendo el daño producido por los radicales libres, por lo tanto al evidenciar una alta actividad antioxidante en este extracto es posible utilizarlo en la industria alimenticia y así enriquecer algunos alimentos y hacerlos útiles en este sentido para diversos seres vivos.

La *Eschericia Coli* y el *Estafilococo Aureus* son bacterias que generan enfermedades importantes en el ser humano, la determinación de la actividad antibacteriana en estas dos especies es fundamental, ya que se podría utilizar en la industria farmacéutica específicamente como principio activo en la fabricación de antibióticos.

En cuanto a la actividad antiplaquetaria se pretende establecer si el extracto de *Gardenia* tiene la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria causante de problemas como la trombosis, los derrames cerebrales, entre otros a través de una prueba comparativa con otros inhibidores elaborados por la industria farmacéutica.

La obtención del aceite de una forma ambientalmente amigable y la determinación de estas bioactividades podrían contribuir a optimizar el uso del mismo en beneficio de la sociedad,

buscando aplicaciones industriales del aceite esencial fomentando el incremento de la producción de gardenias en el país.

Este proyecto permite al estudiante aplicar técnicas diferentes e innovadoras a nivel de extracción e inclusive proyectarse hacia la creación de empresa a partir de una materia prima que todavía tiene mucho campo de acción en el país.

3. Planteamiento del Problema

La extracción del aceite esencial de *G. Jasminoides* con solventes orgánicos representa un problema ambiental ya que dichos solventes son altamente tóxicos, costosos y de difícil recuperación. El uso de solventes libera a la atmósfera compuestos orgánicos volátiles (COV's), que provocan problemas importantes en el entorno natural, como la degradación y destrucción de la capa de ozono. El carácter volátil de los solventes hace que éstos se evaporen rápidamente en el aire, alcanzando concentraciones importantes en espacios confinados. Los riesgos mayores para el ser humano se producen por la absorción de éstos a través de la piel y por inhalación. Por ello, algunos solventes están asociados a la irritación ocular, molestias nasales y de garganta, jaquecas, reacciones cutáneas y alérgicas, disnea, náuseas, fatiga, mareo, aborto espontáneo, malformaciones congénitas, lesiones cerebrales, interferencias en la capacidad reproductiva, o al cáncer infantil.

Además, la mayoría de los solventes son inflamables y explosivos, lo que representa otro tipo de riesgo diferente asociado a estas sustancias. Algunos no arden necesariamente con facilidad, pero sí tienden a descomponerse a altas temperaturas dando lugar a otros compuestos altamente tóxicos. (Sanchez Montero & Andrés).

Teniendo en cuenta los riesgos mencionados anteriormente queda patente la necesidad de minimizar la exposición humana a estas sustancias, por lo que el estudio de diferentes sistemas de reemplazo de los mismos con medios de reacción alternativos como los fluidos supercríticos representa una posibilidad de reducir ampliamente el perjuicio que estos solventes pueden ocasionar obteniendo los mismos productos con un mínimo de daño tanto para las personas como para el ambiente.

El fluido supercrítico más empleado para las extracciones es el CO₂, debido a sus múltiples propiedades ya que es un gas totalmente inocuo que en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico se convierte en un solvente muy potente, sirviendo como elemento separador eficaz totalmente limpio. Sus principales ventajas radican en la fácil separación de sustancias; las suaves temperaturas en el proceso que evita el daño al producto; al ser un compuesto no inflamable, no corrosivo, no tóxico, no cancerígeno; su capacidad selectiva y la no generación de residuos, constituye una opción mucho más limpia y segura que los procesos convencionales, que permite preservar además los principios activos y características propias de las sustancias.

El uso de esta metodología permite obtener productos de origen natural como los aceites esenciales, conservando sus principios activos los cuales se evidencian evaluando las bioactividades del mismo. Por tal razón, a través de este proyecto de investigación se pretende determinar la influencia de la presión y la temperatura en el rendimiento y las bioactividades (actividad antioxidante, antibacteriana y antiplaquetaria) del aceite esencial de *G. Jasminoides* mediante la extracción con CO₂ supercrítico comparando los resultados con un aceite esencial obtenido por métodos convencionales (hidrodestilación). Estas bioactividades resultan de gran importancia a nivel industrial y/o farmacéutico.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Estudiar la bioactividad de extractos de *G. Jasminoides* obtenidos con CO₂ supercrítico.

4.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto de la presión y la temperatura sobre el aceite esencial de *G. Jasminoides* en la extracción con CO₂ supercrítico.
2. Determinar la actividad antioxidante del extracto de *G. Jasminoides* mediante los métodos DPPH y FRAP.
3. Analizar la actividad antibacteriana del extracto de *G. Jasminoides* en *E. Aureus* y *E. Coli*.
4. Establecer la potencial actividad antiplaquetaria del extracto de *G. Jasminoides*.

5. Metodología

La propuesta investigativa se desarrolló en cinco etapas a saber: (1) Preparación de la muestra (recolección, limpieza, secado, molienda y almacenamiento); (2) Obtención de extractos empleando fluidos supercríticos (EFS) variando la presión y la temperatura e hidrodestilación como técnica de comparación; evaluación de la (3) actividad antioxidante, (4) actividad antibacteriana y (5) actividad antiplaquetaria.

La metodología se resume en el siguiente diagrama:

5.1. Diagrama del diseño de la investigación

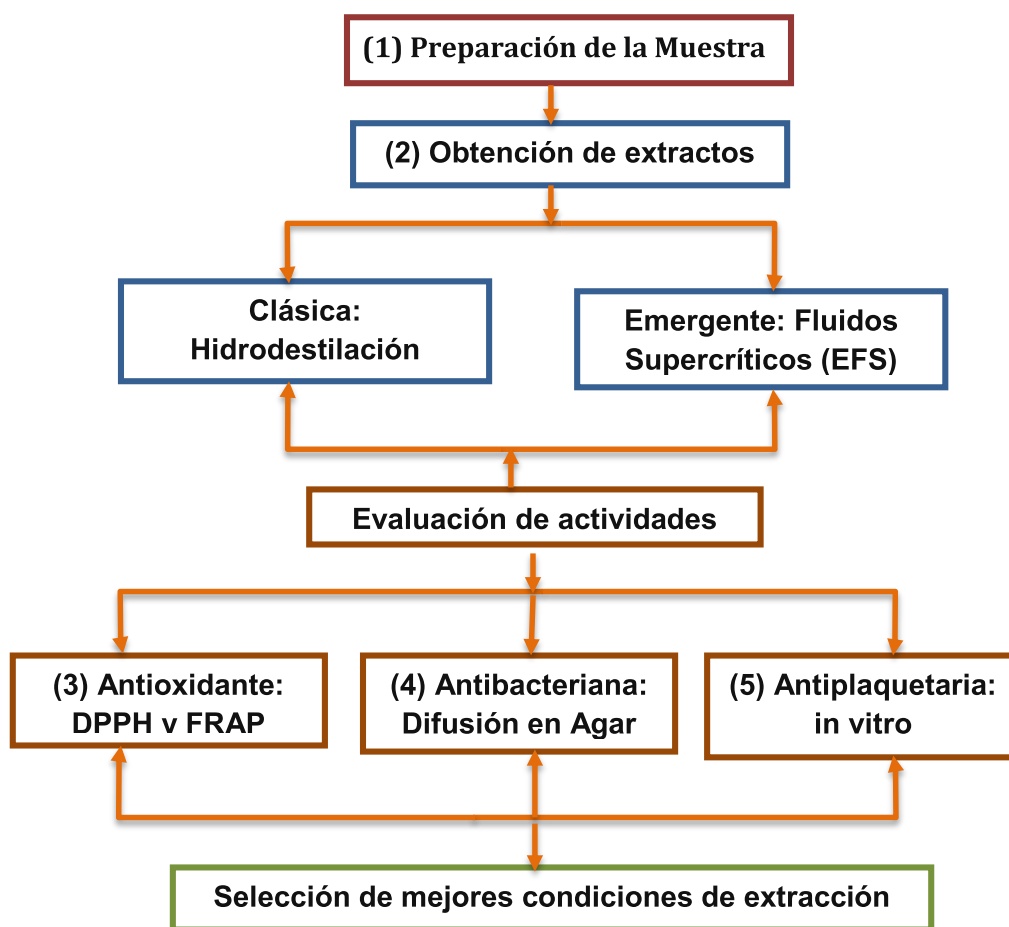


Figura 8. Esquema general

5.2. Lugar de Ejecución

Las actividades experimentales se realizaron en la Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. Facultad de Química. Laboratorio de Fluidos Presurizados y en la Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Sede Nacional José Celestino Mutis, Bogotá, Colombia. Laboratorio Multipropósito y Laboratorio de Microbiología.

5.3. Materiales y Métodos

5.3.1. Recolección del material vegetal



Figura 9. Recolección y cultivo de flores de *G. Jasminoides*

Las flores de *G. jasminoides* se recolectaron en estado de madurez óptimo con los pétalos completamente abiertos y en el momento más alto de sol (12:00 m) para disminuir humedad por rocío de manera aleatoria, septiembre de 2017, en el cultivo de la finca San Pablo, ubicada en municipio de Fusagasugá (Figura 9), departamento de Cundinamarca, cuyas características geográficas y ubicación se describen en la tabla 6 y la figura 10 respectivamente:

Característica	Descripción
Ubicación	4°22'20.4"N 74°22'30.6"W (Figura 7)
Área	3551 m ²
Altitud	1649 msnm
Temperatura promedio	19.4 °C
Humedad relativa	56%
Característica del suelo	Franco arcilloso, ácido pH=4,99.

Tabla 6. Características geográficas de la muestra

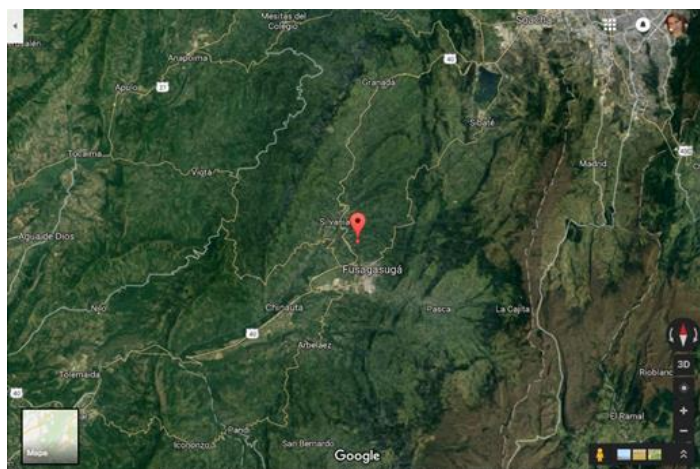


Figura 10. Ubicación geográfica finca San Pablo, Fusagasugá

5.3.2. Preparación de la muestra:

La muestra recolectada (~10 kg) se procesó *in situ* (instalaciones del cultivo), separando los pétalos de la yema (cogollo o “chupón”) y descartando material enfermo, manchado o sucio. Posteriormente, los pétalos son divididos en dos muestras, una de las cuales es almacenada en bolsas herméticas en refrigeración para su uso en fresco, mientras que la otra es extendida sobre una superficie limpia a la sombra para proceder a su secado a temperatura ambiente por 60 días. Posteriormente, los pétalos secos son troceados manualmente y molidos con hielo seco, a fin de reducir el tamaño de partícula. La muestra seca y molida es almacenada en bolsas herméticas y almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso (Banchero, et al., 2008).

5.3.3. Extracción por Hidrodestilación

La extracción por hidrodestilación se desarrolló utilizando el montaje descrito en la Figura 11.

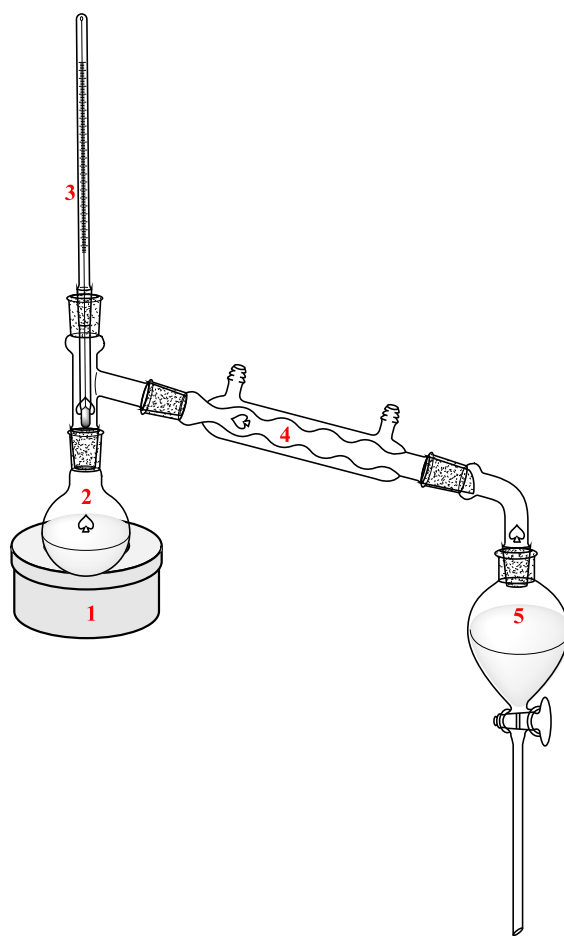


Figura 11. Equipo de extracción por hidrodestilación: (1) resistencia de calentamiento, (2) balón de fondo plano de dos bocas con desprendimiento de 500 mL, (3) termómetro, (4) condensador con enfriamiento y (5) embudo de recolección y separación del extracto

En el proceso de extracción por hidrodestilación se emplearon ~100 g de los pétalos de *G. jasminoides* (muestra almacenada en fresco), los cuales fueron puestos en el balón de fondo plano (2) junto con 300 ml de agua destilada, se realizó el montaje de acuerdo a la figura 8 verificando que no presentará fugas, y se extrajo hasta agotamiento de la muestra, finalmente el extracto fue separado en el embudo de decantación, recolectado en frascos ámbar de 50 mL y almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. El procedimiento se realiza por triplicado.

5.3.4. Extracción con CO₂ supercrítico

Para el proceso de extracción con CO₂ supercrítico se utilizó el equipo descrito en la figura 12.

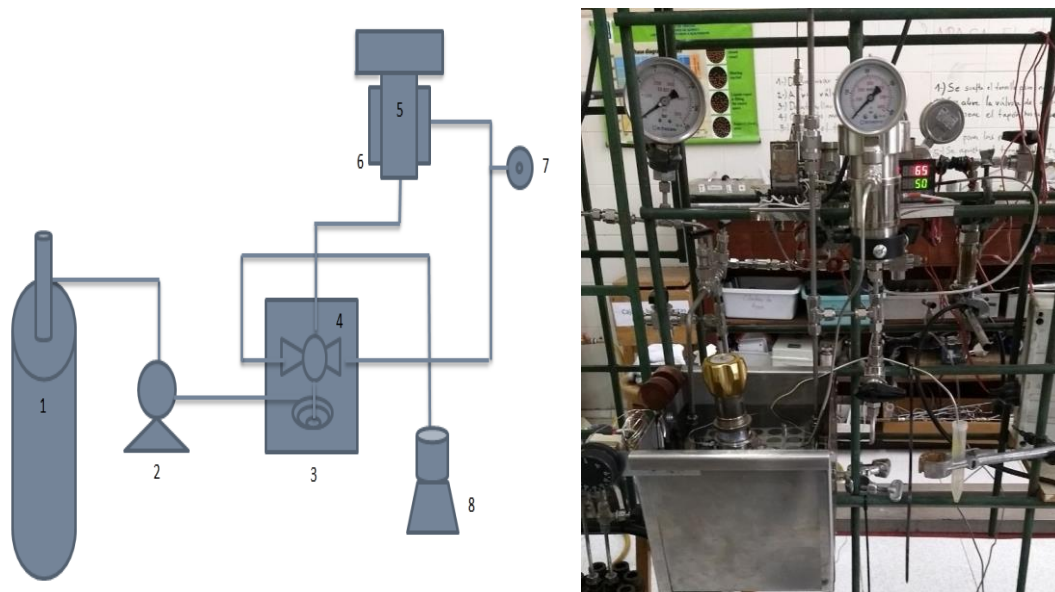


Figura 12. Diagrama esquemático y fotografía del equipo de extracción supercrítica con CO₂: (1) cilindro de CO₂; (2) bomba Nova Werke AG CH-8307 Effretikon; (3) baño de precalentamiento; (4) válvula reguladora de presión (BPR), (5) celda de extracción; (6) una chaqueta de calentamiento y regulador de temperatura; (7) manómetro y (8) colector de extracto.

En el proceso de extracción se usaron ~40 g de la muestra seca y molida los cuales fueron puestos en la celda de extracción. El sistema fue cerrado y se alcanzaron las condiciones de extracción de acuerdo al diseño experimental Tabla 7. Las extracciones se realizaron en discontinuo con ciclos de 10 min durante 120 min. Los extractos fueron recolectados en frascos ámbar de 10 mL y almacenados a -20 °C hasta su uso.

5.3.5. Diseño experimental

Con el fin de conocer el efecto la presión y la temperatura en el proceso de extracción supercrítica sobre el rendimiento de extracción y las actividades antioxidante, antibacterial y antiplaquetaria, se empleó un diseño factorial 2², como como se muestra en la Tabla 7.

Ensayo	Presión (Bar)	Temperatura (°C)
1	275	45
2	325	65
3	325	45
4	275	65

Tabla 7. Condiciones de presión y temperatura utilizadas en la extracción con CO₂ supercrítico

Cada ensayo del diseño fue realizado por duplicado y los resultados fueron reportados como la media \pm desviación estándar ($x \pm sd$).

5.3.6. Determinación de la actividad antioxidante de Extractos

La actividad antioxidante fue determinada por los ensayos DPPH y FRAP.

A. Ensayo DPPH

La capacidad para la eliminación de radicales libres se desarrolló de acuerdo con el método propuesto por (Granados, Yañez, & Diofanor, 2014), con algunas modificaciones. Trolox fue empleado como estándar y se construyó una curva de calibración entre 25 y 500 μ M. Se dispusieron 10 mL de la una solución Stock 24 % p/v de DPPH la cual fue diluida con metanol hasta alcanzar una absorbancia de $1,100 \pm 0,02$ a 515 nm. Posteriormente, 950 μ L de la solución de DPPH fue mezclada con 50 μ L de extracto y agitada con vórtex por 5 s. Luego de 30 min de incubación, se realizó la lectura de la absorbancia a la longitud de onda señalada cada 10 minutos por 2 horas, hasta lectura constante. Los valores finales fueron relacionados con la curva de calibración determinando el % de inhibición de acuerdo con la ecuación 1, donde A_0 corresponde a la absorbancia de control (mezcla sin extracto) y A_1 a la absorbancia de la mezcla de

reacción (DPPH con extracto o Trolox). Los resultados se expresan como mg equivalentes de Trolox por cada 100 g de muestra en base seca (mg Eq-Trolox/100g muestra).

$$\%Inhibición = 100 \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \quad (1)$$

B. Ensayo de FRAP

El ensayo de FRAP fue desarrollado de acuerdo a la metodología propuesta por (Agudo Medina, 2010), con algunas modificaciones. El reactivo de FRAP fue preparado mezclando 2,5 mL de la solución TPTZ (10 mM en HCl 40 mM) con 25 mL de buffer acetato (300 mM, pH 3,6) y 2,5 mL de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (20mM). Para cada ensayo, en un tubo eppendorf de 2,0 mL se preparó la solución de lectura con 900 μ L del reactivo de FRAP, 90 μ L de agua destilada y 30 μ L del patrón (Trolox) o del extracto (concentración 2mg/mL o 8mg/mL) y se incubó a 37 °C durante 4 minutos, luego de lo cual se mide la absorbancia inicial a 593 nm y se realizan lecturas cada 10 minutos durante 2 horas hasta alcanzar valores de absorbancia constantes. La curva de calibración fue preparada con Trolox entre 200 μ M a 600 μ M siguiendo el mismo procedimiento. Los resultados se expresan como mg equivalentes de Trolox por cada 100 g de muestra en base seca (mg Eq-Trolox/100g muestra).

5.3.6. Evaluación de la actividad antibacteriana por difusión en Agar

La actividad antibacteriana fue evaluada mediante la metodología propuesta por (Ramírez, Aristizabal y Marín, 2012). Las cepas bacterianas (*E. coli* o *S. aureus*) fueron sembradas de manera independiente en agar nutritivo (extracto de carne, extracto de levadura, peptona,

carbohidratos y cloruro de sodio) (Montoya, 1999) en forma de rejilla empleando cajas de Petri. Se realizaron 5 pozos de 6 mm de diámetro sellando el fondo con 15 μ L de agar. En cada pozo se adicionaron 3 μ L del extracto de gardenia, todos los tratamientos se llevaron a incubación a 37°C por 24 horas. Luego del tiempo de incubación se midieron los halos de inhibición, en los que se observa el crecimiento de la colonia bacteriana, se considera activo cuando el halo medido es > 30 mm, de actividad intermedia con diámetro entre 20-30 mm y no activo (o resistente) cuando el diámetro es < 20 mm.

5.3.7. Actividad antiplaquetaria

La evaluación de la actividad antiplaquetaria se desarrolló de acuerdo al procedimiento propuesto por Quesada y cols, 2013. Para cada ensayo se extrajo 1 mL de sangre humana de un paciente sano. Se empleó heparina como control positivo y referencia. 6 μ L de sangre fueron dispuestos en un portaobjetos, a los cuales se les agregó 3 μ L de heparina. La mezcla se incubó por 2 min, luego de lo cual se midió el tiempo de coagulación. La evaluación de los extractos se realizó reemplazando la heparina y siguiendo el mismo procedimiento. Los resultados se reportaron indicando el tiempo de coagulación de cada extracto relacionados con el de la heparina.

5.3.8 Análisis estadístico

El efecto de las variables independientes (presión y temperatura) sobre las respuestas de las actividades evaluadas fue analizado mediante diagramas de Pareto y el análisis de la varianza (ANOVA) empleando Statistica 12®.

6. Análisis de resultados

6.1. Rendimiento de extracción

Los rendimientos de extracción de los procesos de extracción mediante arrastre con vapor y SFE se resumen en la Tabla 8.

Técnica de extracción	Condición		Rendimiento (g/100 g)	Actividad antioxidante		Actividad antibacteriana (mm)		Actividad antiplaquetaria (s)
	Presión (bar)	Temperatura (°C)		DPPH (mg Eq/100 g)	FRAP (mg Eq/100g)	E. Coli	S. aureus	
SFE	275	45	5,12 ± 0,20	2,08 ± 0,14	5,50 ± 0,42	4,05 ± 0,33	6,03 ± 0,25	184,5 ± 0,71
	325	65	8,56 ± 0,35	2,71 ± 0,16	3,06 ± 0,35	4,37 ± 0,35	6,63 ± 0,25	183,0 ± 1,41
	325	45	6,86 ± 0,33	3,09 ± 0,12	3,73 ± 0,39	4,15 ± 0,28	6,05 ± 0,09	186,5 ± 2,12
	275	65	3,72 ± 0,41	2,30 ± 0,40	7,25 ± 0,49	4,42 ± 0,52	6,50 ± 0,25	184,5 ± 1,85
Hidrodestilación		96	4	4,6	6,8	9,0	14,0	360

Tabla 8. Resultados experimentales

De acuerdo con los resultados obtenidos se pudo determinar que el extracto con mejor porcentaje de rendimiento (8,56 g/100g) fue el obtenido a 325 bar y 65 °C. De acuerdo con el diagrama de Pareto (Figura 13) el efecto positivo de la presión es significativo sobre esta variable, seguido por el efecto de la interacción presión-temperatura, mientras que la temperatura no afecta el rendimiento. El ANOVA se resume en la tabla 9.

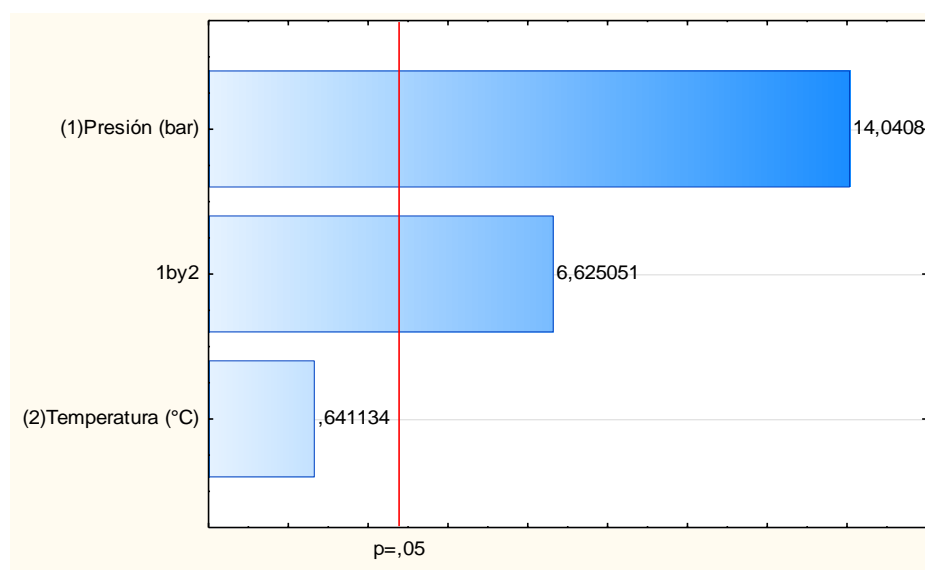


Figura 13. Diagrama de Pareto Rendimiento (g/100g)

El estudio realizado por He y cols. (2010) muestra que las mejores condiciones de extracción con sc-CO₂ para frutos de *G. jasminoides* fueron 368 bar y 65°C con un rendimiento de 9,77%, lo cual es similar al obtenido en este estudio. También resulta interesante mencionar que, en dicho trabajo He y cols. (2010), obtuvieron el menor rendimiento a 200 bar y 65°C (1,08%), cuyo valor también es similar al obtenido a las condiciones experimentales.

En cuanto al proceso de hidrodestilación empleado como referencia, se obtuvo un rendimiento de 4%, el cual es menor a los valores obtenidos por SFE, lo que da cuenta de un proceso más eficiente, lo que puede estar relacionado con alta volatilidad, alta difusividad y baja viscosidad del CO₂, lo que permite transportar de los componentes del extracto con mayor facilidad; de igual manera, la selectividad de CO₂ permite obtener microcomponentes valiosos como compuestos antioxidantes y antimicrobianos, como se muestra en los resultados relacionados con estas variables.

6.2. Determinación de la actividad antioxidante

6.2.1. Método DPPH

De acuerdo con la metodología descrita se estudió la capacidad antioxidante de los extractos para inhibir la formación del radical libre de DPPH. Los resultados obtenidos fueron interpolados en la curva de calibración realizada con trolox ($-0,007x + 0.5491$; $R^2 0.97$). Con los resultados obtenidos se determinó la actividad antioxidante de cada uno de los extractos (ver Tabla 8). El extracto que presenta la mejor actividad fue el obtenido a 325 bar y 45 °C. De acuerdo con el diagrama de Pareto (Figura 14) la presión es la variable que más afecta al DPPH como respuesta, mientras que los efectos combinados presión-temperatura y temperatura no son importantes.

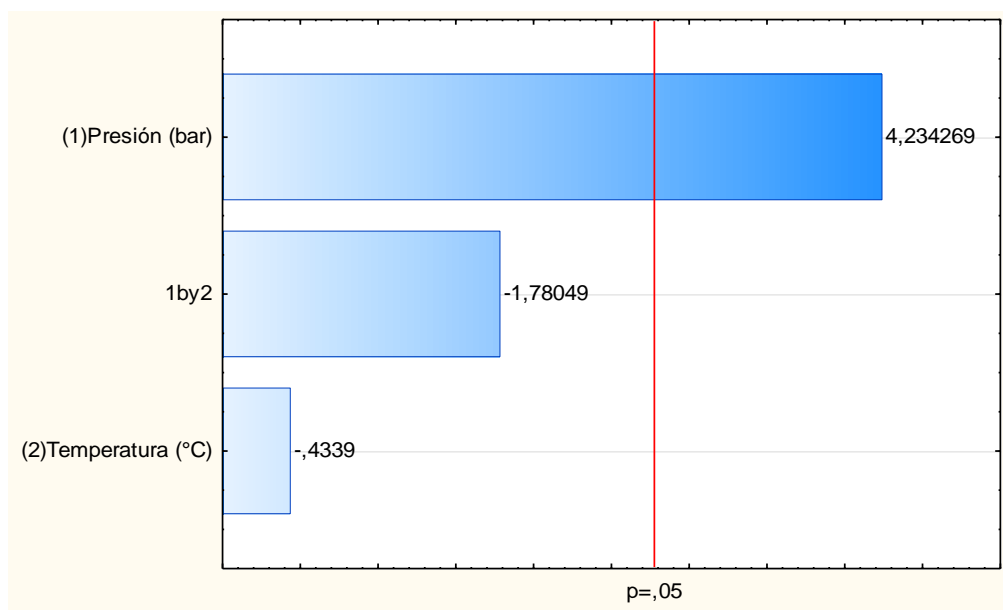


Figura 14. Diagrama de Pareto DPPH (mg Eq/100g)

Se han realizado diversos estudios con respecto a la actividad antioxidante de frutos de la planta de *G. jasminoides*, en los cuales se ha determinado que son una excelente fuente de antioxidantes para ser empleados como suplementos dietéticos. En el estudio realizado por Beong Ou Lim se encontraron actividades de 0,14 mg/mL y 0,36 mg/mL para los extractos acuoso y etanólico del fruto de *G. jasminoides*, respectivamente.

En el estudio realizado por Xiao Wenping y sus colaboradores acerca de las bioactividades de los extractos obtenidos a partir de los frutos de *G. jasminoides* se evidencia una gran actividad antioxidante en los extractos obtenidos con agua y etanol. Los valores para DPPH fueron de 0,14 mg/mL para el extracto acuoso y 0,36 mg/mL para el extracto etanólico respectivamente, mostrando mayor capacidad antioxidante el extracto acuoso al igual que en el estudio anterior. (Xiao, Li, Wang, & Ho, 2017)

No se encuentran reportes con respecto a resultados en este tipo de ensayos para extractos obtenidos a partir de flores, lo cual hace de este proyecto algo novedoso en cuanto a este campo,

ya que se demuestra que no solamente el fruto de la planta tiene una gran capacidad antioxidante, sino que además las flores pueden ser usadas para tal fin. En los resultados obtenidos se puede apreciar que el extracto obtenido por hidrodestilación tuvo una actividad antioxidante de 4,6mg Eq/100g.

Los resultados obtenidos para la actividad antioxidante con DPPH sugieren que la flor de *G. jasminoides* contiene compuestos capaces de transferir átomos de hidrógeno estabilizando el radical DPPH, lo cual está determinado por la energía de disociación de enlace de la sustancia que contiene el hidrógeno a transferir. Estos compuestos tienen una energía de disociación de enlace (EDE) muy baja lo que hace que la reacción entre el radical libre y el antioxidante sea termodinámicamente más favorable que la reacción entre el radical libre y el sustrato oxidable.

Las reacciones TAH son rápidas, independientes del pH y el solvente, pero sensibles a la presencia de metales y agentes reductores los cuales pueden generar una aparente mayor reactividad del antioxidante. (Londoño, 2012).

6.2.2. Método FRAP

De acuerdo con la metodología descrita se estudió la capacidad antioxidante de los extractos mediante el método FRAP. Los resultados obtenidos fueron interpolados en la curva de calibración realizada con trolox ($0.0047x + 0.3067$; $R^2 0.91$). Con los resultados obtenidos se determinó la actividad antioxidante de cada uno de los extractos (ver Tabla 8). El extracto que presenta la mejor actividad fue el obtenido a 325 bar y 65 °C. De acuerdo con el diagrama de Pareto (Figura 15) la presión es la variable que más afecta al FRAP como respuesta (efecto negativo), seguido de la interacción presión-temperatura (efecto negativo), mientras que el efecto de la temperatura no es importante.

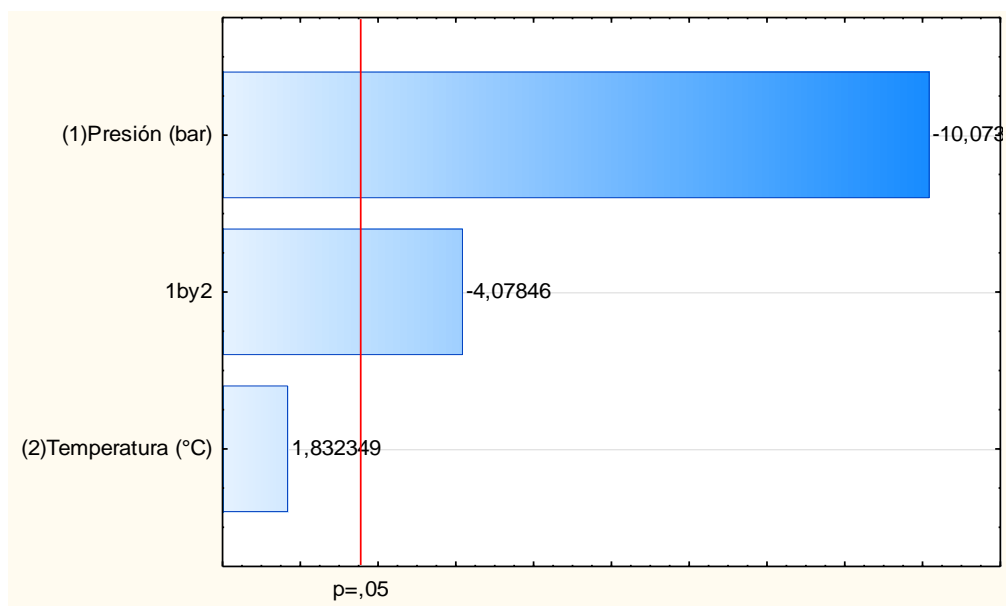


Figura 15. Diagrama Pareto FRAP (mg Eq/100g)

En el estudio realizado por Priyanka Maurya y sus colaboradores se extrajeron siete polimetoxiflavonas de *Gardenia Lucida*, estos componentes son considerados bioactivos. Se encontró que el compuesto Xanthomicrol presenta un gran potencial reductor férrico ($1,07\mu\text{M}/100\text{g}$ de muestra seca). (Maurya, Singh, Gupta, & Luqman, 2016).

Los resultados obtenidos sugieren que las condiciones de extracción a 325 bar y 65°C son las más favorables para el arrastre de compuestos reductores de hierro, lo cual se ve reflejado en su mayor actividad antioxidante con el método FRAP.

Los compuestos antioxidantes detectados mediante el método FRAP están correlacionados con el grado de hidroxilación y conjugación aromática, los cuales son compuestos con potenciales redox menores a $0,07\text{v}$. Se ha argumentado que la capacidad para reducir el hierro se correlaciona poco con la estabilización de radicales libres; sin embargo, la oxidación o reducción de radicales para formar iones puede detener la oxidación en cadena y por lo tanto el poder reductor reflejaría la capacidad de un compuesto para regular el estado redox (Londoño, 2012).

Al determinar el coeficiente de correlación (Figura 16) entre los valores equivalentes a Trolox por 100g de muestra seca se obtuvo un valor de 0.72, lo que muestra una correlación positiva, donde las dos variables se correlacionan en sentido directo, es decir que a valores altos de equivalentes a Trolox con DPPH, le corresponden valores altos de equivalentes a Trolox con FRAP y viceversa. Esto sugiere que los componentes capaces de captar radicales libres podrían ser los mismos que reducen oxidantes en esta planta.

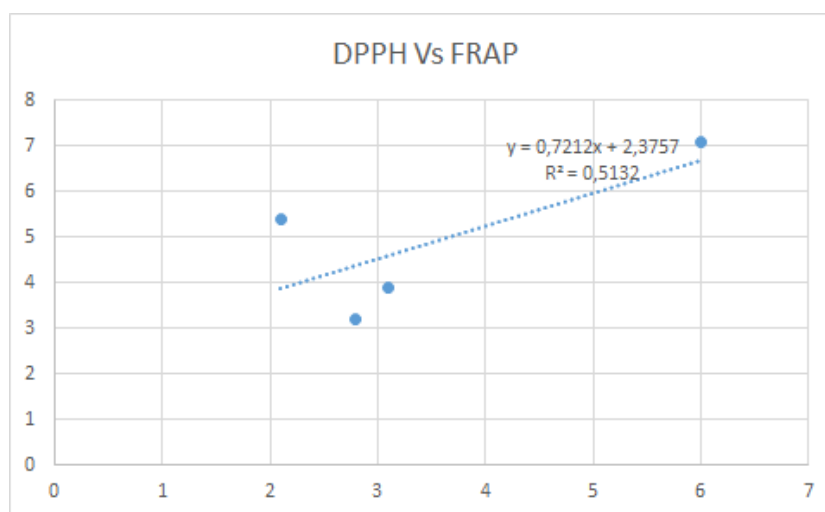


Figura 16. Coeficiente de correlación DPPH vs FRAP

La actividad antioxidante observada puede relacionarse con a la presencia de compuestos de tipo terpenoide, como el linalool, típicos en los aceites esenciales (Xiao, Lo, W vs Ho, 2017) El linalool (2,6-dimetil-2, 7-octadieno-6-ol) es un monoterpeno presente en más de 200 tipos de plantas, y es el principal componente de varios aceites esenciales. El linalool tiene una amplia gama de propiedades farmacológicas potenciales, tales como antiséptico, ansiolítico, antiinflamatorio, antifúngico, antimicrobiano y proapoptótico en diferentes líneas de células tumorales. Sin embargo, su uso principal está asociado como una molécula olorosa o fragancia en productos tópicos, en productos cosméticos y en la industria de fragancias. Actúa como

antioxidante protegiendo los lípidos, la sangre y demás fluidos corporales del ataque de radicales libres de especies del oxígeno, como oxígeno singlete, y radicales hidroxilo, peróxido y superóxido (Rodríguez, 2017).

6.3. Actividad antibacteriana

De acuerdo con la metodología planteada para este ensayo se realizó una siembra con las bacterias correspondientes (*E. coli* y *S. aureus*) empleando la técnica en rejilla, posteriormente se adicionaron 3 μL de los extractos y se llevaron a incubación a 37 °C durante 24 horas.

Pasado este tiempo se midieron los halos para determinar la inhibición o no inhibición de cada extracto, los ensayos se realizaron por duplicado; para los cuales se obtuvieron los resultados que se aprecian en la tabla 4, donde se pudo concluir de acuerdo a lo que se observó que todos los extractos presentaron inhibición, deteniendo el crecimiento de las bacterias evidenciando que todos los extractos tienen un mayor efecto de inhibición sobre la bacteria *S. aureus*. Sin embargo, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los extractos ($p > 0,05$) por lo que tampoco es posible establecer los efectos de los factores relativos a la extracción (presión y temperatura) sobre la actividad antibacteriana sobre *E. coli* (Figura 17).

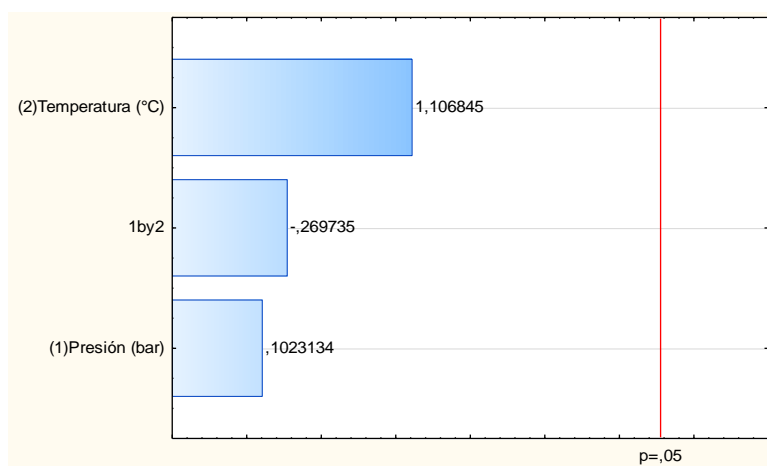


Figura 17. Diagrama de Pareto Inibición *E. Coli* (mm)

Por otra parte, la actividad antibacteriana sobre *S. aureus* se ve afectada principalmente por la temperatura (efecto positivo), evidenciándose diferencias estadísticas sobre las condiciones de extracción. (Figura 18).

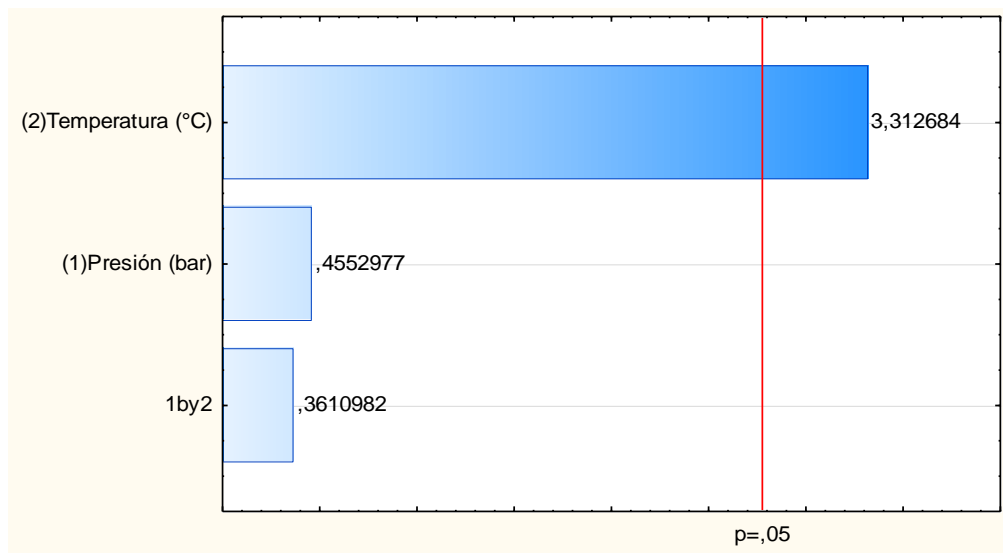


Figura 18. Diagrama de Pareto Inhibición (mm)

En la literatura no se encuentran muchos reportes bibliográficos acerca de la actividad antibacteriana del extracto de *G. jasminoides*, sin embargo, en estudios realizados con otros extractos como el de mandarina y naranja (Juaréz, y otros, 2010) se han reportado resultados donde se considera que estos extractos tienen actividad antibacteriana con halos a partir de 2 mm.

En el estudio realizado por Martínez y colaboradores (Martínez, Ojeda, Sulbarán, & Nava, 2003) donde se utilizó extracto de mandarina Dancy para determinar su actividad antibacteriana en *Streptococcus aureus* se presentaron halos de inhibición de 5mm en extractos puros y 4 mm en extractos diluidos. En los extractos de *G. jasminoides* puros se presentaron halos de 6,0 mm y 6,5 mm para los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico y de 14,0 mm para el extracto obtenido por hidrodestilación, lo cual sugiere que la actividad antibacteriana del extracto de *G. jasminoides* es mayor a la de la mandarina Dancy para esta bacteria. (Martínez, Ojeda, Sulbarán, & Nava,

2003).

En el estudio elaborado por Juárez y colaboradores se establecieron halos de 21 mm a 28 mm con aceite esencial de naranja para la bacteria *S. aureus* y total inactividad del extracto frente a la bacteria *E. Coli*. Los halos obtenidos con aceite de *G. jasminoides* muestra una actividad antibacteriana leve con halos de 4 mm a 5 mm en los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico y un halo de 9 mm para el aceite obtenido por hidrodestilación para la bacteria *E. Coli*, lo cual sugiere una actividad mayor a la encontrada con los aceites de naranja y menor a la actividad antibacteriana frente a la bacteria *S. aureus*. (Juaréz, y otros, 2010)

Los diferentes estudios analizados muestran una mayor actividad inhibitoria en las bacterias gram positivas que en las bacterias gram negativas, esto es debido a la composición de la pared celular de las bacterias, ya que las gram negativas contienen una doble capa lipídica y una capa de peptidoglicano que las hace más resistentes a la acción de las sustancias antimicrobianas.

El coeficiente de correlación para la actividad antibacteriana en los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico muestra un coeficiente de correlación de 1 lo que indica que es una correlación perfecta positiva, ya que ambas variables aumentan en proporción constante.

6.4. Actividad antiplaquetaria

Teniendo en cuenta la metodología propuesta para este ensayo, se obtuvieron los tiempos de coagulación de sangre expuesta a los extractos obtenidos. Para el extracto obtenido por hidrodestilación y el extracto a 275 bar y 45°C se observó que hubo distensión de la sangre y el extracto a 325 bar y 75°C presenta decoloración de la sangre, todos los extractos presentan retardación en la coagulación obteniendo un mayor tiempo con el hidrodestilado. Si bien en todos los casos con los extractos se evidenció coagulación, es evidente que la agregación

plaquetaria no se da, ya que el aspecto de la sangre es diferente al de la muestra de sangre de control. La sangre se separó en pequeños puntos y en vez de unirse se separaron.

Adicionalmente, no se observaron diferencias estadísticas entre los extractos y la actividad antiplaquetaria como respuesta, por lo que no es posible establecer efectos (Figura 19).

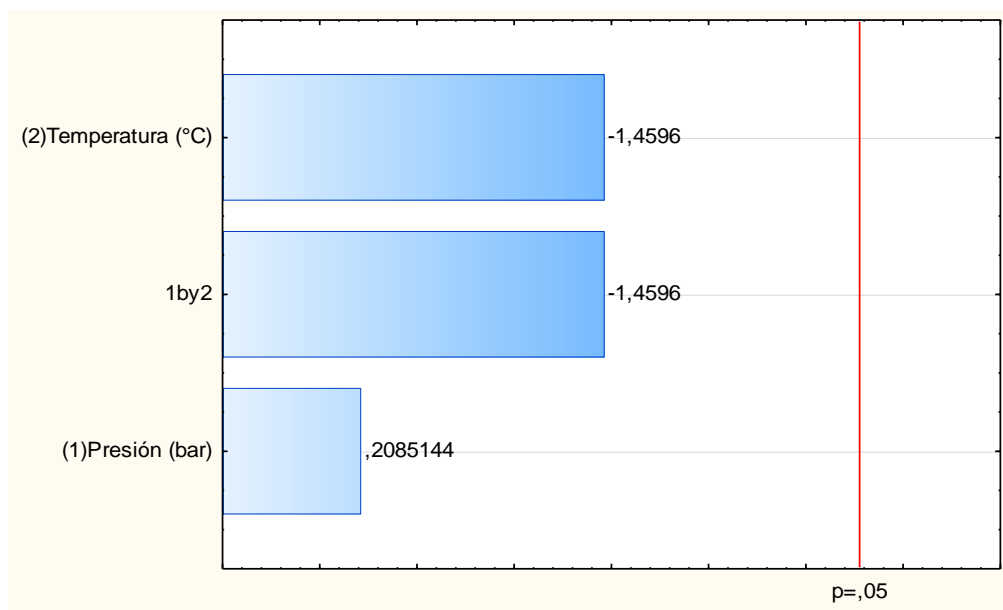


Figura 19. Diagrama de Pareto Tiempo de coagulación (s)

Se han realizado estudios *in vivo* con extractos obtenidos por decocción acuosa de *G. jasminoides* en los cuales se ha evidenciado que no influye en la circulación de la sangre en células musculares. También se han separado algunos componentes presentes en la *G. Jasminoides* como n- butanol fracción genipin que muestra inhibición de la actividad PLA₂.

Factor de respuesta	Variables independientes	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Valor F	Valor p	R ²
Rendimiento	Presión (bar)	21,58245	1	197,1450	0,000149	0,9837
	Temperatura (°C)	0,04500	1	0,4111	0,556325	
	Presión x Temperatura	4,80500	1	43,8913	0,002692	
	Error puro	0,43790	4			
	Total	26,87035	7			
DPPH	Presión (bar)	1,001113	1	17,92904	0,013324	0,84182

	Temperatura (°C)	0,010512	1	0,18827	0,686738	
	Presión x Temperatura	0,177012	1	3,17014	0,149599	
	Error puro	0,223350	4			
	Total	1,411988	7			
FRAP	Presión (bar)	17,79061	1	101,4794	0,000546	0,96812
	Temperatura (°C)	0,58861	1	3,3575	0,140843	
	Presión x Temperatura	2,91611	1	16,6338	0,015118	
	Error puro	0,70125	4			
	Total	21,99659	7			
Actividad antibacteriana E. Coli	Presión (bar)	0,001512	1	0,010468	0,923432	0,24647
	Temperatura (°C)	0,177013	1	1,225106	0,330442	
	Presión x Temperatura	0,010512	1	0,072757	0,800707	
	Error puro	0,577950	4			
	Total	0,766988	7			
Actividad antibacteriana S. Aureus	Presión (bar)	0,010513	1	0,20730	0,672514	0,73876
	Temperatura (°C)	0,556513	1	10,97387	0,029580	
	Presión x Temperatura	0,006612	1	0,13039	0,736290	
	Error puro	0,202850	4			
	Total	0,776488	7			
Actividad antiplaquetaria	Presión (bar)	0,12500	1	0,043478	0,845015	0,51832
	Temperatura (°C)	6,12500	1	2,130435	0,218172	
	Presión x Temperatura	6,12500	1	2,130435	0,218172	
	Error puro	11,50000	4			
	Total	23,87500	7			

Tabla 9. ANOVA

Conclusiones

- Con la obtención de extractos de *G. jasminoides* obtenidos con CO₂ supercrítico se logró determinar una alta bioactividad donde se evidencio su buen comportamiento antioxidante y antibacteriano.
- Los extractos de *G. jasminoides* obtenidos a 325 bar y 45 °C 325 bar y 65 °C presentan actividad antioxidante observada mediante los métodos DPPH y FRAP (2,8 mg Eq / 100g y 3,06 mg Eq / 100g, respectivamente) lo que sugiere que el material es fuente importante de sustancias con capacidad para inhibir o retardar procesos oxidativos involucrados en múltiples fenómenos como la conservación alimentos. Asimismo, la técnica de extracción con fluidos supercríticos demostró ser eficiente para la obtención de extractos con este tipo de potencial.
- Los extractos supercríticos obtenidos tienen alto potencial para ser usados como bacteriostáticos frente a *E. coli* y *S. aureus*. Asimismo, se identificó que *S. aureus* presenta mayor sensibilidad a los extractos obtenidos.
- Se determinó que a pesar de que los extractos presentan una retardación en la coagulación de la sangre, su potencial antiplaquetario no es significativo.
- El efecto de la presión y la temperatura sobre el aceite esencial de *G. jasminoides* en la extracción con CO₂ supercrítico incide de manera determinante, aunque en la mayoría de los casos el efecto de mayor importancia fue la presión, esto implica que es necesario estudiar un mayor rango de presiones para conocer en detalle la naturaleza de este efecto sobre las variables de respuesta.

Recomendaciones

- Es necesario establecer la naturaleza química de los extractos obtenidos empleando técnicas como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, a fin de establecer la correlación entre la bioactividad y la composición química.
- Es necesario adelantar estudios sobre los efectos bacteriostáticos y bactericidas de los extractos sobre las bacterias estudiadas, relacionados con aspectos dosis-respuesta y modificaciones metabólicas en los microorganismos a fin de determinar la viabilidad farmacéutica de los extractos.

Referencias Bibliográficas

Agudo Medina, L. (2010). Técnicas para la determinación de compuestos antioxidante en alimentos. *Autodidacta Revista virtual*, 27-34. Obtenido de autodidacta Web site: http://www.anpebadajoz.es/autodidacta/autodidacta_archivos/numero_9_archivos/l_a_medina.pdf

Antiagregantes plaquetarios: Mecanismos de acción y riesgos asociados al uso. Web site: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n1/v16n1a16.pdf>

Antioxidante. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 686-691. Obtenido de Uan Web site: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/8/119.pdf>
Arredondo, A., Avila R., & Muñoz, L. (2012). Fichas descriptivas de 52 plantas ornamentales que se comercializan en la Huasteca Potosina. Web site: <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/904.pdf>

Banchero, L., Carballo, S., & Telesca, J. (2007). Manual de secado solar de especies medicinales y aromáticas para predios familiares. Web site: <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/18429090512093946.pdf>

Betancor, L., & Yim, I. (2012). Salmonella y salmonelosis. Web site: http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Salmonella_y_salmonelosis.pdf

Calderón Hernández, J. A. (2011). Caracterización fitoquímica, actividad antibacteriana y antioxidante de extractos de plantas medicinales utilizadas en Pereira y Santa Rosa de Cabal (Risaralda): UTP. Obtenido de UTP Web site: <http://recursosbiblioteca.utp.edu.co/dspace/handle/11059/2265>

Castillo Borja, F. (2015). Líquidos Iónicos: Métodos de Síntesis y Aplicaciones. *Conciencia Tecnológica*, 52-56.

Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus Aureus*. *Revista Latinoamericana Patología Clínica Medicina de Laboratorio*, 28-40.

Conde L & Guerrero J, (2009). Extracción supercrítica de antioxidantes naturales a partir de hierbas y especias. Web site: [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Conde-Hernandez-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Conde-Hernandez-et-al-2009.pdf)

Granados, C., Yañez, X., & Diofanor, A. (2014). Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar de *Myrcianthes leucoxylla* de Norte de Santander (Colombia). *Información tecnológica*, 11-16.

He, W., Gao, Y., & Yuan, F. e. (2010). Optimization of Supercritical Carbon Dioxide

Extraction of Gardenia Fruit Oil and the Analysis of Functional Components. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1071-1079.

Juaréz, J., Castro, A., Jaúregui, J., Lizano, J., Carhuapoma, M., Choquesillo, F., . . . Ramos, N. (2010). COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Citrus sinensis* L. (NaRaNJa DULCE) Y FORMULACIÓN DE UNA FORMA FARMACÉUTICA. *Ciencia e investigación*, 9-13.

Kuskoski E., M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology (Campinas)*, 726-732

Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Medellín: Corporación Universitaria Lasallista.

López Farré, A., & Macaya, C. (2012). Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición: *Revespecardiol*. *Revista española de cardiología*, 2-7. Obtenido de *Revespecardiol* Web site.

Martínez, J., Ojeda, G., Sulbarán, B., & Nava, R. (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 502-512.

Maurya, P., Singh, S., Gupta, M., & Luqman, S. (2016). Caracterización de constituyentes bioactivos a partir de la resina de goma de *Gardenia lucida* y su potencial farmacológico. *Biomedecine & pharmacotherapie*, 444-456.

Montoya Cadavid, G. (2010). Aceites Esenciales: Una Alternativa de Diversificación para el Eje Cafetero. Web site: <http://www.bdigital.unal.edu.co/50956/7/9588280264.pdf>

Orjuela, R. A. (2015). Determinación de actividad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson: UDCA. Obtenido de UDCA Web site: <http://repository.udca.edu.co:8080/jspui/handle/11158/408>

Ortiz Sánchez, C., García Herrera, T., Gutiérrez Casiano, N., Sánchez Bazán, I., Sánchez Bazán, L., Martínez Reyes, J., & Canseco López, A. M. (2016). Elaboración de un té a base de gardenia (*G. jasminoides*) y evaluación de su actividad
Palomo, I., Torres, C., Moore- Carrasco, R., Alarcón, M., & Maragaño, P. (2008).

Peralta, J., & Royuela, M. (15 de 01 de 2015). Familia Rubiaceae: Herbario de la Universidad Pública de Navarra. Obtenido de Herbario de la Universidad Pública de Navarra Web site: <http://www.unavarra.es/herbario/htm/Rubiaceae.htm>

Quesada, L., Gutiérrez, M., Astudillo, L., San Martín, A., Fuentes, E., Palomo, I., & Peñailillo, P. (2013). Determination of antibacterial, antioxidant, antiplatelet and inhibition of cholinesterase activities from the methanolic extracts of *Azorella* species (Apiaceae). *Boletín*

Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 99-107.

Ramírez Aristizabal, L. S., & Marín, D. (2012). Evaluación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales y extractos etanólicos utilizando métodos de difusión en agar y dilución en pozo. *Scientia Et Technica*, 152-157.

Rodríguez, L. M. (2017). Estudio de los parámetros fisicoquímicos de los complejos de timol, carvacrol y linalol en ciclodextrinas y evaluación del efecto de la complejación en su actividad antimicrobiana. Murcia: UCAM.

Sharathkumar, A., & Shapiro, A. (Abril de 2008). Trastornos de la función plaquetaria: Wfh. Obtenido de Wfh Web site: <http://www1.wfh.org/publication/files/pdf-1148.pdf>

Xiao, W., Li, S., Wang, S., & Ho, C. (2017). Chemistry and bioactivity of *Gardenia Jasminoides*. Elsevier. Obtenido de Science direct Web site: <http://www.sciencedirect.com/science/arti>