ÍNDICE MEMORIA

Índice memoria ..... - 1 -
Resum..... - 5 -
Resumen ..... - 5 -
Abstract ..... - 6 -
Agradecimientos ..... - 7 -
GLOSARIO ..... - 8 -
Capítulo 1: Planificación ..... - 9 -
Capítulo 2: Introducción ..... - 10 -
2.1. Conceptos previos sobre la oxidación ..... - 10 -
2.1.1. Efectos del oxígeno en el metabolismo: estrés oxidativo - 10 -
2.1.2. Especies reactivas del oxígeno y radicales libres..... - 11 -
2.1.3. Compuestos fenólicos ..... - 13 -
2.1.4. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos..... - 20 -
2.1.5. Biodisponibilidad de compuestos fenólicos ..... - 21 -
2.1.6. Diseño de alimentos funcionales con efecto antioxidante - 22 -
2.2. Conceptos sobre el color ..... - 25 -
2.2.1. La concepción moderna del color ..... - 25 -
2.2.2. Absorción de la luz ..... - 26 -
2.2.3. Tinte y pigmento ..... - 27 -
2.2.4. El color ..... - 28 -
2.2.5. Determinación del color ..... - 31 -
2.3. Las rosas ..... - 34 -
2.3.1. Introducción ..... - 34 -
2.3.2. Anatomía de las flores ..... - 35 -
2.3.3. Descripción de las rosas estudiadas ..... - 36 -
2.4. Estado del arte sobre las rosas ..... - 38 -
2.5. Hipótesis de partida ..... - 42 -
2.6. Determinación de polifenoles totales ..... - 42 -
2.6.1. Método Folin Ciocalteu ..... - 42 -
2.7. Determinación de la capacidad antioxidante ..... - 43 -

2.7.1. Método TEAC ..... - 43 -
2.7.2. Método ORAC ..... - 43 -
Capítulo 3: Objetivos ..... - 45 -
Capítulo 4: Material y Métodos ..... - 46 -
4.1. Preparación de muestras ..... - 47 -
4.2. Diseño del experimento y nomenclatura ..... - 48 -
4.3. Extracción de los compuestos antirradicalarios del pétalo de rosa - 49 -
4.3.1. Reactivos ..... - 49 -
4.3.2. Material e instrumentos ..... - 49 -
4.3.3. Preparado de disolventes: ..... - 49 -
4.3.4. Procedimiento de extracción ..... - 50 -
4.4. Extracción simple del pétalo de rosa ..... - 51 -
4.4.1. Reactivos ..... - 51 -
4.4.2. Material e instrumentos ..... - 51 -
4.4.3. Procedimiento ..... - 51 -
4.5. Emulsiones ..... - 51 -
4.5.1. Reactivos ..... - 51 -
4.5.2. Material e instrumentos ..... - 52 -
4.5.3. Procedimiento ..... - 52 -
4.6. Determinación de valor de peróxido por el método de ferrocianato - 54 -
4.6.1. Reactivos ..... - 54 -
4.6.2. Material e instrumentos ..... - 54 -
4.6.3. Procedimiento ..... - 54 -
4.7. Polifenoles totales ..... - 55 -
4.7.1. Reactivos ..... - 55 -
4.7.2. Material e instrumentos ..... - 55 -
4.7.3. Procedimiento ..... - 55 -
4.8. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ..... - 56 -
4.8.1. Reactivos ..... - 56 -
4.8.2. Material e instrumentos ..... - 56 -
4.8.3. Procedimiento ..... - 57 -
4.8.4. Recta de calibrado: TEAC ..... - 58 -
4.9. ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity) ..... - 59 -

4.9.1. Reactivos ..... - 59 -
4.9.2. Material e instrumentos ..... - 59 -
4.9.3. Procedimiento ..... - 59 -
4.9.4. Recta calibrado: ORAC ..... - 60 -
4.10. Antocianinas ..... - 61 -
4.10.1. Material ..... - 61 -
4.10.2. Procedimiento ..... - 61 -
4.10.3. Curva de calibrado: Antocianinas ..... - 62 -
4.11. Flavonoides ..... - 63 -
4.11.1. Reactivos ..... - 63 -
4.11.2. Material ..... - 63 -
4.11.3. Procedimiento ..... - 63 -
4.11.4. Recta de calibrado: Flavonoides ..... - 65 -
4.12. Determinación del color de los pétalos ..... - 65 -
4.12.1. Material ..... - 65 -
4.12.2. Procedimiento ..... - 66 -
4.13. Barrido espectral de los extractos ..... - 66 -
4.13.1. Material ..... - 67 -
4.13.2. Procedimiento ..... - 67 -
Capítulo 5: Resultados ..... - 68 -
5.1. Resultados de emulsiones en diferentes tipos de flores ..... - 68 -
5.2. Tratamiento inicial ..... - 70 -
5.2.1. Resultados: Clasificados por tipo de rosa ..... - 70 -
5.2.2. Resultados de Folin Ciocalteu ..... - 83 -
5.2.3. Resultados de TEAC ..... - 84 -
5.2.4. Resultados de ORAC ..... - 85 -
5.2.5. Resultados de Flavonoides ..... - 87 -
5.2.6. Resultados de Antocianinas ..... - 88 -
5.2.7. Resumen de resultados ..... - 91 -
Capítulo 6: Presupuesto ..... - 92 -
6.1. Material fungible ..... - 92 -
6.2. Material básico de laboratorio ..... - 93 -
6.3. Maquinaria ..... - 94 -
6.4. Reactivos ..... - 95 -
6.5. Agua ..... - 95 -

6.6. Energía ..... - 96 -
6.7. Personal ..... - 96 -
6.8. Presupuesto total ..... - 97 -
Capítulo 7: Conclusiones ..... - 98 -
Capítulo 8: Bibliografía ..... - 99 -
8.1. Referencias bibliográficas ..... - 99 -
8.2. Bibliografía de consulta ..... - 101 -

RESUM

Avui dia, les flors estan guanyant importància a la nostra alimentació. Es coneixen els beneficis que poden aportar a l'organisme.

Per evitar la degradació de les cèl·lules, tradicionalment s'han utilitzat antioxidants sintètics que redueixen la oxidació lipídica. A l'actualitat, existeix una tendència a substituir aquestes substàncies per antioxidants naturals.

Les roses són de les flors més utilitzades a l'alimentació i de le més estudiades.

L'objectiu principal del projecte es basa en l'estudi de l'activitat antioxidant i antirradicalària de diferents tipus de roses, amb diversos colors, mitjançant els mètodes de Folin-cicloalteau, TEAC y ORAC.

També, analitzar la quantitat de flavonoides totals i antocianines totals que tenen els diferents extractes. I relacionar el color del pètal de rosa amb l'activitat antioxidant de la mostra.

RESUMEN

Hoy en día, las flores están ganando importancia en nuestra alimentación. Se conoce los beneficios que pueden aportar al organismo.

Para evitar el deterioro de las células, tradicionalmente se han utilizado antioxidantes sintéticos que reducen la oxidación lipídica. En la actualidad, existe una tendencia de sustituir estas sustancias por antioxidantes naturales.

Las rosas son de las flores más utilizadas en la alimentación y de las más estudiadas.

El objetivo principal del proyecto se basa en estudiar la actividad antioxidante y antirradicalaria de diferentes tipos de rosas, con colores distintos, mediante los ensayos de Folin-cicloalteau, TEAC y ORAC.

También analizar la cantidad de flavonoides totales y antocianinas totales que tienen los diversos extractos. Y relacionar el color del pétalo de rosa con la actividad antioxidante de la muestra.

ABSTRACT

Today, the flowers are gaining importance in our diet. It is known that can bring benefits to the body.

To avoid the deterioration of cells, traditionally used synthetic antioxidants that reduce lipidoxidation. At present, there is a tendency to replace these substances by natural antioxidants.

Roses are the flowers used in food and the most studied.

The main objective of the project is to study the antioxidant and antiradical activity of different types of roses, different colors, using the theFolin-cicloalteau tests, TEAC and ORAC.

Also, analyze the amount of total flavonoides and anthocyanins have different extracts. And relate the rose petal color with the antioxidant activity of de sample.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a los compañeros del equipo de investigación, por su ayuda y dedicación. Gracias a Laura y Marga por solucionar muchas de mis dudas, a Carlos, Anna, Patricia y Mireia que en su momento me acompañaron y apoyaron en el laboratorio. Sobre todo agradecer a Monika la paciencia y el tiempo que me ofreció.

A María Pilar, por ofrecerme la oportunidad de trabajar en el equipo y aprender con ella.

Agradecer de manera especial a Eva, siempre compañera, con quién he compartido más horas en estos últimos meses y a Sergi, por estar siempre conmigo.

GLOSARIO

ABTS: ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico)

C: catequina

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

GAE: equivalente de ácido gálico

GC-MS: gas chromatography-mass spectrometry

GLA: ácido gamma-linolénico

HPLC: Highperformance Liquid Chromatography

ORAC: Oxygen Radical Antioxidant Capacity

PBS: phosphate buffered saline

RH: Recursos humanos asignados al proyecto

RL: radicales libres

ROOH: compuesto hidroperóxido

ROS: especies reactivas del oxígeno

SBA: Sueldo bruto anual

SS: Cuota a la Seguridad Social

TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

TLC: Thin-Layer Cromatography

Kg: quilogramos

g: gramos

mg: miligramos

µg: microgramos

L: litros

mL: mililitros

µL: microlitros

ppm: partes por millón

rpm: revoluciones por minuto

cm_2: centímetros cuadrados

nm: nanómetros

h: horas

t: tiempo

t_0: tiempo inicial

t_5: tiempo en el minuto 5

CAPÍTULO 1: PLANIFICACIÓN

En la tabla 1 se muestra la planificación que se seguirá en el PFC-2:

Tabla 1. *Planificación del PFC-2*

Tarea	Semana	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo	Total
Pruebas y resultados del PFC1	S06-16 PFC1								150
obtener muestras y envasar	S01	3	4	3					10
Extracción	S02	4	2	4	2				24
	S03	4	5	3					
Rotavaporar	S04	5	5	5	5	5			58
	S05	5	3	3	5				
	S06	3	4	4	3	3			
Liofilizar	S07	4		4	4				12
Organización de muestras	S08	3	3	3	3				12
2ª Extracción	S09	4		4		5			13
Color	S10	3	4	4					11
Folin	S11	4		4		4			12
TEAC y ORAC	S12	5		3		5			28
	S13	5		5	5				
Flavonoides y Antocianinas	S14	5	3						8
Tratar resultados	S15	5	5	3	3	5			37
	S16	4	4	4	2	2			
								TOTAL	375

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

2.1. Conceptos previos sobre la oxidación

Desde mediados del siglo XX la importancia que se da a la alimentación desde el punto de vista sensorial y alimentos funcionales va en aumento. En esta línea cabe destacar la incorporación de antioxidantes naturales. Además también se han incorporado las flores como alimentos. Por ello el presente proyecto se centra en el estudio de la capacidad antioxidante de pétalos de rosas de diferentes colores.

2.1.1. Efectos del oxígeno en el metabolismo: estrés oxidativo

En el metabolismo de todos los seres vivos los procesos redox tienen gran importancia, están involucrados en cadenas de reacciones químicas como la fotosíntesis y la respiración aeróbica.

La **oxidación** es inestable en el metabolismo aeróbico, se trata de una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Estas reacciones pueden producir radicales libres.

Un **radical libre** es una molécula (orgánica o inorgánica), en general extremadamente inestable y, por tanto, con gran poder reactivo. Se forman por el contacto con el oxígeno y actúan alterando las membranas celulares y atacando los compuestos que se hallan en las células (lípidos, proteína y ADN).No obstante, el organismo tiene sus propios mecanismos de defensa para hacer frente a la acción de las especies oxidantes.

Los **antioxidantes** pueden inhibir las reacciones en cadena que dañan las células oxidándose ellas mismas. En determinadas situaciones las defensas antioxidantes pueden verse desbordadas por la excesiva generación de especies reactivas del oxígeno. Éste desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como **estrés oxidativo**, el cual está asociado a numerosas enfermedades y al proceso normal de envejecimiento [Lee et al., 2004]

La dieta juega un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos de origen vegetal. Entre ellos, las vitaminas hidrosolubles y liposolubles, carotenoides y una gran variedad de compuestos fenólicos, cuya actividad antioxidante y potenciales efectos beneficiosos están siendo ampliamente investigados en los últimos años [Lampe, 1999; Prior, 2003].

Así, las evidencias epidemiológicas que asocian el consumo de vegetales y frutas con una menor incidencia de enfermedades crónicas, junto con la mayor preocupación de los consumidores por mantener un buen estado de salud, está llevando a las industrias alimentarias a diseñar alimentos funcionales que supongan un aporte extra de estos antioxidantes naturales.

2.1.2. Especies reactivas del oxígeno y radicales libres.

Una **especie oxidante** es aquella capaz de aceptar electrones de modo que va a generar un desequilibrio electrónico en las moléculas vecinas.

El término antioxidante hace referencia a cualquier sustancia que, estando presente a una concentración baja comparada con la de un sustrato oxidable, es capaz de retrasar o prevenir la oxidación de dicho sustrato.

Los **radicales libres** se definen como especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, lo cual las hace altamente inestables y reactivas. Para estabilizarse reaccionarán rápidamente con moléculas adyacentes mediante reacciones de oxido-reducción.

El termino especies reactivas del oxígeno (ROS) (Tabla 2) es un término colectivo que incluye radicales libres y ciertas especies no radicales que son oxidantes y/o se convierten fácilmente en radicales libres, como por ejemplo HClO, HBrO, O_3, $ONOO^-$, O_2, o H_2O_2.

Tabla 2. *Nomenclatura de las principales especies reactivas del oxígeno (ROS) [Extraída de Halliwell y Whiteman (2004) con modificaciones]*

Radicales		No radicales	
Nombre	Formula	Nombre	Formula
Hidroxilo	·OH	Peróxidos orgánicos	ROOH
Alcoxilo	RO·	Oxígeno molecular	O_2
Hidroperoxilo	HOO·	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Superóxido	O2-·	Ácido hipocloroso	HClO
Peroxilo	ROO·	Ácido nitroso	HNO_2
Óxido nítrico	NO·	Catión nitrilo	NO_2+
Dióxido de nitrógeno	NO_2·	Peroxinitrito	ONOO-
Ozono	O_3	Ácido peroxinitroso	ONOOH

Generación in vivo de especies reactivas y mecanismos de defensa antioxidante.

Aunque ciertas condiciones ambientales favorecen la formación de especies reactivas y radicales libres, los procesos fisiológicos normales del organismo generan *per se* cierta tasa de estas sustancias oxidantes [Lee et al., 2004]. Las principales fuentes endógenas de especies oxidantes y radicales libres en el organismo son:

- Generación de especies reactivas durante la respiración mitocondrial. En la formación de adenin-trifosfato (ATP) a través del metabolismo oxidativo y transporte electrónico mitocondrial el O_2 se reduce normalmente hasta agua, siguiendo la vía tetravalente.

  Así, el O_2 se reduce en 4 etapas y en cada una de las cuales se transfiere un electrón. Sin embargo, el transporte electrónico mitocondrial es imperfecto y la reducción monoelectrónica del oxígeno genera O_2^-·.

  La dismutación espontánea y enzimática del O_2^-· da lugar a la formación de H_2O_2, y tanto el O_2^-· como el H_2O_2, pueden generar radicales ·OH a través de reacciones tipo Fenton catalizadas por metales de transición.

  De este modo, se estima que en condiciones fisiológicas normales entre el 1 y el 3% del oxígeno consumido por el organismo no llega a formar agua y acaba generando radicales libres y ROS.

- Reacciones en cadena de peroxidación lipídica. Los radicales libres y otras especies reactivas son capaces de extraer un átomo de

hidrógeno de un ácido graso saturado generando un radical lipídico (R·), el cual puede reaccionar con O_2 dando lugar a un radical peroxilo (ROO·).

Los radicales peroxilo contribuyen a la propagación de las reacciones en cadena de peroxidación lipídica sustrayendo átomos de hidrógeno de otros ácidos grasos insaturados cercanos, generando así nuevos radicales lipídicos (R·) y hidroperóxidos lipídicos (ROOH). Estos últimos se descomponen en radicales alcoxilo (RO·) y peroxilo (ROO·) contribuyendo a la propagación del daño oxidativo.

Esta descomposición se ve facilitada por la exposición a luz ultravioleta o por la presencia de iones metálicos, a través de reacciones tipo Fenton. Así, metales de transición tales como el hierro y el cobre son capaces de acelerar la iniciación y propagación del proceso de peroxidación lipídica.

Es evidente que los procesos que generan especies reactivas y radicales libres *in vivo* son muy diversos. Para contrarrestar los efectos nocivos de las especies reactivas el organismo posee sus propios mecanismos de defensa antioxidante, integrados por sistemas enzimáticos y no enzimáticos.

En investigación, la medida de la actividad antioxidante total de un alimento o una muestra biológica aporta información valiosa sobre procesos de adición y sinergia que se producen como consecuencia de interacciones entre distintas moléculas bioactivas en la matriz de la muestra analizada. Estos procesos dan lugar, por lo general, a una actividad antioxidante total mayor que la correspondiente a la suma de las actividades de los antioxidantes individuales que la componen, lo cual nos dará una aproximación más real al efecto potencial que podría ejercer *in vivo* un alimento rico en sustancias antioxidantes [Liu 2003].

2.1.3. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas.

Entre otras, intervienen en el crecimiento y reproducción de las plantas y en procesos defensivos frente a patógenos, predadores o incluso radiación ultravioleta.

Los compuestos fenólicos presentan un anillo benceno hidroxilado como elemento común en sus estructuras moleculares, las cuales pueden incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. [Martínez-Valverde et al., 2000].

Aunque existe una gran variedad de compuestos fenólicos en las plantas (se conocen más de 8000), la mayor parte de ellos tienen como origen metabólico común la ruta del ácido siquímico (Ácido (3R,4S,5R)-3,4,5-trihidroxi-1-ciclohexen-1-carboxílico) y el metabolismo de los fenilpropanoides [Robards et al., 1999].

Los fenilpropanoides simples poseen un esqueleto básico de 9 carbonos (C6-C3) y derivan de los aminoácidos fenilalanina y tirosina producidos en la ruta del ácido siquímico. Las distintas familias de compuestos fenólicos se caracterizan principalmente por el número de átomos de carbono de su esqueleto básico molecular.

- Ácidos cinámicos (C6-C3)
- Ácidos benzoicos (C6-C1 o C6-C2)
- Flavonoides (C6-C3-C6)
- Proantocianidinas o taninos condensados ((C6-C3-C6)n)
- Estilbenos (C6-C2-C6)
- Cumarinas (C6-C3)
- Lignanos (C6-C3-C3-C6)
- Ligninas ((C6-C3)n)

Así, los compuestos fenólicos comprenden desde moléculas simples como los ácidos benzoicos hasta polímeros complejos como las ligninas.

Dentro de cada familia, el número de compuestos fenólicos existentes será más o menos variado. Por ejemplo, se conocen más 4000 flavonoides diferentes, distribuidos en varias subfamilias. Los compuestos fenólicos están presentes en todo el reino vegetal y sus cantidades y tipos varían en función de la especie vegetal y variedad, parte de la planta considerada (frutos, semillas, hojas, tallos, etc.), horas de exposición solar, grado de madurez, condiciones de cultivo, procesado y almacenamiento, etc.

En los alimentos, los compuestos fenólicos habitualmente se presentan conjugados con azúcares como la glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, o los ácidos glucurónico y galacturónico. También pueden unirse a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas y lípidos.

En la actualidad este grupo de compuestos de origen vegetal presenta gran interés nutricional por su contribución al mantenimiento de la salud humana.

De hecho, desde 1990, varias organizaciones internacionales en el ámbito de la nutrición recomiendan un consumo diario de al menos 5 raciones de frutas y/o verduras para asegurar una adecuada ingesta de antioxidantes y prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo [World Health Organization 1990; World Cancer Research Foundation and American Institute for Cancer Research 1997].

Así, muchos de los efectos beneficiosos asociados al consumo de alimentos de origen vegetal se atribuyen en gran medida a los compuestos fenólicos [Manach et al., 2004].

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye a su facilidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre y a la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático.

Los compuestos fenólicos poseen además una estructura química ideal para captar iones metálicos (principalmente hierro y cobre) y por tanto para inhibir la formación de radicales libres a través de reacciones tipo Fenton [Rice-Evans et al.,1997].

Además de las propiedades antioxidantes, a estos compuestos se les atribuyen actividades biológicas beneficiosas para salud.

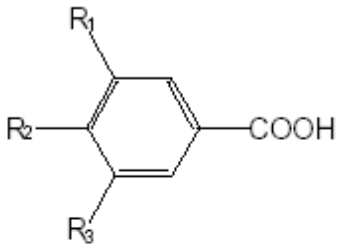
Entre estas destacan sus efectos vasodilatadores, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, bactericidas, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, antivirales, inhibidores de enzimas prooxidantes.

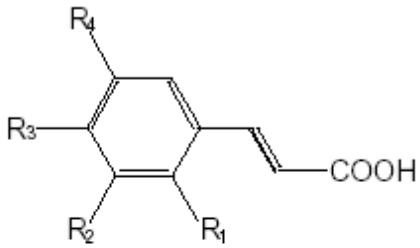
Se describen brevemente los principales grupos de compuestos fenólicos. Se tratan además, aspectos relevantes de los compuestos fenólicos como su biodisponibilidad, metabolismo y actividad antioxidante:

Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos (Figura 1) son abundantes en los alimentos. Los más frecuentes son el ácido cafeico, y en menor medida el ácido ferúlico, que se encuentra asociado a la fibra dietética mediante la formación de enlaces éster con la hemicelulosa. El ácido cafeico también se encuentra esterificado, principalmente con el ácido quínico, dando lugar al ácido clorogénico (ácido 5-cafeilquínico), que está presente en el café, y en muchas frutas y verduras.

Se pueden diferenciar dos grupos principales de ácidos fenólicos, los ácidos benzoicos y los ácidos cinámicos.





Ácidos benzoicos

Ácido	R_1	R_2	R_3
Gálico	OH	OH	OH
Protocatecuico	H	OH	OH
Vaníllico	H	OH	OCH_3
Siríngico	OCH_3	OH	OCH_3

Ácidos cinámicos

Ácido	R_1	R_2	R_3	R_4
Ferúlico	H	H	OH	OCH_3
p-cumárico	H	H	OH	H
Cafeico	H	H	OH	OH
Sinápico	H	OCH_3	OH	OCH_3

Figura 1. *Estructura química de los principales ácidos fenólicos [www.google.es]*

Los ácidos benzoicos o derivados del ácido hidroxibenzoico, tienen una estructura básica C6-C1. Los principales son los ácidos gálico, salicílico, *p*-hidroxibenzoico, protocatécuico, vanílico y siríngico, estos cuatro últimos se consideran universales ya que forman parte de las ligninas.

Generalmente se presentan de forma conjugada en los vegetales, aunque pueden ser detectados en forma libre en algunas frutas o tras su liberación como consecuencia del procesado. El ácido gálico se puede encontrar conjugado como tal o como sus dímeros (ácido elágico), trímeros (ácido tergálico) o tetrámeros (ácido galágico), los dos últimos menos frecuentes.

Los ácidos gálico y elágico son componentes esenciales de los taninos hidrolizables, como por ejemplo los elagitaninos de fresas, frambuesas y zarzamoras. Generalmente los contenidos en estos ácidos son bajos a excepción de las frutas rojas [Manach et al., 2004].

Los ácidos cinámicos o derivados del ácido hidroxicinámico, están ampliamente distribuidos como conjugados en materias vegetales, incluyendo muchos alimentos y bebidas.

Entre ellas, las frutas rojas constituyen una fuente significativa de estos compuestos. Salvo en el caso de alimentos procesados, raramente se encuentran como ácidos libres y de forma predominante aparecen esterificados con ácido quínico, tartárico o glucosa.

Los más comunes son los ácidos cafeico, ferúlico, sinápico y *p*-cumárico. Uno de los conjugados más frecuentes en frutas es el ácido clorogénico, que resulta de la esterificación de los ácidos cafeico y quínico. Así, el ácido cafeico, libre o esterificado, constituye el ácido fenólico más abundante en muchas frutas [Manach et al., 2004].

Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables resultan de la esterificación de los ácidos gálico y elágico (Figura 2). Se distinguen 2 grupos principales; los galotaninos, que son frecuentes en frutas como el mango, y los elagitaninos, característicos de frutas rojas como las fresas, frambuesas y zarzamoras.

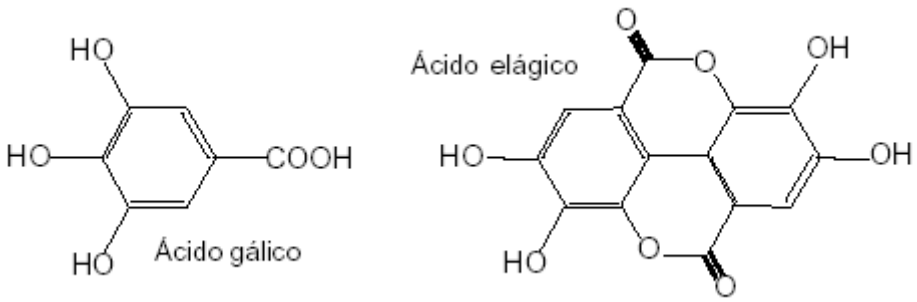


Figura 2. *Estructura química de los ácidos gálico y elágico [www.google.es]*

El procesado incrementa el contenido en ácido elágico libre llegando en torno al doble del contenido presente en la fruta fresca [Amakura et al., 2000].

Flavonoides

Los flavonoides constituyen el grupo de compuestos fenólicos más diverso y ampliamente distribuido en las plantas.

Las estructuras básicas de los principales grupos flavonoides (flavanona, dihidroflavanol, flavonol, flavona, antocianidina y flavanol), son expuestas en la (Figura 3) junto con ejemplos de cada uno. Las diferencias entre grupos se halla establecida por el grado de aromaticidad, el ordenamiento y el número de hidroxilos sustitutos, así como la extensión y tipo de glicosilación de estos grupos.

Su estructura básica (flaván) consta de dos grupos fenilo (A y B) unidos por un puente de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico oxigenado (anillo C) (Figura 3) [Manach et al., 2004]. En función de los grados de oxidación e insaturación del anillo heterocíclico se pueden diferenciar varias clases de flavonoides y dentro de cada clase se pueden establecer diferencias en base a la naturaleza y número de los sustituyentes unidos a los anillos.

Los flavonoides se encuentran a menudo hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' y 5'. La presencia o ausencia de un grupo hidroxilo unido a la posición 3 determina la subdivisión en las dos clases principales de flavonoides;

- los 3-hidroxiflavonoides (flavanoles, flavonoles, flavanonoles, flavan-3,4-dioles o leucoantocianidinas, antocianidinas, proantocianidinas o taninos condensados).
- los flavonoides no hidroxilados en posición 3 (flavonas, isoflavonas, flavanonas).

La mayoría de los tejidos de la planta pueden sintetizar flavonoides, los cuales se presentan en forma de glicósidos solubles en agua en las hojas y frutas empleadas en la alimentación humana.

Las agliconas de los flavonoles y flavonas no se encuentran en el vegetal fresco pero pueden presentarse como consecuencia del procesado. Los azúcares predominantemente se unen al núcleo del flavonoide mediante enlace β-glicosídico, preferentemente en posición 3, aunque las uniones se pueden producir en otras posiciones.

Se han identificado más de 80 azúcares diferentes unidos a los flavonoides; monosacáridos, disacáridos, trisacáridos e incluso tetrasacáridos [Hollman y Arts 2000]. Los azúcares más comunes son glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, xilosa y ácido glucurónico [Manach et al., 2004].

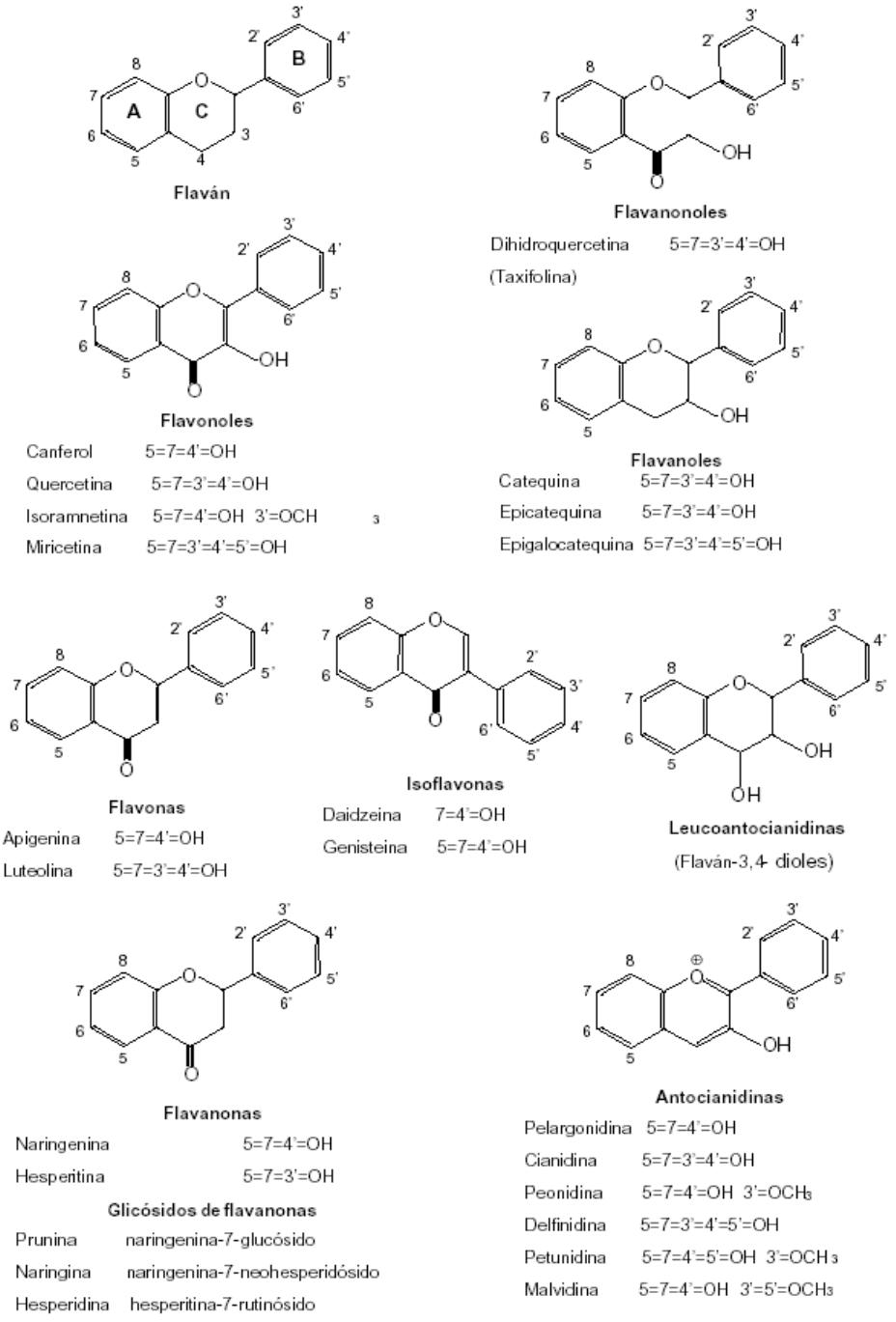


Figura 3. *Estructura química de los flavonoides [www.google.es]*

Los principales flavonoles son: quercetina, kaemferon, myrcetina e isoramnetina [Hollman y Arts 2000] y algunos de sus glicósidos son la rutina (quercetina-3-Oramnosilglucósido) y la hiperina (quercetina-3-O-β-D-galactopiranósido) [Robards et al., 1999]. Las principales fuentes de estos flavonoides son frutas y verduras. Los mayores niveles de quercetina se encuentran en las cebollas (280- 490 mg/Kg de porción comestible).

Entre los zumos, el de uva contiene 4.4 mg/L de quercetina y 6.2 de kaemferol y el de naranja 5.7 mg/L de quercetina. El vino tinto 8.3 mg/L de quercetina y 8 mg/L de kaemferol y el té negro 15-17 mg/L de quercetina, 14-16 mg/L de kaemferol y 3 mg/L de myrcetina [Hollman y Arts 2000].

Los flavanoles predominantes son la catequina y su isómero epicatequina, la galocatequina y su isómero epigalocatequina, y los ésteres con ácido gálico en posición 3 como el galato de epicatequina y el galato de epigalocatequina. Los flavanoles glicosilados son poco frecuentes.

Algunas fuentes de flavanoles en la dieta son el té, las frutas y las legumbres. Los vinos tintos alcanzan contenidos de 208 mg/L de catequina y entre 15 y 88 mg/L de epicatequina [Hollman y Arts 2000].

El estudio del proyecto se centrará en gran parte en las antocianinas que son pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos. [Wagner,GJ.1982]

Las **antocianinas** pertenecen al grupo de los flavonoides y son glicósidos de las antocianidinas, es decir, las antocianidinas se encuentran unidas (por medio de un enlace glucosídico) a azúcares dando lugar a los antocianos o antocianinas. [Wong, D.1995]

Las **antocianidinas** son derivados de oxhidrilados y metoxilados del ión flavilio. [Primo, E. 1995]

Por hidrólisis con ácido clorhídrico diluido, las antocianidinas dan cloruro de antocianidina y azúcares.[Primo, E. 1995]

En los alimentos son seis las antocianidinas más comunes; cianidina, delfinidina, peonidina, pelargonidina, petunidina y malvidina.

La combinación de éstas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas. [Badui, S. 1999]

Los azúcares más comunes son; glucosa, galactosa, ramnosa y arabinosa, normalmente unidos a la posición 3 o a las posiciones 3 y 5, generando diglicósidos.

La presencia de grupos oxhidrilos en las posiciones 3, 5 y 7 es una característica común en todas ellas; entre sí se diferencian por el número de grupos oxhidrilos presentes en el radical fenilo. La metilación de alguno de estos grupos da lugar a otras antocianidinas.

Como se muestra en la siguiente tabla, el grupo fenilo en la posición 2 puede llevar diferentes sustituyentes.

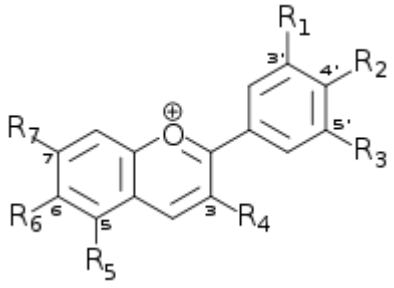


Figura 4. *Estructura química de las antocianidinas [www.google.es]*

Tabla 3. *Clasificación de antocianidinas [International Union of Pure and Applied Chemistry IUPAC Goldbook.]*

Antocianidina	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7
Aurantinidina	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-OH
Capensinidina	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	-H	-OH
Cianidina	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Delfinidina	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Europinidina	$-OCH_3$	-OH	-OH	-OH	$-OCH_3$	-H	-OH
Luteolinidina	-OH	-OH	-H	-H	- OH	-H	-OH
Pelargonidina	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Malvidina	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	-OH	-OH	-H	-OH
Peonidina	$-OCH_3$	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Petunidina	-OH	-OH	$-OCH_3$	-OH	-OH	-H	-OH
Rosinidina	$-OCH_3$	-OH	-H	-OH	-OH	-H	$-OCH_3$

Los antocianos son solubles en agua e insolubles en éter, benceno o cloroformo, siendo compuestos iónicos.

Para aislar el pigmento se el material vegetal con una solución alcohólica; por adición de éter al extracto, se precipita el cloruro de antocianina.

Al elevar el pH, las antocianidinas cambian su estructura electrónica, pasando primero por la forma equinoidea y luego, a un ión fenato de dicha forma. [Primo, E. 1995]

Los cambios de coloración que sufren las antocianinas según el pH del medio, a causa de reajustes electrónicos en su molécula, justifican la gran variedad de colores que se dan en las flores y frutos a pesar de ser muy reducido en número de antocianidinas existentes. Así, el colorante de la *rosa roja* es la misma antocianina que está en la *centaura azul.* La diferencia de color se debe al distinto pH en ambos pétalos. Además, el color es el resultado de una mezcla, más o menos compleja, de diferentes colorantes. [Primo, E. 1995]

2.1.4. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos.

En el campo de la alimentación, los antioxidantes tienen una doble vertiente.

Sirven para retrasar la oxidación de los alimentos, es decir, para aumentar su vida útil. El uso de antioxidantes naturales puede facilitar la eliminación de antioxidantes de origen sintético.

Además en el presente proyecto se podrían usar como colorantes naturales en los alimentos.

Por otra parte, los antioxidantes que permanezcan como tales cuando se ingieren podrían tener propiedades beneficiosas para la salud.

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se ve determinada por su estructura química, por lo que existen grandes diferencias en la efectividad como antioxidantes entre los distintos grupos de compuestos.

Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos principales [Rice-Evans et al., 1997]

Como antirradicalarios.

Los compuestos fenólicos pueden actuar como donantes de hidrógeno o electrones en reacciones de terminación que rompen el ciclo de generación de nuevos radicales libres, anticipando las reacciones de terminación. El radical fenoxilo generado es menos reactivo ya que se estabiliza por resonancia con los electrones π del anillo aromático. Así, las características estructurales que determinan la capacidad de los compuestos fenólicos para captar radicales son:

- La presencia de dos grupos hidroxilo en posición orto (3', 4') en el anillo B (e.j. quercetina, catequina).
- La presencia de dos grupos hidroxilo en posición meta (5, 7) en el anillo A (e.j. canferol).
- La presencia en el anillo del doble enlace entre los carbonos 2 y 3 y, junto con el grupo 4-ceto (e.j. quercetina). Estas estructuras son importantes para la deslocalización de electrones y estabilización del radical fenoxilo, siempre que además estén presentes los dos orto-hidroxilo en el anillo B.

Como quelantes de metales.

Esta acción requiere la presencia de grupos hidroxilos cercanos en el anillo aromático. De este modo, los o-dihidroxifenoles son secuestradores efectivos de iones metálicos e inhiben la generación de radicales libres por la reacción de Fenton. Generalmente, los siguientes grupos funcionales se consideran importantes para la actividad quelante de metales [Kokhar y Apenten 2003]:

La presencia de grupos hidroxilo en posición orto (e.j. 3'-4' o 7-8).

La presencia del grupo 4-ceto y grupos hidroxilo en posición 5 y/o 3 (e.j. quercetina).

La presencia de un gran número de grupos hidroxilo (e.j. ácido tánico).

2.1.5. Biodisponibilidad de compuestos fenólicos

Los efectos beneficiosos derivados del consumo de compuestos fenólicos dependen de la cantidad consumida y de su biodisponibilidad. La gran variedad estructural de los compuestos fenólicos, así como la influencia de factores genéticos, agronómicos, del procesado y almacenamiento sobre sus niveles en los alimentos, hace difícil estimar con exactitud la ingesta de compuestos fenólicos en la dieta [Duthie et al., 2003].

Se estima que la ingesta aditiva de flavonoles, flavanonas, flavanoles e isoflavonas en las sociedades occidentales es de 100-150 mg/día.

A estas cantidades habría que añadir una ingesta variable de ácidos hidroxicinámicos, antocianos y proantocianidinas, aportada principalmente

por café, té, bayas y vino. Así, la ingesta total de compuestos fenólicos probablemente alcanza 1 g/día en personas que ingieran varias raciones de fruta y verdura al día [Manach et al., 2004].

2.1.6. Diseño de alimentos funcionales con efecto antioxidante

Debido a que ocurre a través de una serie de reacciones concatenadas, la autooxidación de lípidos resulta muy complicada. La complejidad del proceso obliga a sustituir para su estudio los alimentos por sistemas modelos (como en el presente proyecto), por ejemplo un ácido graso insaturado o un intermediario de su oxidación o transformado en condiciones definidas.

Con tales sistemas modelos se ha comprobado que la velocidad de autooxidación depende de la composición en ácidos grasos, de la concentración y actividad de los pro y antioxidantes, de la presión parcial de oxigeno, de la superficie que entra en contacto con el oxigeno y de las condiciones en las que se almacena el alimento (temperatura, luz, contenido acuoso). Como consecuencia, ocurre de dos modos diversos.

El caso límite 1 de la Figura 5 demuestra la situación frecuente en los alimentos: después de un cierto tiempo de almacenamiento pueden detectarse los primeros productos de la oxidación. Una vez pasado el periodo de inducción, aumenta, y esto es típico del proceso de autooxidación, la velocidad de reacción en relación con el tiempo. En muchos alimentos la concentración de prooxidantes es relativamente grande. Correspondería al caso límite 2, en el que no hay periodo de incubación. [H.D.Belitz, W. Grosch. 2002]

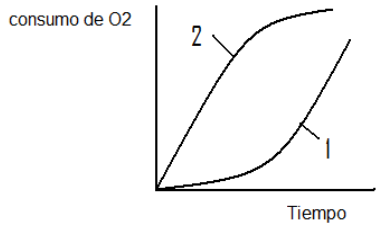


Figura 5. *Representación del consumo de oxígeno en alimentos [H.D.Belitz, W. Grosch. 2002]*

En los últimos años se ha incrementado el interés por parte de las industrias alimentarias y los consumidores por el concepto de alimento funcional.

Así, con un consumidor cada vez más interesado en alimentos más saludables y una industria alimentaria que ha comprendido la potencialidad del mercado de los alimentos funcionales, se ha iniciado a nivel mundial una intensa actividad investigadora en el área de estos ”novel food”.

El término alimento funcional hace referencia a alimentos o ingredientes que mejoran el estado general de salud y/o reducen el riesgo de enfermedad [Rafter 2002].

Se trata además de productos alimenticios que deben consumirse dentro de la dieta habitual para conseguir efectos beneficiosos que van más allá de los requerimientos nutricionales tradicionales [Roberfroid 2002].

Un alimento puede hacerse funcional siguiendo alguna de las siguientes estrategias o sus combinaciones [Roberfroid 2000; 2002]:

Eliminar componentes perjudiciales presentes en el alimento (e.j. alergenos).

Incrementar la concentración de un componente presente de forma natural en el alimento hasta unos niveles en que pueda inducir los beneficios esperados o incrementar la concentración de una sustancia no nutritiva hasta niveles en que esta demostrado su efecto beneficioso.

Añadir un componente que no está presente de forma natural en el alimento y que no es necesariamente un macronutriente o un micronutriente, pero cuyos efectos beneficiosos son reconocidos (e.j. prebióticos, antioxidantes no vitamínicos).

Sustituir un componente, generalmente un macronutriente (e.j. grasas), cuyo consumo excesivo tenga efectos perjudiciales por un componente de reconocido efecto beneficioso (ej. inulina).

Incrementar la biodisponibilidad o estabilidad de un componente que se sepa que es capaz de producir un efecto funcional o reducir un potencial riesgo de enfermedad del propio alimento.

Estos efectos beneficiosos deben demostrarse científicamente con el objetivo de validar sus efectos y para poder aprobar las declaraciones nutricionales en su etiqueta [Roberfroid 2002].

En el año 2005 se publicó un documento en el que se establecen los criterios consensuados para la evaluación del apoyo científico a las declaraciones nutricionales relacionadas con la salud de los alimentos funcionales (PASSCLAIM) [Aggett et al., 2005].

A continuación se recogen una serie de dichos criterios:

1. El alimento o componente del alimento al cual se atribuye el efecto beneficioso debe ser caracterizado.
2. La comprobación de una declaración nutricional debe estar basada principalmente en datos obtenidos en estudios de intervención en humanos. El diseño de los estudios de intervención debe incluir las siguientes consideraciones:
    - Los grupos de estudio deben ser representativos de la población a la cual va destinado en alimento funcional.
    - Deben establecerse unos grupos control adecuados.
    - La duración de la intervención y el seguimiento deben ser adecuados para demostrar el efecto propuesto.

- Debe caracterizarse la dieta habitual de los participantes así como los aspectos más relevantes de sus hábitos de vida.
- La cantidad de alimento o componente activo debe ser consecuente con el modo propuesto de consumo.
- Ha de tenerse en cuenta el efecto de la matriz del alimento así como el contexto dietético del efecto funcional del componente activo.
- Se ha de comprobar de la conformidad con la ingesta del alimento o componente activo bajo examen.
- Ha de considerarse el poder estadístico para el contraste de la hipótesis.

3. Cuando el efecto beneficioso no puede evaluarse de forma directa, los estudios de intervención deben emplear (bio) marcadores. Estos deben ser:
   - Biológicamente válidos. Para ello, su relación con el efecto final y la variabilidad dentro de la población deben ser bien conocidas.
   - Debe ser metodológicamente válido en cuanto a sus características analíticas.
4. En un estudio de intervención, la variable estudiada debe cambiar de un modo estadísticamente significativo y el cambio observado debe ser biológicamente relevante de acuerdo a la declaración nutricional que se pretende apoyar.
5. Una declaración nutricional debe ser comprobada científicamente considerando la totalidad de los datos obtenidos.

Una de las áreas más prometedoras para el desarrollo de alimentos funcionales se fundamenta en la posibilidad de modular los sistemas redox y antioxidante del organismo [Roberfroid 2000].

Por esta razón, en la actualidad muchos alimentos funcionales tienen como finalidad incrementar el aporte de antioxidantes naturales en la dieta.

En este contexto, la adición de extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos ha sido propuesta como una estrategia factible para el desarrollo de alimentos funcionales con una actividad antioxidante incrementada [Larrosa et al., 2002].

De hecho, en el campo del desarrollo de nuevos ingredientes se está produciendo un aumento en la producción de este tipo de extractos vegetales en los cuales los compuestos bioactivos son aislados y concentrados para su uso como suplementos, alimentos nutracéuticos o como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales [Psczcola 2003].

No obstante, una alternativa natural a la adición de estos extractos o del propio compuesto activo previamente aislado podría ser la selección de

materias primas ricas en el principio activo cuyos niveles se desean incrementar.

Como se ha mencionado anteriormente, las frutas rojas y bayas se caracterizan por su elevado contenido en compuestos fenólicos antioxidantes tales como los antocianos, que a su vez les confieren colores atractivos.

Además, existe abundante información en la literatura científica relativa a los niveles de compuestos fenólicos de este tipo de frutas, así como de su actividad antioxidante y de su estabilidad tras el procesado [Wang et al., 1996; Heinonen et al., 1998a; Häkkinen et al., 2000; Zafrilla et al., 2001].

Así, el empleo de estas frutas como ingredientes funcionales en las proporciones adecuadas, podría favorecer el desarrollo de alimentos funcionales ricos en compuestos fenólicos y con una elevada actividad antioxidante.

Además, el hecho de ser elaborados de forma natural a partir de frutas de colores atractivos podría favorecer la aceptación del producto final por parte del consumidor, e incluso se podrían utilizar como potenciales colorantes naturales sin clasificación E.

2.2. Conceptos sobre el color[1]

El presente proyecto se centra en la capacidad antioxidante de siete tipos de pétalos de rosas de distintos colores, por ello se introducen en los siguientes apartados los conceptos básicos sobre la definición, percepción y determinación del color.

2.2.1. La concepción moderna del color

La concepción moderna del color nació con el descubrimiento de la naturaleza espectral de la luz que hizo Isaac Newton en el siglo XVII.

Newton creía que la luz era un flujo de partículas. Sus experimentos con prismas de cristal demostraron que la luz se podía fraccionar en varios colores individuales. Es más, llegó a la conclusión de que las luces de distintos colores tenía diferentes grados de refracción. [Stephen Westland, 2001]

El ojo humano es sensible a una amplia franja de longitudes de onda, situadas entre los 380 y los 780 nanómetros, aproximadamente. El espectro

[1] La información de este apartado está extraída de *[www.gusgsm.com]* dónde Stephen Westland escribió este FAQ para Colourware Ltd., que es la propietaria del copyright de todo el material, escrito, gráfico o de cualquier otro tipo que aparece en este apartado.

Stephen Westland es un reputado especialista en el estudio del color y profesor de Ciencia del Color en la Escuela de Diseño de la Universidad de Leeds (Gran Bretaña), y director de la firma Colour Ware Ltd.

de luz visible o espectro cromático representa sólo una mínima fracción de todo el espectro electromagnético.

Dentro del espectro de luz visible, ciertas longitudes de onda nos causan determinadas sensaciones visuales. Así, por ejemplo, las longitudes de onda más cortas se perciben como colores violetas o azulados.

Cuando la luz alcanza una superficie, pueden pasar dos cosas:

1. Un cambio en el índice de refracción hace que la luz se vea reflejada por la superficie. La luz así reflejada se llama "reflexión especular" (*specular reflection*).
2. La luz no se refleja, sino que penetra en la materia. Sin embargo, al atravesar la superficie, el cambio en el índice de refracción del material atravesado reduce algo la velocidad de la luz, lo que hace que se desvíe (refracción).

La luz puede atravesar por completo un material. En ese caso decimos que ha sido "transmitida".

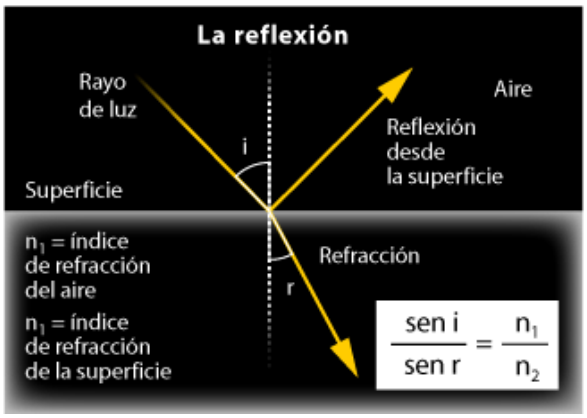


Figura 6. *Reflexión y Refracción [www.gusgsm.com]*

2.2.2. Absorción de la luz

La materia puede absorber la luz debido a una serie de fenómenos que incluyen vibraciones y rotaciones atómicas, efectos de campos ligandos (*ligand-fields*), orbitaciones moleculares y transferencia de cargas.

La energía que las moléculas de una sustancia absorben se puede disipar en forma de energía cinética o calorífica, aunque a veces puede volverse a emitir.

Hay muchas razones por la que las cosas parecen tener color. Para la mayoría de las sustancias físicas, la causa es que sus propiedades de absorción o dispersión son diferentes para las distintas longitudes de onda.

Así, en una sustancia que parezca ser amarilla es debido a que tiene mayor capacidad de absorción en la zona azulada del espectro luminoso y dispersa la luz mejor en las zonas verdes y rojas del mismo.

2.2.3. Tinte y pigmento

Los tintes (*dyes*) y los pigmentos (*pigments*) son componentes químicos responsables de buena parte de los colores en la naturaleza. Se suelen añadir a productos como tejidos o alimentos para que tengan un color deseado.

Los tintes son solubles en la materia a la que se aplican. La consecuencia principal de esto es que tienden a absorber la luz y no a dispersarla. De ese modo, los tonos claros que se ven en los cristales tintados o en los filtros de colores transparentes se deben a tintes.

Un pigmento es una sustancia formada por moléculas que reflejan o transmiten la luz visible, o hacen ambas cosas a la vez. El color de un pigmento depende de la absorción selectiva de ciertas longitudes de onda de la luz y de reflexión de otras.

Por ejemplo, la clorofila, el pigmento de las plantas, absorbe luz en la parte violeta y de la zona naranja a la roja del espectro luminoso. Convierte esta energía luminosa en energía química mediante fotosíntesis y refleja luz en la parte del verde y en la parte del amarillo del espectro. De esta manera, la clorofila parece verde.

En química, los pigmentos son productos naturales o artificiales, insolubles en el agua, que se aplican sobre diversos objetos para recubrirlos de una superficie coloreada, que a la vez nos protege de los agentes exteriores.

Las flores deben su color a dos tipos de pigmentos: pigmentos liposolubles contenidos en los cloroplastos y pigmentos hidrosolubles contenidos en las vacuolas de las células epidérmicas de los pétalos.

Casi todos los tonos azules y púrpuras se deben a pigmentos vacuolares, las antocianinas. Éstos cambian de color en función del grado de acidez o alcalinidad y del tipo de extracto de antocianina.

Los tonos amarillos se deben habitualmente a las flavonas y el color blanco de los pétalos se debe a la presencia de diminutas bolsas de aire entre las células. [González 2009]

2.2.4. El color

El color es algo más que solo una propiedad de las cosas.

La visión en color es consecuencia de la naturaleza del mundo físico, una respuesta fisiológica de la retina al llegar la luz al ojo, y el procesamiento neurológico de esta respuesta retinal en el cerebro.

La luz entra en el ojo a través de la córnea y el iris, atravesando la lente del cristalino antes del alcanzar la retina. Está formada por tres capas de células nerviosas. Sorprendentemente, las células fotosensibles (conocidas como conos y bastones) forman la parte trasera de la retina.

Los bastones y conos contienen pigmentos visuales, que son como los demás pigmentos en el sentido de que absorben la luz dependiendo de la longitud de onda de ésta. Sin embargo, estos pigmentos visuales tienen la particularidad de que cuando un pigmento absorbe un fotón de energía luminosa, la forma molecular cambia y se libera energía.

Los conos son los que proporcionan la visión en color. Hay tres clases de conos. Cada una de ellos contiene un pigmento fotosensible distinto. Los tres pigmentos tienen su capacidad máxima de absorción hacia los 430, 530 y 560 nanómetros de longitud de onda, respectivamente.

Se denominan conos cortos, conos medios y conos largos (por el tipo de longitud de onda al que son sensibles comparativamente) causan la percepción del color violeta, azul verdoso y amarillo verdoso.

La existencia de tres funciones de sensibilidad espectral proporciona la base de la visión en color, ya que cada longitud de onda causará una proporción única de respuestas en los conos sensibles a longitudes cortas, medias y largas.

La teoría más extendida es que las estructuras neuronales retinales y postretinales codifican la información del color en sólo tres clases de señales, a las que se suele llamar canales.

Teoría tricrómica

La existencia de canales para el procesamiento de la información del color ayudan a explicar la teoría tricrómica fue postulada por Young y, posteriormente por Helmholtz.

Se basaba en los experimentos de identificación y correspondencia de colores realizados por Maxwell. Esas experiencias demostraban que la mayoría de los colores se podían igualar superponiendo tres fuentes de luz separadas conocidas como (colores) primarios, un proceso conocido como mezcla aditiva.

La teoría del color Young-Helmholtz se formó sobre la idea de que existían tres clases de receptores (aunque no hubo pruebas de ello hasta 1964,

cuando se obtuvo la imagen microscópica de las células cono del ojo). Las raices de la teoría tricrómica se hunden firmemente en la fase receptiva de la visión del color.

La teoría de los procesos opuestos

La teoría de los procesos opuestos de la visión en color, propuesta por Hering, parece contradecir la teoría tricrómica de Young-Helmholtz, y fue propuesta para poder explicar los fenómenos que no se podían explicar adecuadamente con la teoría tricrómica.

Un ejemplo de esos casos son las llamadas imágenes fantasmas o post imágenes que aparecen cuando el ojo recibe un estímulo amarillo que al poco se elimina y queda la sensación de percibir un resto de esas imágenes en azul. Otro es el hecho, contrario a la intuición, de que la mezcla aditiva de luces rojas y verdes de como resultado amarillo y no una especie de verde rojizo.

H. E. Hering propuso que amarillo frente a azul, y rojo frente a verde eran pares de señales opuestas. Esto servía, en cierto modo, para explicar porqué existen psicológicamente cuatro colores primarios: Rojo, verde, amarillo y azul, y no sólo tres.

Además, Hering propuso la existencia de una oposición blanco-negro, pero la versión de la oposición de un canal de luminancia se ha abandonado en las versiones más modernas de la teoría.

En la actualidad, se acepta que la teoría tricrómica y la de los procesos opuestos describen características esenciales de la visión humana en color y que esta segunda teoría describe las cualidades perceptuales de la visión en color que se derivan del procesamiento neurológico de las señales de los receptores en dos canales opuestos y un sólo canal acromático.

Los atributos perceptuales del color

Los atributos perceptuales de brillo, tono y coloración se definen de este modo:

- **Brillo:** Atributo de una sensación visual por la que una zona parece mostrar más o menos luz.
- **Tono:** Atributo de una sensación visual por la que una zona parece similar a una o una proporción de los colores perceptibles como rojo, amarillo, verde y azul.
- **Coloración:** Atributo de una sensación visual por la que una zona parece mostrar más o menos intensidad de tono.

Mezcla de color aditiva

Una mezcla de color aditiva hace referencia a la mezcla de diferentes luces (coloreadas) y se puede demostrar con gran facilidad superponiendo luces (de colores primarios) sobre una pantalla de proyección blanca. Cuando esto se hace usando colores primarios rojo, verde y azul, aparecen los

colores amarillos, cián y magenta allí donde dos de esas luces se superponen.

Cuando los tres primarios se superponen, la sensación que se produce es la del color blanco siempre que la distribución espectral y las intensidades de los tres primarios se hayan elegido con cuidado.

CIE

Las siglas CIE responden al francés Commission Internationale de l'Eclairage, es decir: Comisión Internacional de la Luz.

En 1931, CIE desarrolló un sistema para especificar los estímulos cromáticos basándose en valores triestímulos de tres primarios imaginarios. La base de este sistema fue el llamado observador estándar CIE 1931.

Con el sistema CIE 1931 se introdujeron métodos para caracterizar las fuentes de luz (o iluminantes), las superficies y el funcionamiento del sistema visual humano, cuyo comportamiento se midió mediante funciones de correspondencia de color (algo conocido también como "observador estándar").

Según la teoría tricromática de la visión en color, un observador puede igualar un estímulo de color mediante una mezcla aditiva (es decir: añadiendo) de tres primarios. Por tanto, cualquier estímulo cromático se puede especificar mediante la cantidad de primarios que un observador necesitará para igualar o hacer corresponder ese estímulo.

El observador estándar CIE es el resultado de experimentos en los que se pidió a los sujetos del mismo que establecieran una igualdad entre longitudes de onda monocromáticas con mezclas de los tres primarios aditivos.

De hecho, el observador estándar es una tabla en la que se indica cuánto de cada primario necesita un observador promedio para igualar cada longitud de onda.

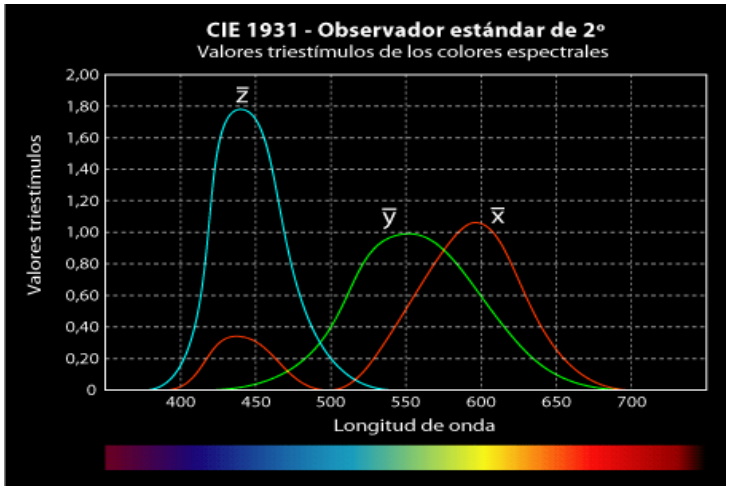


Figura 7. *Observador estándar de 2º. [www.gusgsm.com]*

En el gráfico superior se ven las funciones de correspondencia o igualación de colores (colour matching functions: CMF) para los primarios CIE XYZ. Esas son literalmente las cantidades de los tres primarios que un observador promedio necesitará para igualar una unidad de luz en cada longitud de onda.

Valores triestímulo

Son las cantidades de tres primarios que especifican un estímulo de color. Los valores triestímulos de CIE 1931 se llaman X, Y y Z.

Los valores triestímulos se pueden calcular si el espectro de reflectancia de una muestra de color se conoce. Ese espectro de reflectancia se puede medir usando un espectrofotómetro de reflectancia.

Los valores triestímulos X,Y, y Z se pueden calcular integrando los valores de reflectancia R(λ), las distribuciones de la energía espectral relativa del iluminante E(λ) y las funciones de observadores estándar x(λ), y(λ) y z(λ). La integración se logra aproximando por sumatoria:

$$X = 1/k \, \Sigma \, R(\lambda) \, E(\lambda) \, x(\lambda) \quad (1)$$

$$Y = 1/k \, \Sigma \, R(\lambda) \, E(\lambda) \, y(\lambda) \quad (2)$$

$$Z = 1/k \, \Sigma \, R(\lambda) \, E(\lambda) \, z(\lambda) \quad (3)$$

donde $k = \Sigma \, E(\lambda) \, y(\lambda)$, y λ es la longitud de onda.

El factor de normalización 1/k se introduce para que Y=100 para cualquier muestra que refleje el 100% en todas las longitudes de onda: Hay que recordar que Y es proporcional a la luminancia del estímulo. La introducción de esta normalización es conveniente ya que significa que se pueden usar las distribuciones de energía espectral relativas (y no absolutas), de modo que las unidades en las que se expresen sean irrelevantes.

2.2.5. Determinación del color

Hay dos tipos principales de instrumentos para medir el color de superficies opacas: Espectrofotómetros de reflectancia y colorímetros.

Espectrofotómetro

Los espectrofotómetros de reflectancia miden la cantidad proporcional de luz reflejada por una superficie como una función de las longitudes de onda para producir un espectro de reflectancia. El espectro de reflectancia de una muestra se puede usar, junto con la función del observador estándar CIE y la distribución relativa de energía espectral de un iluminante para calcular los valores triestímulos CIE XYZ para esa muestra bajo ese iluminante.

Las cuatro geometrías estándares establecidas por CIE son:

1) Iluminación difusa y toma de la luz en la normal (D/0).

2) Iluminación en la normal y toma de la luz difusa (0/D).

3) Iluminación a 45º y toma de la luz en la normal (45/0)

4) Iluminación en la normal y toma de la luz a 45º (0/45).

Colorímetro

Los colorímetros miden valores triestímulos más directamente que los espectrofotómetros y funcionan basándose en filtros de color. Por eso, los colorímetros no proporcionar datos de reflectancia espectral.

Sin embargo, muchas veces son preferibles a los espectrofotómetros debido a que son comparativamente más baratos de fabricar y fáciles de transportar.

Coordenadas de cromaticidad

A menudo es necesaria una interpretación intuitiva de la especificación de colores en términos de valores triestímulos. Esta es una de las razones por la que a menudo se transforma un espacio de color tridimensional definido por X, Y y Z en un diagrama de cromaticidad donde se pueden posicionar colores dados.

Las subsiguientes coordenadas de cromaticidad (chromaticity coordinates) x, y y z para ese diagrama se obtienen calculando los componentes fraccionarios de los valores triestímulos.

Así:

$$x = X / (X + Y + Z),\ y = Y / (X + Y + Z),\ y\ z = Z / (X + Y + Z) \qquad (4)$$

Como, por definición, x + y + z siempre es igual a 1, si sabemos dos de las coordenadas de cromaticidad, la tercera es redundante.

De este modo, todas las combinaciones posibles de valores triestímulos se pueden representar en un mapa bidimensional de sólo dos de las coordenadas de cromaticidad. Es sólo por convención que para ello se suelan usar las coordenadas x e y.

Al diagrama así obtenido se le suele llamar 'diagrama de cromaticidad' (*chromaticity diagram*). Con todo, el uso de diagramas de cromaticidad no ha permitido comprimir y transformar datos tridimensionales en datos bidimensionales, por ejemplo: Tomemos dos muestras de color A y B con los valores: A: X=10, Y=20, Z=30 y B: X=20, Y=40, Z=60.

En este caso, las muestras tendrán coordenadas de cromaticidad idénticas pero provendrán de valores triestímulos distintos. La diferencia entre ambas muestras está en su luminancia y posiblemente B se vea más brillante que A cuando ambas estén juntas.

Es por esto por lo que una especificación completa mediante coordenadas de cromaticidad necesite de dos coordenadas de cromaticidad y uno de los valores triestímulos.

*Espacio de color CIE L*a*b**

Hay dos problemas especialmente obvios en la especificación de colores en términos de valores triestímulos y espacio cromático.

1. Esa especificación de los colores no es fácilmente interpretable en términos de dimensiones psicofísicas de percepción del color; es decir, brillo, tono y coloración.
2. El sistema XYZ y los diagramas de cromaticidad asociados no son perceptualmente uniformes.

El segundo problema dificulta el cálculo de las diferencias entre dos estímulos de color. La necesidad de un espacio de color uniforme condujo a la transformación de una serie de transformaciones no lineales del espacio CIE XYZ 1931 que concluyeron en la especificación concreta de una de estas transformaciones en lo que se conoce como espacio de color CIE 1976 (L*a*b*).

De hecho, en 1976, CIE especificó dos espacios de color. Uno era para colores emitidos (*self-luminous*) y otro para colores en superficies. Las notas que ves aquí tratan sobre todo de esté último, al que conocemos como espacio de color CIE 1976 (L*a*b*) o CIELAB.

El espacio CIELAB permite especificar estímulos de color en un espacio tridimensional. El eje *L es el de luminosidad (*lightness*) y va de (negro) a 100 (blanco). Los otros dos ejes de coordenadas son a* y b*, y representan variación entre rojizo-verdoso, y amarillento-azulado, respectivamente. Aquellos casos en los que a* = b* = 0 son acromáticos; por eso el eje *L representa la escala acromática de grises que va de blanco a negro.

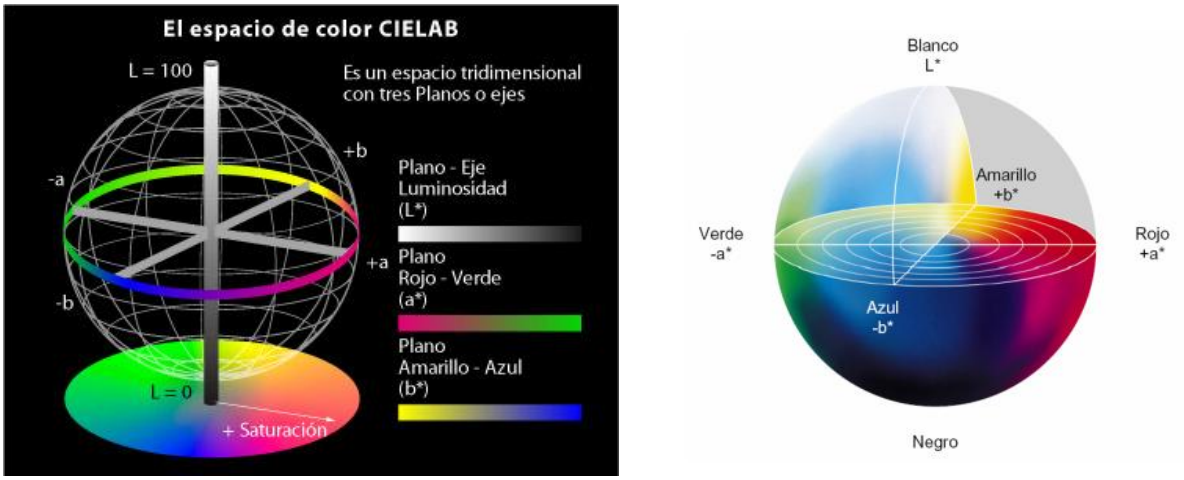


Figura 8. *Espacio de color CIELAB [www.gusgsm.com][www.fotodos.com]*

Las proporciones de L*, a* y b* se obtienen de los valores triestímulos de acuerdo con las siguientes transformaciones:

$$L^* = 116(Y/Yn)1/3 -16, Yn)1/3] \quad (5)$$

$$a^* = 500[(X/Xn)1/3 - (Y/ Yn)1/3] \quad (6)$$

$$b^* = 200[(Y/Yn)1/3 - (Z/ Zn)1/3] \quad (7)$$

Donde Xn, Yn, and Zn son los respectivos valores de X, Y y Z con el iluminante que se haya usado para obtener los valores X, Y y Z de la muestra; y los cocientes de X/Xn, Y/Yn y Z/Zn son todos superiores a 0,008856 (cuando alguno de ellos es menor a esa cifra, se usa un conjunto de ecuaciones levemente distinto).

El espacio CIELAB es el más completo especificado por la Comisión Internacional de Iluminación (*Comisión internationale de l'éclairage , de ahí su CIEun initialism*). En él se describen todos los colores visibles al ojo humano.

2.3. Las rosas

2.3.1. Introducción

En la actualidad las flores están formando parte de nuestra alimentación, son hoy una moda vanguardista. En países como China, Méjico, Brasil etc. han mantenido estos condimentos en la cocina tradicional, por sus cualidades medicinales y propiedades saludables.[Kumar, N; Bhandari, 2009]

El uso culinario de las flores ofrece color, aroma y sabor a los platos, estimulan los sentidos. Las flores aportan al organismo nutrientes, son ricas en proteínas, almidones, aminoácidos, vitaminas y elementos minerales, además contienen considerable cantidad de compuestos activos antioxidantes.

Las rosas y las flores amarillas de la calabaza son las más conocidas, así como las amapolas, claveles, azahares, crisantemos, malvas, pensamientos, jazmín, gladiolos, salvia o violetas. Pero sin lugar a dudas, el referente dentro de la cocina con flores es la rosa, por su sabor dulce y su olor inconfundible.

2.3.2. Anatomía de las flores

La flor es la estructura reproductiva de las plantas llamadas espermatofitas o fanerógamas. La función de una flor es producir semillas a través de la reproducción sexual. Para las plantas, las semillas son la próxima generación, y sirven como el principal medio a través del cual las especies se perpetúan y se propagan.

Constan de un pedúnculo con un ensanchamiento en la parte superior (receptáculo floral) en donde se asientan las piezas florales: cáliz, corola, androceo y gineceo.

El cáliz es la envoltura más exterior. Está formada por unas hojas recias y generalmente de color verde, llamados sépalos, cuya misión es proteger a la flor al principio de su desarrollo.

La corola está formada por unas láminas finas y coloreadas llamadas pétalos, la misión de los cuales consiste en atraer a los insectos necesarios para la fecundación. El conjunto de estos dos elementos, cáliz y corola, que no tienen ningún papel directo en la reproducción, lleva el nombre de periantio. A veces, todas las partes del periantio parecen similares, recibiendo entonces el nombre de tépalos. El aparato reproductor masculino de la flor, el androceo, está formado por los estambres.

Cada estambre, está formado a su vez por una parte alargada de altura variable, el filamento, que termina en una zona abultada, denominada antera, en donde se encuentran los granos de polen.

El gineceo es el aparato reproductor femenino y está constituido por los carpelos. Cada flor puede contener un solo carpelo o varios. Cada uno de ellos es una hoja transformada plegada a lo largo de su nervio central, y con los bordes soldados entre sí o a otras hojas carpelares. Cara carpelo consta de tres partes: el ovario, que contiene en su interior uno o varios óvulos; el estilo, de forma de columna hueca; y el estigma, situado en el extremo superior y destinado a capturar los granos de polen [Fuentes Yagüe, 2001].

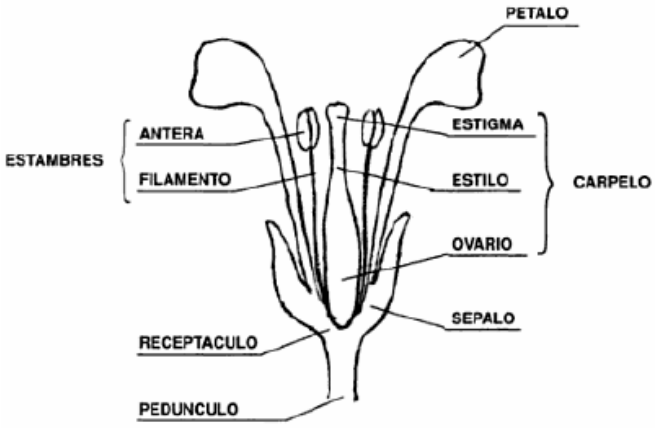


Figura 9. *Partes principales de la flor [Fuentes Yagüe, 2001]*

En el PFC1 se estudió la actividad antioxidante de varios tipos de flores, con el fin de saber cuál de ellas tenía más capacidad de prevenir la oxidación. Las rosas fueron las que, con diferencias significativas, presentaban mayores valores. Ello nos ha conducido a centrar el PFC2 en las rosas, que se describen a continuación.

2.3.3. Descripción de las rosas estudiadas

La rosa es la flor más cultivada en el mundo, la más difundida y conocida. Ha sido sometida a lo largo de la Historia a una intensa selección e hibridaciones con el objetivo de crear nuevas variedades y formas. Cada año aparecen centenares nuevos.

Los rosales son un conocido género de arbustos espinosos y floridos representantes principales de la familia de las rosáceas.

Desde el punto de vista de la práctica de la jardinería, y esquemáticamente, los rosales se clasifican en 4 grupos:

1. **Rosales silvestres:** son los que sin ser cultivados crecen en la naturaleza.
2. **Rosales antiguos**: son los tipos de rosales que existían antes de 1867, año en que apareció el primer híbrido de te, un híbrido artificial.
3. **Rosales modernos:** son los rosales posteriores a 1867 hasta la actualidad.
4. **Otros tipos:** este grupo incluye tipos especiales de rosales.

De los cuatro grupos de rosales, el más popular hoy en día y del que existe un mayor número de variedades. Más del 95 % de los rosales que se plantan son Rosales Modernos.

Las muestras utilizadas en el proyecto corresponden al grupo 3. ROSALES MODERNOS, el cual se clasifica a su vez en diversos subgrupos:

Arbustivos:

Los rosales arbustivos constituyen un grupo muy peculiar dentro de los rosales modernos, ya que son más parecidos a los rosales antiguos. Son grandes matas. Su altura suele variar entre 1,5 y 2,5 m, alcanzando prácticamente el mismo ancho. Presentan flores simples a plenamente dobles, dispuestas en solitario o bien en racimos. La mayoría son reflorecientes, es decir, que vuelven a florecer en el año. Las rosas nacen en verano y/o otoño. Dentro de los arbustivos hay un buen número de variedades.

Híbridos del té:

Este es el grupo más grande de rosas, el más popular y el más conocido. Es la rosa típica. Arbustos bajos, de 0,5 a 1 m. Las rosas que dan son grandes y reflorecen a lo largo del año. Florecen en verano-otoño.

Hojas: Alternas, compuestas, de número impar de foliolos ovalados y aserrados, pecioladas, de verde claro a grisáceo.

Flores de muchos colores, grandes, solitarias, se forman en el ápice de las ramas, capullos largos y elegantes. Refloreciente.

Frutos: baya carnosa que se vuelve naranja o roja al madurar.

Usos principales: para formar grupos de un sólo color, para arriates, para flor cortada.

Existen miles de variedades de híbridos de té. Algunas variedades están especialmente creadas para flor cortada. Viven bien en zonas cálidas y frías, situaciones a pleno sol. Son en general plantas bastante rústicas que pueden admitir casi cualquier tipo de suelo siempre y cuando no se den condiciones extremas.

Floribunda:

Es el segundo grupo en popularidad después de los híbridos de té. Las flores, a diferencia de los híbridos de té, son más pequeñas y están en racimos, dando mayor colorido que aquellos. Muy florecientes, rústicos y floríferos. Los racimos están compuestos en general por 3-25 flores simples a plenamente dobles. Floración en verano-otoño. De porte relativamente bajo, unos 50 cm de altura, pero hay tipos de 1 m.

Grandiflora:

Estos rosales se caracterizan por presentar sus flores con formato igual, pero de tamaño un poco más pequeño y agrupadas, dispuestas en corimbo como los rosales híbridos de té y floribundas respectivamente.

Polyantha:

Los polyantha son muy parecidos a los rosales floribunda. Arbustos compactos, muy espesos, cargados de flores pequeñas. Ramilletes compuestos en general por 7-15 flores pequeñas, pentapétalas, simples o dobles. Florecen en verano-otoño. Mismos usos que floribunda. Se plantan en grupos y para hacer borduras.

Trepadores:

Los rosales trepadores poseen unos tallos largos que le permiten trepar por pérgolas, paredes, vallas, muros, arcos, columnas decorativas, celosías o porches.

Floración de primavera a otoño. Florecientes, por lo general no florecen hasta el segundo año de su plantación. Sus rosas son idénticas a las de los rosales arbusto.

Sarmentosos:

Se podrían incluir los rosales sarmentosos dentro de los trepadores, puesto que son muy parecidos. Se trata de rosales trepadores vigorosos, con tallos laxos. Producen, principalmente en verano, grupos de 3-20 flores simples a plenamente dobles. Son recomendables para ser instalados en muros, vallas, pérgolas y árboles. De crecimiento vigoroso, sus tallos son largos y flexibles, portando pequeñas flores reunidas en grandes ramilletes de 3-20 flores simples o plenamente dobles.

Miniatura:

Los miniatura son rosales pequeños, 30-40 cm. Son reflorecientes y con ramilletes formados generalmente por 3-11 flores diminutas, simples a plenamente dobles, que se producen en verano-otoño.

Tapizantes:

Se trata de rosales rastreros, que crecen desparramados por el suelo. Presentan flores simples a plenamente dobles, en general dispuestas en ramilletes de 3-11 y que aparecen en verano y/u otoño. Algunas variedades dan solo una floración en el año y otras son reflorecientes.[http://articulos.infojardin.com]

2.4. Estado del arte sobre las rosas

En el año 2009, Kumar, et al,. realizó un estudio de la actividad antioxidante de los extractos de metanol de flores frescas de tres especies de rosas (Rosa damascena, Rosa bourboniana, Rosa brunonii), evaluó por el método de barrido de radicales libres (DPPH). El extracto de Rosa brunonii resultó el de mayor actividad de barrido de radicales libres (64,5 ± 0´38 %), seguido de Rosa bourboniana (51,8 ± 0,46%) y Rosa damascena (43,6 ± 0,25%) a 100 mu mg/L.

Al mismo tiempo estudió la composición fenólica en los extractos con la técnica de cromatografía líquida acoplada a masas y HPLC/MS.

Observó similitudes en la distribución relativa de los compuestos polifenólicos. Predominaron la quercitina, kaempferol y más glucósidos entre las tres especies de rosas.

Yassa, et al,. en el año 2009, identificó los componentes del extracto y del aceite esencial de rosa damascena de Irán cultivada en la provincia de Guilán para estudiar sus actividades biológicas.

Los métodos utilizados fueron, una preparación por hidrodestilación del aceite esencial de la flor y un análisis con GC/MS. La actividad antioxidante del extracto de pétalos y aceite esencial se midió por la actividad de captación de radicales libres (DPPH) y la peroxidación de lípidos con tiocianato de amonio y hierro.

Como resultados, obtuvo que el hidroextracto alcohólico mostraba fuerte capacidad de captación de radicales libres en comparación a los efectos inhibitorios de la peroxidación lipídica.

Los componentes principales del aceite esencial resultaron ser 3,8% de cinalol, 3,05% de nerol, 15,05% de geraniol, 18,56% de 1-nonadecene, 16,68% de n-tricosano, 24,6% de hexatriacotano y 3,37% de N-pentacosano.

El bioensayo fraccionó tres glucósidos de flavonoles: quercitina-3-o-glucósido, kaempferol-3-o-rhamnoside y kaemperol-3-o-arabinosido.

Así concluyó que el pétalo de rosa, por su actividad antioxidante y buen gusto, se puede utilizar como sabor de alimentos y como agente preventivo de muchas enfermedades.

En el año 2006, por Vinokur, et al,. seleccionó doce cultivares de rosa como fuentes potenciales de flores comestibles. Las secó al aire e hizo infusiones de agua caliente (té). Determinaron la actividad antioxidante, fenoles totales y contenido total de antocianatos.

Su composición la analizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Probó paralelamente, el té verde como referencia de bebida rica en antioxidantes. Obtuvo entre 712,7 y 1770,7 M mu equivalente Trólox (TE) por gramo de pétalos secos de rosa y 1227,6 mu MTE por gramo de peso seco en el té verde. En cuanto a fenoles totales, resultaron entre 50,7-119,5 mg de (GAE) equivalentes de ácido gálico para las rosas y 62,1 JUEGO mg por gramo de peso seco en el té verde.

Los valores más altos de la actividad antioxidante, fenoles totales y contenido en ácido gálico se encontraron en cultivares de san Francisco, Katharina Zeinet y Mercedes.

No encontró ninguna relación clara entre el nivel de antocianinas y la actividad del barrido de los radicales libres.

Cai, et al,. en el año 2005, estudió la rosa chinensis (Yuejihua) que es una planta ornamental conocida y muy utilizada en la medicina tradicional china.

Los extractos de metanol de las flores secas fueron utilizadas para la determinación simultanea de componentes fenólicos por cromatografía líquida y espectrometría de masas.

Identificó un total de 36 compuestos fenólicos conocidos y desconocidos, como los tainos hidrolizables, flavonoides, antocianos y sobre todo galotaninos , elagitaninos, la quercetina, la quercetina / kaempferol mono-y diglycosides y cianidina / pelargonidina diglycosides.

Los resultados mostraron que los antioxidantes fenólicos de esta especie de rosa exhibieron un fuerte efecto de captación de radicales libres y de poder antioxidante, también los altos niveles de flavonoides y taninos hidrolizables podrían ser importantes principios bioactivos.

En la industria, la Rosa Damascena es una especie importante por su sabor y fragancia, se producen una gran cantidad de residuos de estas flores. Por ello, en el año 2004, Ozkan, et al,. Realizó un estudio sobre la actividad antioxidante y antibacteriana de esta especie.

Obtivo 276,02 ± 2,93 mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por gramo de extracto de flor fresca y 248,97 ± 2.96 mg por gramo de extracto de flor seca. La actividad de radicales libres a 100ppm resultó 74,51 ± 1,65 % para el extracto de flores frescas y 75,94 ± 1,72 % para el extracto de flores secas.

La actividad antioxidante del extracto de flor fresca fue mayor (372,26 ± 0,96 mg/g) que la del extracto de flor seca (351,36± 0,841mg/g).

En cuanto a la actividad antibacteriana determinó mediante el método de difusión en agar frente a más de 15 especies de bacterias:

Ambos extractos fueron eficaces contra todas las bacterias excepto para E.coli 015:177. El extracto de flores frescas fue más eficaz que el extracto de flor seca.

Las flores frescas mostraron efectos más fuertes contra S.enterilidis y las flores secas contra M.smegmatis.

Las actividades antiinflamatorias de Piper cubeda (fruta), Physalis auguleta (flor) y Rosa hibrida (flor), fueron determinadas en el año 2003 por Choi, EM; Hwang, JK.

Estos extractos de plantas mostraron claramente los efectos inhibitorios contra la inflamación aguda y subaguda por vía oral (200mg/kg.po) de los extractos durante una semana inhibió significativamente la reacción alérgica en ratones IV ($p< 0,05$).

La rosa hibrida mostró un efecto analgésico contra la placa caliente inducida por estimulación térmica con una dosis de 200mg/kg.

Los resultados proporcionaron apoyo a la utilización de Rosa hibrida para aliviar el dolor inflamatorio.

En el año 1995, Mikanagi, et al,. determinó los flavonoles y antocianinas de flores en 120 taxones de 10 secciones de subgénero de Rosa. Detectó 19 flavonoles y 6 antocianinas:

- 6 glucósidos Kaempferol:

  3-glucósido (en 99 taxones%), 3-rutinoside (63%), 3-sophoroside (60%), 3-rhamnoside (70%), 7-glucósido (94%) y 4-g] ucoside (4%).

- 6 glucósidos quercitina:

  3-glucósido (91%), 3-glucurónido (62%), 3-rutinoside (63%), 3-sophoroside (69%), 7-glucósido (90%) y 4-glucósido (4%).

- 7 flavonoides no identificados.

- 2 glucósidos ciadinina:

  3,5-diglucoside (68%) y 3-g] ucoside (16%).

- 2 glucósidos peonidina:

  3,5-diglucoside (41%) y 3-g] ucoside (4%).

- 2 antocianinas no identificados.

Los patrones de distribución de flavonoides de este análisis se pudieron dividir los 120 taxones en el subgénero de rosa en tres grupos de la siguiente manera:

1. Se caracterizó por contener 3-glucosidos y ausencia de 4'-glucósidos. Se encuentran 59 especies.
2. Contienen 3-sophorosides y antocianinas, pero no contienen 4'-glucósidos. Los comprenden 55 taxones de 3 secciones.
3. Los que contienen gran cantidad de 4'-glucósidos, corresponden a una sola sección pinpinellifoliae (seis taxones).

Velioglu, et al,. aplicó en 1991 cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) , para la separación de las antocianinas y otros flavonoides en los pétalos de Rosa damascena Mill.

Detectó más de 25 picos discretos y la separación tardó menos de 50 minutos. La mayoría de los picos de HPLC fueron recogidos como fracciones separadas de la toma de la columna y volver a analizar por HPLC, cromatografía de papel y el análisis espectral.

La concentración de antocianinas total fue de 285mg/kg de pétalos frescos. La antocianina principal cianidina3,5-diglucoside, que representaron más del 95% del total de antocianinas.

Se identificaron también varios glucósidos, kaempferol, quercitina, galactósido, arabinosides y rhamnosides.

Por otra parte, Kuskoski et al., estudió la actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. Para la determinación utilizó el método TEAC. Determinó la capacidad antioxidante de cinco antocianos puros: delfinidina, cianidina, peonidina y malvidina.

Los resultados que obtuvo aplicando el método ABTS le llevaron a la conclusión que de los antocianos ensayados, delfinidina y cianidina 3-glucósido presentan mayor actividad antioxidante, dos veces más que el Trolox. El resto, tienen menor actividad pero potencial equivalente al Trolox. Por lo tanto los antocianos, además de las características colorantes poseen potente propiedad antioxidante.

2.5. Hipótesis de partida

Ha quedado reflejado que las rosas han sido ampliamente estudiadas. Los antioxidantes fenólicos de diversas especies de rosas mostraron un fuerte efecto de captación de radicales libres y de poder antioxidante.

Cabe destacar que algunas determinaciones se realizaron con extractos de pétalos frescos, otros de pétalos secos e incluso del aceite esencial de la flor. Aparecieron flavonoides, destacando la quercitina y el kaemferol.

En la hipótesis de partida del presente proyecto se considera que, en el extracto de pétalos de rosas de distintos colores se puede encontrar diferencias cuantitativas de antioxidantes fenólicos que se identifiquen.

Se espera vincular la pigmentación del pétalo de rosa con la capacidad antioxidante.

2.6. Determinación de polifenoles totales

2.6.1. Método Folin Ciocalteu

Para determinar la cantidad de polifenoles totales, se realiza el ensayo Folin-Ciocalteu propuesto por Singleton y Rossi en el año 1965.

El método se fundamenta en el carácter reductor de los polifenoles. El mecanismo básico del método es una reacción redox (el reactivo Folin es una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y de ácido fosfomolíbdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) que se reduce, por oxidación de los fenoles, a una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno). [Prior et al., 2005].

El ensayo de los fenoles totales se emplea con frecuencia en el estudio de las propiedades antioxidantes de alimentos vegetales al tratarse de un parámetro que generalmente muestra una estrecha correlación con diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante [Schlesier et al., 2002; Sun et al., 2002].

2.7. Determinación de la capacidad antioxidante

2.7.1. Método TEAC

El ensayo TEAC ("Trolox Equivalent Antioxidant Capacity") o ensayo del ABTS [2,2- azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] se basa en la inhibición por los antioxidantes del radical catiónico verde-azulado ABTS·+ [2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)], cuyo espectro muestra un máximo de absorción a las longitudes de onda 415, 645, 734 y 815 nm. De todas ellas, las longitudes de onda empleadas más frecuentemente son 415 y 734 nm [Prior et al., 2005]. Como patrón se emplea el compuesto denominado Trolox [6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethychroman-2- carboxylic acid], un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E.

Para el desarrollo del método se suelen emplear dos estrategias: inhibición y decoloración. En la primera los antioxidantes se añaden previamente a la generación del radical ABTS+· y lo que se determina es la inhibición de la formación del radical, que se traduce en un retraso en la aparición de la coloración verde-azulada. En la segunda estrategia, los antioxidantes se añaden una vez el ABTS+· se ha formado y se determina entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir la decoloración de éste [Sánchez-Moreno, 2002].

2.7.2. Método ORAC

El método ORAC ("Oxygen Radical Antioxidant Capacity") se desarrolló basándose en los trabajos de Glazer (1990) y Ghiselli et al. (1995), para definirse posteriormente con las modificaciones de Cao et al. (1993).

El ensayo ORAC se basa en la inhibición del radical peroxilo inducido por descomposición térmica de compuestos como el AAPH [2,2'-azobis-(2-methylpropanimidamide) dihydrochloride]. En el ensayo, el radical peroxilo reacciona con un compuesto fluorescente y forma un producto no fluorescente pudiendo ser cuantificado fácilmente por fluorescencia. Así, el ensayo ORAC combina tanto tiempo como porcentaje de inhibición.

El mecanismo de reacción se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno del antioxidante al radical libre. Para ello se usa un radical iniciador para generar el radical peroxilo (ROO·):

$$R-N=N-R \xrightarrow{O_2} N_2 + 2ROO^{\bullet} \qquad (8)$$

La pérdida de fluorescencia de la FL es el indicador de la extensión de la oxidación con el radical peroxilo. En presencia de un antioxidante, el radical capta, preferiblemente, un átomo de hidrógeno del antioxidante (AH), originando un compuesto hidroperóxido (ROOH) y un radical antioxidante

estable (A·). Como consecuencia, la disminución de la fluorescencia de la FL por acción del radical peroxilo es inhibida, es decir, en presencia de un antioxidante la disminución de la fluorescencia es más lenta. Las reacciones que tienen lugar se muestran en la figura 10.

$$ROO^{\bullet} + compuesto_fluorescente \rightarrow ROOH + compuesto_oxidado(no_fluorescente)$$

$$ROO^{\bullet} + AH \rightarrow ROOH + A^{\bullet}$$

$$ROO^{\bullet} + A^{\bullet} \xrightarrow{rápida} ROOA$$

Figura 10. *Reacciones que tiene lugar en el ensayo de ORAC [Prior et al., 2005]*

La protección del antioxidante se mide a partir del área de fluorescencia bajo la curva (AUC) de la muestra en comparación con la AUC del blanco, en la cuál el antioxidante no está presente (ver figura 3.9.). La AUC del blanco se genera usando disolución tampón.
Además se establece una recta de calibrado con diferentes concentraciones del estándar (Trolox) [Ou et al., 2001].

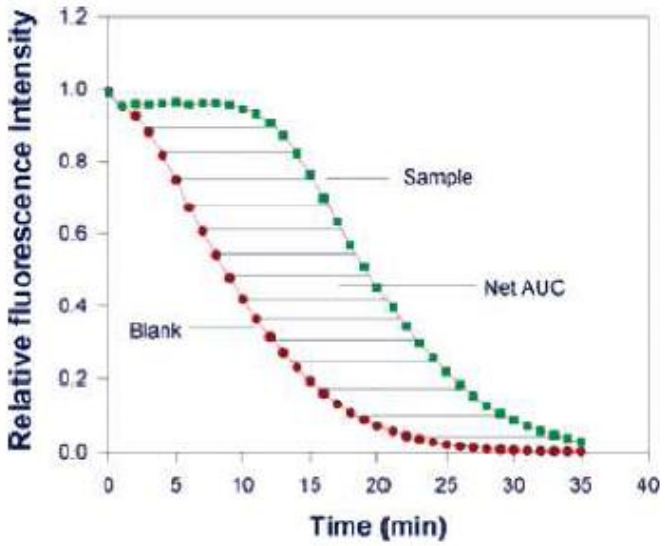


Figura 11. *Actividad antioxidante ORAC de una muestra medida como AUC. [Prior et al., 2005]*

Este método se puede usar para medir la capacidad antioxidante de compuestos puros, como los flavonoides y la cafeína, y de extractos de frutas, verduras, té,..., así como el contenido de antioxidantes de muestras biológicas como tejido musculoso de animales o plasma [Sánchez-Moreno, 2002].

CAPÍTULO 3: OBJETIVOS

El objetivo principal del proyecto se basa en estudiar la actividad antioxidante de diferentes tipos de rosas, con colores distintos.

Para ello, se desarrollan una serie de objetivos integrados en el principal:

1. Comparar el efecto antioxidante en una emulsión, de diferentes tipos de flores con las rosas.
2. Determinar el color exacto del pétalo en sus diversas fases (pétalo fresco, y barrido de diferentes extracciones líquidas) con los métodos adecuados.
3. Evaluar los polifenoles totales mediante el ensayo Folin Ciocalteu.
4. Evaluar la capacidad antioxidante mediante el método TEAC y ORAC.
5. Analizar la cantidad de Flavonoides totales y Antocianinas totales que tienen los diversos extractos.
6. Relacionar el color del pétalo de rosa con la actividad antioxidante del extracto.

CAPÍTULO 4: MATERIAL Y MÉTODOS

Los métodos previstos realizar para llevar a cabo los análisis descritos en los objetivos son:

- Probar el efecto antioxidante de diversas flores entre ellas las rosas, en una emulsión.
- Determinación del color de cada muestra de rosa, mediante las coordenadas L*a*b.
- Estudio del color de las extracciones de pétalos de rosa mediante un barrido espectral.
- Determinación del contenido total de polifenoles por el método Folin Ciocalteu.
- Evaluación de la capacidad antioxidante con los métodos TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) y ORAC (*Oxygen Radical Antioxidant Capacity*).
- Análisis de los componentes antioxidantes mediante la determinación de flavonoides y antocianinas.

4.1. Preparación de muestras

Las muestras escogidas para el estudio del presente proyecto son pétalos de siete rosas diferentes, con colores distintos. Se obtuvieron del mismo floricultor especializado en rosas.

Figura12. *Clasificación de muestras de pétalos de rosas*

Para adecuar las muestras a su posterior extracción y su conservación se trataron de la siguiente manera:

- Separar pétalos del resto de la flor y pesar (se obtiene el peso húmedo de cada muestra).
- Liofilizar los pétalos para conseguir una muestra totalmente seca y volver a pesar.
- Picar en picadora y conservar en desecador.

4.2. Diseño del experimento y nomenclatura

Se ha decidido trabajar con MetOH 50% en agua y MetOH en agua al 50% acidificado con HCl hasta pH 1.

Por otra parte se realiza el estudio con dos tipos de métodos de extracción, un método de extracción completo y otro tipo de extracción sencilla y directa. De esta manera, se hacen dos experimentos diferentes.

El metanol es uno de los solventes más utilizados en extracciones [Vinson et al., 1998-2001]. Según estudios realizados por el grupo de investigación Engibio, porcentajes de 30-90% de metanol en agua da lugar a máximas capacidades antioxidantes. [Bover Millera. L, PFC, 2008]

En cuanto al pH, existen numerosas referencias bibliográficas respecto a su influencia en la actividad antioxidante [Labrinea y Georgiou, 2004; Shu et al., 2008; Ruenroengklin et al.,2008]. En el presente trabajo interesa confirmar dos hipótesis: si la variación del pH influye en la capacidad antioxidante, y si al trabajar con diferentes pH se obtienen distintos colores en los extractos debido a la presencia de grupos cromógenos en los extractos, con color diferente en función de que esté presente la forma ácida o la básica.

El total de extracciones es de 28. En las siguientes tablas se exponen todas ellas con su correspondiente nomenclatura, indicando el tipo de flor, extracción, disolvente.

Tabla 8. *Referencias de cada muestra de extracciones completas.*

Referencia de la muestra	Tipo de rosa	Disolvente
RTSL	Rita	MetOH
RTAL	Rita	MetOH pH 1
RMSL	Rimini	MetOH
RMAL	Rimini	MetOH pH 1
AQSL	Aqua	MetOH
AQAL	Aqua	MetOH pH 1
AKSL	Akito	MetOH
AKAL	Akito	MetOH pH 1
VNSL	Vanessa	MetOH
VNAL	Vanessa	MetOH pH 1
STSL	Satisfaction	MetOH
STAL	Satisfaction	MetOH pH 1
GGSL	Gran Gala	MetOH
GGAL	Gran Gala	MetOH pH 1

Tabla 9. *Referencias de cada muestra de extracciones simples.*

Referencia de la muestra	Tipo de rosa	Disolvente
RTSD	Rita	MetOH
RTAD	Rita	MetOH pH 1
RMSD	Rimini	MetOH
RMAD	Rimini	MetOH pH 1
AQSD	Aqua	MetOH
AQAD	Aqua	MetOH pH 1
AKSD	Akito	MetOH
AKAD	Akito	MetOH pH 1
VNSD	Vanessa	MetOH
VNAD	Vanessa	MetOH pH 1
STSD	Satisfaction	MetOH
STAD	Satisfaction	MetOH pH 1
GGSD	Gran Gala	MetOH
GGAD	Gran Gala	MetOH pH 1

4.3. Extracción de los compuestos antirradicalarios del pétalo de rosa

Este método tiene como fin extraer el contenido a caracterizar de los pétalos de flores mediante un solvente, para su posterior análisis.

4.3.1. Reactivos

Metanol
Ácido clorhídrico

4.3.2. Material e instrumentos

Material habitual de laboratorio utilizado: matraz aforado (2L), probeta (1L), imanes, frascos lavadores, balones (250mL), vasos de precipitados, botellas de vidrio reutilizadas.

Material fungible: Guantes pipetas Pasteur, cinta adhesiva, eppendorfs. agua MilliQ

Máquinas: Rotavapor, centrífuga, bomba de aceite, liofilizador, pHmetro, agitador magnético, balanza analítica, congelador.

4.3.3. Preparado de disolventes:

Metanol 50%:

Introducir 1L de metanol en un matraz de 2L y enrasar con agua.

Metanol 50% a pH=1:

Con el metanol a 50% preparado, retirar 1L bien homogeneizado.

Ajustar pH a 1 añadiendo HCl muy diluido mientras se somete a agitación.

4.3.4. Procedimiento de extracción

Extracción con metanol 50%:

Pesar 1/5 parte en gramos del liofilizado obtenido de la muestra.

Añadir 500mL de metanol 50%.

Dejar en agitación 24h protegido de la luz.

Centrifugar contenido a 3000rpm durante 10 minutos.

Recuperar el líquido y poner en un balón.

Evaporar a sequedad el disolvente con el rotavapor.

Recuperar el extracto de las paredes del balón con la mínima cantidad posible de agua (volumen conocido).

Conservar los extractos de las muestras en congelador a -20ºC, hasta su tratamiento.

Liofilizar los extractos.

Extracción con metanol 50% a pH1:

Pesar 1/5 parte en gramos del liofilizado obtenido de la muestra.

Añadir 500mL de metanol 50% a pH1.

Dejar en agitación 24h protegido de la luz.

Centrifugar contenido a 3000rpm durante 10 minutos.

Recuperar el líquido y poner en un balón.

Evaporar a sequedad el disolvente con el rotavapor.

Recuperar el extracto de las paredes del balón con la mínima cantidad posible de agua (volumen conocido).

Conservar los extractos de las muestras en congelador a -20ºC, hasta su tratamiento.

Liofilizar los extractos.

4.4. Extracción simple del pétalo de rosa

Este tipo de extracción es un método más simple y directo que el método anterior. Pensado para complementar las determinaciones de las extracciones completas.

4.4.1. Reactivos

Metanol
Ácido clorhídrico

4.4.2. Material e instrumentos

Material básico de laboratorio

Material fungible: Guantes pipetas Pasteur, cinta adhesiva, eppendorfs.

Viales de 100mL, imanes, balanza, agitador magnético y centrífuga.

4.4.3. Procedimiento

Pesar 0,1 gramos de de la muestra seca y añadir 5mL del disolvente correspondiente.

Dejar en agitación y en nevera durante 24h.

Transcurrido el tiempo de agitación, centrifugar para separar el extracto líquido.

Recuperar el sobrenadante

Conservar en nevera.

4.5. Emulsiones

El sistema modelo que se ha realizado ha sido la emulsión. Este método se basa en realizar diferentes emulsiones (aceite en agua) donde se añaden las muestras a estudiar y se sigue la evolución de su oxidación. De esta manera, se puede estudiar si las muestras tienen capacidad antioxidante en un sistema modelo, comparando las muestras con una emulsión control.

Para controlar la oxidación de las emulsiones se determina el valor de peróxidos diariamente hasta que comienza la oxidación secundaria y por lo tanto se produce una gran variabilidad en los hidroperóxidos. El valor de peróxidos indica el grado de oxidación de las muestras.

4.5.1. Reactivos

Aceite de girasol (uso doméstico)

Alúmina (óxido de aluminio) QP (Panreac)

4.5.2. Material e instrumentos

Columna de filtración

Matraz kitasatos

Botella de vidrio opaca

Bomba de vacío de membrana

Hielo

Sonicador, Estufa y desecador

Viales

Pipetas y puntas

Balanza analítica

Material básico de laboratorio

4.5.3. Procedimiento

El aceite que se usa en el sistema modelo debe estar libre de sus antioxidantes naturales para que éstos no interfieran en los resultados. Para su eliminación se realiza una filtración al vacío con óxido de aluminio. Se usa alúmina porque este producto es capaz de retener los antioxidantes del aceite sin tener que usar ningún disolvente.

Eliminación de los antioxidantes naturales del aceite de girasol

Pesar una relación de alúmina – aceite a filtrar 2:1,4, y colocarla en un recipiente cerámico dentro de una estufa a 100ºC durante 24 horas.

Rellenar la columna de filtración con la mitad de la alúmina secada, conectar a la bomba de vació e introducir el aceite. La columna de filtración debe estar tapada con papel de aluminio para que la luz no oxide el aceite.

Repetir el procedimiento (se realiza 2 veces en total).

Una vez terminado el segundo proceso de filtración, guardar el aceite días siguientes. En caso contrario, debe ser guardado en congelador a -80ºC (a esta temperatura se asegura que el aceite no empieza a oxidarse antes de empezar el experimento).

El proceso de filtración se realiza dos veces para obtener una mejor eficiencia y de esta manera asegurar que todos los antioxidantes naturales del aceite de girasol han quedado retenidos en la alúmina y que, por tanto, se dispone de un aceite libre de antioxidantes.

Obtenido el aceite libre de antioxidantes naturales se preparan las emulsiones. Como emulsionante se utiliza Tween-20, un emulsionante sintético, que garantizará la estabilidad de la emulsión en el tiempo.

Preparación de la emulsión inicial

Disolver el Tween-20 en agua en la proporción adecuada al ensayo.

Añadir gota a gota el aceite, a la vez que se mezcla con el sonicador, en una proporción 1:9.

Preparación de emulsiones

Se preparan nueve emulsiones con un contenidos final del 10% en aceite. Cuatro de ellas con extractos metanólicos de pétalos de clavel de color blanco, de rosa de color rosa-violeta, de lisiantus de color blanco y de pensamientos de color amarillo. Los siguientes cuatro, con extractos de acetona de pétalos de las mismas flores. En todos ellos se ha evaporado por rotavapor la fracción orgánica, dejando únicamente el agua a la concentración obtenida directamente en la extracción. En el control se añade agua en lugar de extracto acuoso.

Las emulsiones se realizan por cuadruplicado. Los porcentajes están recogidos en la tabla 6. Se realiza un seguimiento a días alternos, durante aproximadamente un mes, de la oxidación, a través del valor de peróxido, por el método de ferrocianato, en todas las muestras.

Tabla 6. *Composición final de muestras para emulsiones.*

Nº Emulsión	Nombre de emulsión	%emulsión de 12,5% de aceite	% extracto pétalos
1	clavel_ac	80	20
2	clavel_met	80	20
3	rosa_ac	80	20
4	rosa_met	80	20
5	lisantus_ac	80	20
6	lisantis_met	80	20
7	pensamiento_ac	80	20
8	pensamiento_met	80	20
9	control	80	20(de agua)

4.6. Determinación de valor de peróxido por el método de ferrocianato

Para la determinación del valor de peróxidos en las emulsiones, que cuantifica la oxidación primaria del aceite que lo forma, se procede al análisis mediante el método de ferrocianato, calibrado por el método oficial AOCS Cd. 8 – 53 revisado en 1997 (recta de calibrado en el anexo B, apartado B.4.).

El método de ferrocianato consiste en la reacción entre hierro (II) y los peróxidos en la emulsión para formar hierro (III). Éste último combinado con el anión tiocianato (SCN-) presenta una coloración roja intensa cuyo espectro presenta un máximo a λ = 500 nm.

4.6.1. Reactivos

Ácido clorhídrico al 35% (Panreac)

Cloruro de hierro (II) (FeCl2) (Sigma-Aldrich)

Tiocianato de amonio (NH4SCN) (Sigma-Aldrich)

Agua bidestilada extraída diariamente, Milli-Q (Millipore)

Etanol al 96% PRS (Panreac)

4.6.2. Material e instrumentos

Cubetas de PS de 4,5 mL

Micropipeta (10–100µL)

Micropipeta (200–1000µL)

Micropipeta (1000–5000µL)

Balanza analítica

Espectrofotómetro (HP – 8524A)

4.6.3. Procedimiento

Preparar una disolución de cloruro de hierro (II) en solución del 3,5% de HCl reactivo 1).

Preparar una disolución de tiocianato de amonio al 30% (reactivo 2).

Ambas disoluciones se mantienen estables durante unas semanas y pueden ser guardadas en nevera para futuros ensayos.

Pesar aproximadamente 10 µg (1 gota), con precisión de 0,1 mg, de emulsión en cada cubeta. En el caso del blanco no añadir nada.

Adicionar 4 mL de etanol al 96% en todas las cubetas.

Añadir una proporción de 1:50 de las disoluciones de cloruro de hierro (II) (reactivo 1) y de tiocianato de amonio (reactivo 2) y homogeneizar.

Realizar la lectura en el espectrofotómetro a λ = 500 nm, entre 5 y 10 minutos después de haber añadido el segundo reactivo.

4.7. Polifenoles totales

Para analizar la cantidad de polifenoles totales, se realiza el ensayo Folin Ciocalteau propuesto por Singleton y Rossi en el año 1965.

4.7.1. Reactivos

Reactivo Folin Ciocalteau

Carbonato de sodio anhidro

Ácido gálico

Subministrados por Panreac Química S.A

Agua bidestilada (miliQ) obtenida de la máquina Millipore.

4.7.2. Material e instrumentos

Espectrofotómetro (HP – 8524A)

Baño termostático

Cubetas

Gradilla

Micropipeta (10-100µL)

Pipetas (1-5mL)

Puntas

Soporte eppendorfs y material básico de laboratorio

4.7.3. Procedimiento

Colocar cubetas en una placa.

Añadir 10 µL de muestra a cada cubeta (por duplicado).

Si se espera un bajo contenido de polifenoles totales se puede incrementar esta cantidad realizando una corrección en el volumen de agua bidestilada añadida para que el volumen total sea de 4mL.

Añadir 10 µL de agua bidestilada (para el blanco).

Añadir 160 µL de reactivo Folin (diluidos en 2 mL de agua bidestilada y 480 µL de carbonato de sodio al 20% (m/m).)

Agitar las cubetas e incubar 1h a temperatura ambiente protegidas de la luz.

Transcurrido el periodo de reacción añadir 1,35 mL de agua bidestilada y leer la absorbancia de cada cubeta a 2 longitudes de onda: 764 y 766 nm.

El contenido en polifenoles totales se expresa como equivalentes en miligramos (mg) de equivalentes ácido gálico (GAE) por litro de muestra (ppm).

Los equivalentes en mg de ácido gálico por unidad de volumen son función lineal de la absorbancia a 764-766 nm.

Mediante un calibrado previo con patrones de ácido gálico se obtiene la recta de regresión que permite obtener la concentración de ácido gálico asociada a una determinada absorbancia.

4.8. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

El ensayo TEAC o ensayo del ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico) (ABTS) se basa en la captación del radical catión $ABTS^{+\cdot}$ por los antioxidantes. Como patrón se emplea el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico (Trolox), un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E.

4.8.1. Reactivos

PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

ABTS ($K_2S_2O_8$ con 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt)

Trolox 97% (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid).

Estos productos son proporcionados por Sigma-Aldrich y Panreac Química S.A.

Agua bidestilada (MiliQ) obtenida de la máquina Millipore.

4.8.2. Material e instrumentos

Espectrofotómetro (HP – 8524A)

Fluorímetro fluorestar óptima

Baño termostático

Cronómetro

Micropipeta (10-100µL)

Pipetas (1-5mL)

Pipeta multicanal

Placa 96 pocillos

Material fungible: Guantes pipetas pasteur, cinta adhesiva, eppendorfs.

Material básico de laboratorio.

4.8.3. Procedimiento

Preparar el radical catiónico mediante la mezcla de ABTS y persulfato de potasio con concentraciones finales de ambos de 7 mM y 2,45 mM, respectivamente.

Diluir la disolución de ABTS·+ con PBS de tal forma que la absorbancia de la nueva dilución se encuentre en 0,73 ± 0,01 a 30ºC.

NOTA: El ensayo TEAC se debe realizar a una temperatura controlada de 30ºC. Por lo tanto, se han de mantener las muestras y el reactivo en el baño de agua previamente condicionado a 30ºC.

Añadir a cada pocillo 9:10 de la disolución que contiene radical catiónico ABTS+ con la pipeta multicanal

Seguidamente leer en el fluorímetro la placa

Añadir 1:10 de cada muestra (Con su dilución correspondiente) en los pocillos con el orden determinado previamente

La placa debe de ser rellenada con un triplicado de cada muestra y un triplicado de dos blancos (BL) que corresponden a 1:10 del disolvente utilizado

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	BL	BL	AKAL	AKAL	AKAL	RTAD	RTAD	RTAD	VNAD	VNAD	VNAD
B	RTSL	RTSL	RTSL	VNSL	VNSL	VNSL	RMSD	RMSD	RMSD	STSD	STSD	STSD
C	RTAL	RTAL	RTAL	VNAL	VNAL	VNAL	RMAD	RMAD	RMAD	STAD	STAD	STAD
D	RMSL	RMSL	RMSL	STSL	STSL	STSL	AQSD	AQSD	AQSD	GGSD	GGSD	GGSD
E	RMAL	RMAL	RMAL	STAL	STAL	STAL	AQAD	AQAD	AQAD	GGAD	GGAD	GGAD
F	AQSL	AQSL	AQSL	GGSL	GGSL	GGSL	AKSD	AKSD	AKSD	BL	BL	BL
G	AQAL	AQAL	AQAL	GGAL	GGAL	GGAL	AKAD	AKAD	AKAD	BL	BL	BL
H	AKSL	AKSL	AKSL	RTSD	RTSD	RTSD	VNSD	VNSD	VNSD	BL	BL	BL

Figura13. *Plantilla del orden de cada muestra en placa de 96 pocillos para TEAC.*

El porcentaje de inhibición de los blancos y de cada muestra se calcula según las siguientes expresiones:

$$\%\ inhibición\ BLANCO = \frac{t_0 - t_5}{t_0} \cdot 100 \quad (9)$$

$$\%\ inhibición\ MUESTRA = \left(\frac{t_0 - t_5}{t_0} \cdot 100\right) - \%\ inhibición\ BLANCO \quad (10)$$

Donde:

t_0: valor de la absorbancia inicial a 734 nm

t_5: Valor de la absorbancia a los 5 minutos a 734 nm

Los equivalentes en moles de Trolox (moles de pétalo) por unidad de volumen son función lineal de los porcentajes de inhibición. Mediante un calibrado previo con patrones de Trolox se obtiene la recta de regresión que permite obtener la concentración de Trolox correspondiente.

4.8.4. Recta de calibrado: TEAC

En la figura 14 se muestra el calibrado utilizado para referenciar los valores de absorbancia obtenidos a miliequivalentes de Trolox.

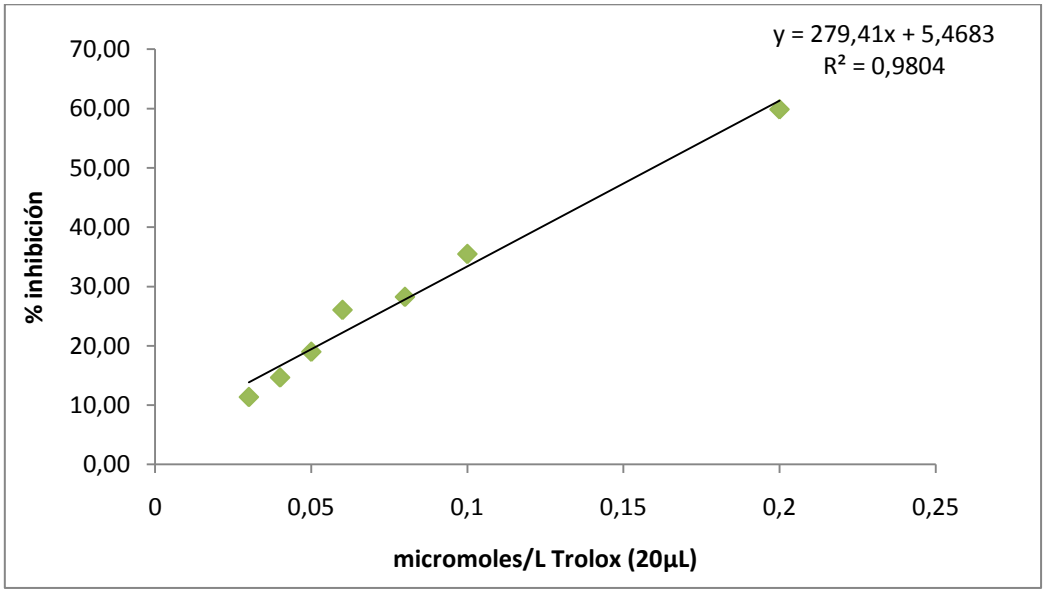


Figura14. *Recta de calibrado para realizar los cálculos de TEAC.*

4.9. ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity)

El ensayo ORAC se realiza siguiendo el procedimiento descrito por Ou et al. (2001). Éste consiste en la cuantificación de la capacidad antioxidante mediante la inhibición de la oxidación de la fluoresceína por el radical AAPH.

4.9.1. Reactivos

Trolox 97% (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico)

PBS (buffer fosfato salino)

AAPH 97% (2,2,-Azobis(2-metilpropinamida) dihidrocloruro

Fluorosceína ($C_{20}H_{10}Na_2O_5$)

4.9.2. Material e instrumentos

Fluorímetro fluorestar óptima

Micropipeta (10-100µL)

Pipetas (1-5mL)

Pipeta multicanal

Placa 96 pocillos

Material fungible: Guantes pipetas pasteur, cinta adhesiva, eppendorfs.

Material básico de laboratorio.

4.9.3. Procedimiento

Preparar una disolución de fluoresceína de 0,05032 ppm (mg/L).

Añadir 1:5 de muestra, patrón o blanco (según corresponda) a los pocillos. Tanto las muestras como los patrones o el blanco se hacen por triplicado.

En este ensayo el orden de placa es el mismo que en ensayo de TEAC representado en la figura 13.

Añadir en proporción 3:5 Fluoresceína a cada uno de los pocillos.

Introducir la placa en el fluorímetro y realizar una primera lectura. Sacar la placa.

Prepara una disolución de AAPH en PBS de 81,36 g/L.

Añadir en proporción 1:5 la disolución de AAPH en cada uno de los pocillos.

Una vez introducida la placa en el aparato, realizar lecturas a intervalos de 2 minutos durante unas 2 horas para obtener los datos de la cinética, con agitación entre cada lectura.

NOTA: El ensayo ORAC se debe realizar a una temperatura de 37ºC. Por lo tanto, poner a esta temperatura el fluorímetro.

Los datos obtenidos son las áreas debajo de las curvas de fluorescencia, aproximadas por el método de los trapecios. El tratamiento es análogo a los que se han utilizado en el método TEAC:

$$Disminución_{fluoresceina} = AUC - AUC_{Bl} \quad (11)$$

Donde:

AUC: Área bajo la curva de la muestra del pocillo

AUC_{bl}: Área bajo la curva del blanco

El AUC se calcula mediante la siguiente expresión:

$$AUC = \left(\frac{0{,}5+\sum_{i=1}^{Nc} f_i}{f_i}\right) \cdot tc \quad (12)$$

Donde:

f_i: unidades de fluorescencia (f_1, corresponde al valor de la primera lectura)

Nc: número de ciclos

tc: tiempo de cada ciclo, en este caso tc = 2 (2 minutos)

Los resultados de este método son expresados en [equivalentes en micromoles de Trolox/g muestra seca inicial] (µeq o microeq Trolox/g muestra). También se puede expresar en [equivalentes en milimoles de Trolox/g muestra seca inicial] (meq Trolox/g muestra).

4.9.4. Recta calibrado: ORAC

En la figura 15 se muestra el calibrado utilizado para referenciar los valores de absorbancia obtenidos a miliequivalentes de Trolox.

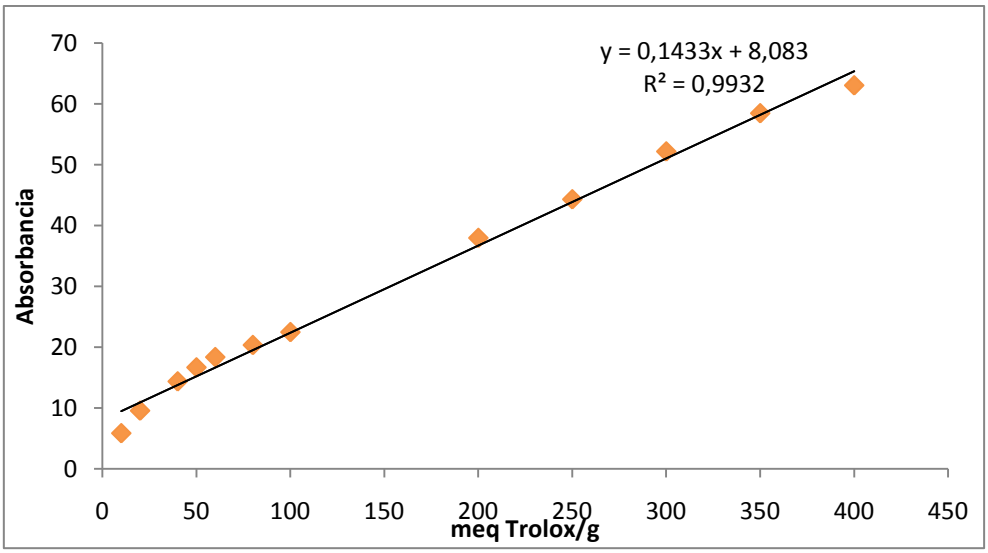


Figura15. *Recta de calibrado para realizar los cálculos de ORAC.*

4.10. Antocianinas

Para determinar la cantidad de antocianinas se utiliza el método descrito en PFC por Laura Bover.

4.10.1. Material

Fluorímetro fluorestar óptima

Micropipeta (10-100µL)

Pipeta multicanal

Placa 96 pocillos

Material fungible: Guantes pipetas pasteur, cinta adhesiva, eppendorfs.

Material básico de laboratorio.

4.10.2. Procedimiento

Añadir 150µL de muestra o blanco en cada pocillo con el orden determinado previamente.

La placa debe de ser rellenada con un cuadruplicado de cada muestra y un cuadruplicado de blancos (BL) que corresponden al disolvente utilizado.

Para determinar todas las muestras usar dos placas.

La muestras marcadas en la figura 16 tienen una dilución 1:50.

1ª Placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RTSD	RTSD	RTSD	RTSD	VNSD	VNSD	VNSD	VNSD	RMSD	RMSD	RMSD	RMSD
B	RTAD	RTAD	RTAD	RTAD	VNAD	VNAD	VNAD	VNAD	RMAD	RMAD	RMAD	RMAD
C	RMSD	RMSD	RMSD	RMSD	STSD	STSD	STSD	STSD	AQSD	AQSD	AQSD	AQSD
D	RMAD	RMAD	RMAD	RMAD	STAD	STAD	STAD	STAD	AQAD	AQAD	AQAD	AQAD
E	AQSD	AQSD	AQSD	AQSD	GGSD	GGSD	GGSD	GGSD	AKSD	AKSD	AKSD	AKSD
F	AQAD	AQAD	AQAD	AQAD	GGAD	GGAD	GGAD	GGAD	AKAD	AKAD	AKAD	AKAD
G	AKSD	AKSD	AKSD	AKSD	RTSD	RTSD	RTSD	RTSD	VNSD	VNSD	VNSD	VNSD
H	AKAD	AKAD	AKAD	AKAD	RTAD	RTAD	RTAD	RTAD	VNAD	VNAD	VNAD	VNAD

2ªPlaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STSD	STSD	STSD	STSD								
B	STAD	STAD	STAD	STAD								
C	GGSD	GGSD	GGSD	GGSD								
D	GGAD	GGAD	GGAD	GGAD								
E	BL	BL	BL	BL								
F	BL	BL	BL	BL								
G	BL	BL	BL	BL								
H	BL	BL	BL	BL								

Figura16. *Plantilla del orden de cada muestra en placa de 96 pocillos para Antocianinas.*

Realizar la lectura en el fluorímetro a 520 nm.

4.10.3. Curva de calibrado: Antocianinas

En la figura 17 se muestra el calibrado utilizado para referenciar los valores de absorbancia obtenidos.

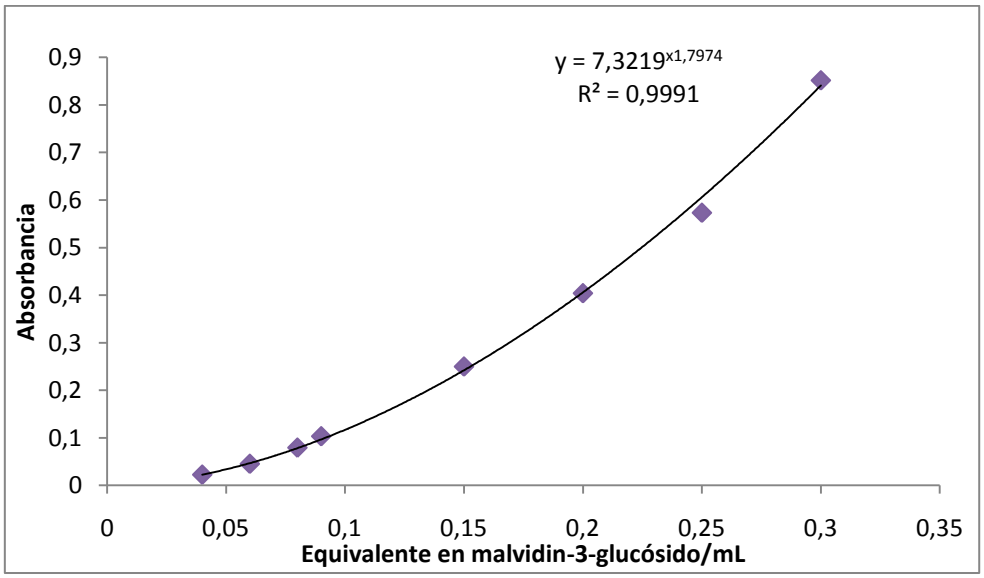


Figura17. *Recta de calibrado para realizar los cálculos de Antocianinas.*

4.11. Flavonoides

4.11.1. Reactivos

Metanol con 5% Ácido acético

4.11.2. Material

Fluorímetro fluorestar óptima

Micropipeta (10-100µL)

Pipeta multicanal

Placa 96 pocillos

Material fungible: Guantes pipetas pasteur, cinta adhesiva, eppendorfs.

Material básico de laboratorio.

4.11.3. Procedimiento

Utilizar la misma placa usada para la determinación de antocianinas (con 150µL de muestra y blanco)

De cada muestra y blanco, la cuarta réplica, en este ensayo corresponden al control de cada muestra.

En las cuartas columnas añadir 1:3 del reactivo de ácido acético.

En la siguiente figura se indican las columnas a las que se le añade el reactivo (columnas de control de muestras):

1ª Placa

Columnas de control de muestras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RTSD	RTSD	RTSD	**RTSD**	VNSD	VNSD	VNSD	**VNSD**	RMSD	RMSD	RMSD	**RMSD**
B	RTAD	RTAD	RTAD	**RTAD**	VNAD	VNAD	VNAD	**VNAD**	RMAD	RMAD	RMAD	**RMAD**
C	RMSD	RMSD	RMSD	**RMSD**	STSD	STSD	STSD	**STSD**	AQSD	AQSD	AQSD	**AQSD**
D	RMAD	RMAD	RMAD	**RMAD**	STAD	STAD	STAD	**STAD**	AQAD	AQAD	AQAD	**AQAD**
E	AQSD	AQSD	AQSD	**AQSD**	GGSD	GGSD	GGSD	**GGSD**	AKSD	AKSD	AKSD	**AKSD**
F	AQAD	AQAD	AQAD	**AQAD**	GGAD	GGAD	GGAD	**GGAD**	AKAD	AKAD	AKAD	**AKAD**
G	AKSD	AKSD	AKSD	**AKSD**	RTSD	RTSD	RTSD	**RTSD**	VNSD	VNSD	VNSD	**VNSD**
H	AKAD	AKAD	AKAD	**AKAD**	RTAD	RTAD	RTAD	**RTAD**	VNAD	VNAD	VNAD	**VNAD**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STSD	STSD	STSD	**STSD**								
B	STAD	STAD	STAD	**STAD**								
C	GGSD	GGSD	GGSD	**GGSD**								
D	GGAD	GGAD	GGAD	**GGAD**								
E	BL	BL	BL	**BL**								
F	BL	BL	BL	**BL**								
G	BL	BL	BL	**BL**								
H	BL	BL	BL	**BL**								

Figura18. *Plantilla del orden de cada muestra en placa de 96 pocillos para Flavonoides.*

Después de añadir el reactivo realizar la lectura en el fluorímetro.

4.11.4. Recta de calibrado: Flavonoides

En la figura 19 se muestra el calibrado utilizado para referenciar los valores de absorbancia obtenidos.

Se realiza el calibrado con patrones de rutina y un rango de concentraciones de 5-75µg/mL.

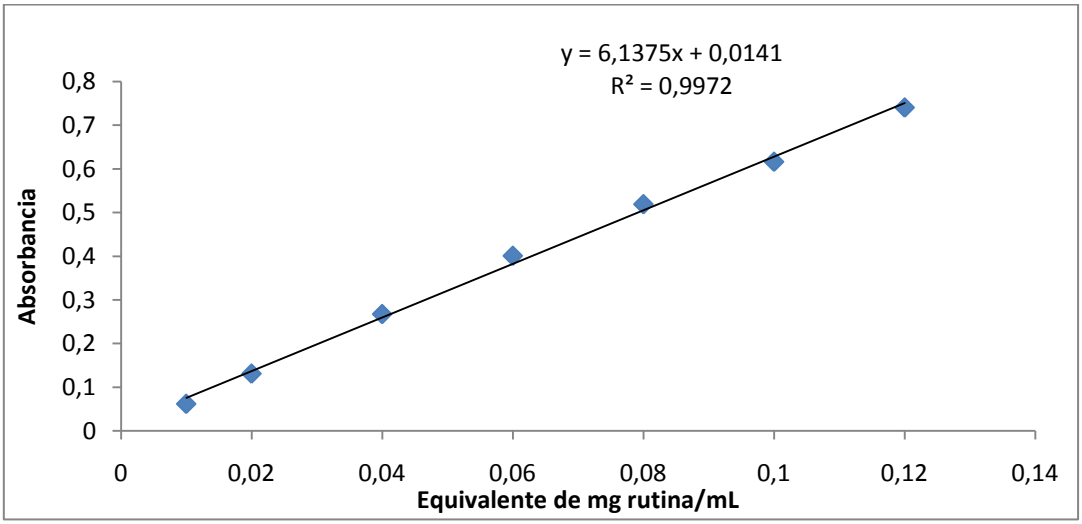


Figura20. *Recta de calibrado para realizar los cálculos de Flavonoides.*

4.12. Determinación del color de los pétalos

Cada pétalo de rosa estudiado muestra un color distinto a los demás. Y de cada extracción, dependiendo del tipo de disolvente, también se perciben diferentes colores. Por ello, en el presente proyecto se realiza un estudio del color de cada pétalo en sus diversas fases, (pétalo húmedo, pétalo seco, extracto líquido y extracto liofilizado).

Un colorímetro es cualquier herramienta que identifica el color y el matiz para una medida más objetiva del color. En este estudio se utiliza un colorímetro portátil que mide el color, obteniendo resultados de L*a*b*, que representan las sensaciones de color.

4.12.1. Material

Espectrolorímetro (Datacolor Select)

Software (Datacolor Paint Select)

Figura 21. *Espectrolorímetro (Datacolor Select) [www.datacolor.com]*

4.12.2. Procedimiento

Calibrar el instrumento cada cierto tiempo.

Posar el instrumento sobre la muestra.

Clicar el botón de medición y volver a posar el aparato en otra zona de la muestra, y así hasta tres veces (triplicado de muestra).

El programa hace la media del triplicado.

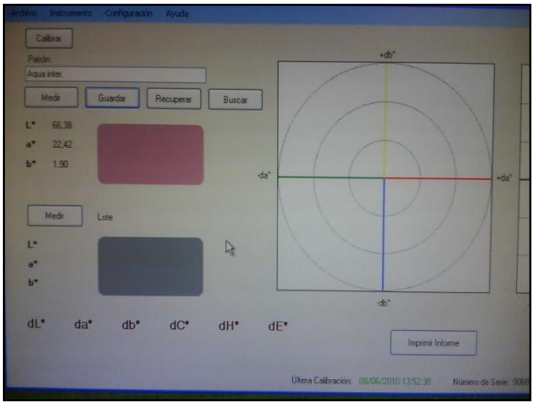


Figura 22. *Software del Espectrolorímetro*

4.13. Barrido espectral de los extractos

Realizar un barrido espectral permite comparar el color con las absorbancias obtenidas en cada longitud de onda del espectro visible, de los extractos de cada tipo de pétalo con los distintos disolventes.

4.13.1. Material

Espectrofotómetro

Cubetas

Gradilla

Material básico de laboratorio

4.13.2. Procedimiento

Programar el espectrofotómetro para realizar un barrido espectral.

Preparar un blanco con el disolvente utilizado y leer la absorbancias.

Seguidamente, leer las absorbancias de las muestras.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS

5.1. Resultados de emulsiones en diferentes tipos de flores

Se pretende contestar a la pregunta de si los pétalos de rosa tienen la mayor actividad antioxidante en el seno de una emulsión frente a otros tipos de flores, confirmando resultados anteriores del grupo de investigación en los que se observa que son los mejores pétalos en los ensayos frente a radicales libres (PFC Laura Bover).

Otra característica de este ensayo es que se realizan dos extractos diferentes en cada uno de los pétalos: uno metanólico y otro acetónico. Ello permitirá ver si el tipo de disolvente de partida tiene influencia en la capacidad antioxidante de los pétalos en la emulsión, es decir, si los componentes extraídos son diferentes.

Los resultados de la tercera experiencia pueden visualizarse en el gráfico de la figura 23.

En el gráfico puede observarse que, como cabía esperar, el control es el primero que se oxida. El resto de las emulsiones sigue sin oxidarse como mínimo dos días más.

En primer lugar se empiezan a oxidar los lisiantus, seguido de los pensamientos y los claveles. Al finalizar este experimento, no se considera que las emulsiones que contenían los extractos de rosas hayan empezado a oxidarse. La única excepción es la emulsión del pensamiento extraído con MeOH. Se empieza a oxidar después del control y podría ser debido a una separación de fase en las primeras horas.

Respecto a la influencia del disolvente con el que se ha realizado la extracción, no se observan diferencias frente a la capacidad de oxidación entre las emulsiones con extractos metanólicos y acetónicos, con excepción de los pensamientos.

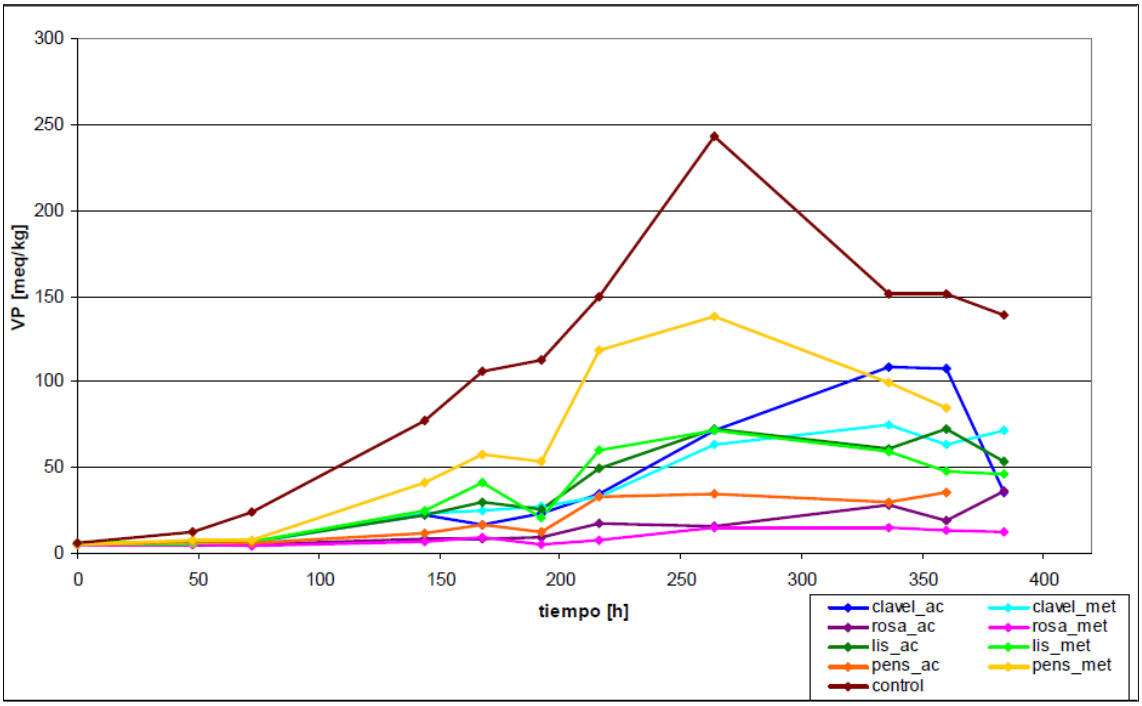


Figura 23. *Evolución del valor de peróxido en pensamientos, claveles, lisantus y rosas*

Se calcula el tiempo necesario para alcanzar la cantidad de 10 meq/kg en el ensayo de valor de peróxido. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Taula 7. *Tiempo necesario para alcanzar el valor 10 meq/kg* en el ensayo de valor de peróxido

Emulsión	Tiempo [h] necesario para alcanzar 10 meq/kg
control	31,4
pens_met	76,9
lis_met	85,5
lis_ac	86,6
clavel_ac	87,8
clavel_met	89,7
pens_ac	125,4
rosa_ac	205
rosa_met	233,2

En los extractos correspondientes al método de extracción completa descrita en el apartado 5.1. se determina la cantidad de polifenoles totales, TEAC y ORAC.

Para las extracciones simples, sin rotavaporación ni liofilización, se realiza los ensayos de TEAC, Flavonoides, antocianinas y barrido espectral.

5.2. Tratamiento inicial

5.2.1. Resultados: Clasificados por tipo de rosa

En este apartado se muestran los resultados de todas las determinaciones realizadas, agrupados por tipo de rosa. Se comparan los valores obtenidos con los dos disolventes utilizados y se analiza el estudio del color.

Los resultados se dividen en dos grupos, los de las extracciones completas y los resultados de las extracciones simples, cada uno de ellos con los disolventes utilizados.

Los valores de los ensayos con la extracción completa se expresan en meqTrolox o meq ácido gálico por gramos de muestra seca. En el caso de la extracción simple se expresan los resultados en meqTrolox o meq ácido gálico por L de extracto obtenido.

ROSA RITA

En las Tablas 8 y 9 aparecen los resultados numéricos obtenidos de la muestra de rosa Rita.

Tabla 8. *Resultados de rosa Rita, extracción completa.*

	Folin		TEAC		ORAC	
Extracción completa	mg ac.gálico/g	Desviación típica %	meq Trolox/g muestra seca	Desviación típica %	meq Trolox/g muestra seca	Desviación típica %
MetOH	305,84	8,32	591,44	13,29	654,72	9,43
MetOH pH 1	136,94	14,62	571,87	5,77	359,57	7,87

Tabla 9. *Resultados de rosa Rita, extracción simplificada.*

	TEAC		Flavonoides		Antocianinas	
Extracción simple	meq Trolox/L	Desviación típica %	Equivalente en mg rutina/mL	Desviación típica %	Equivalente en malvidin-3-glucósido/mL	Desviación típica %
MetOH	18,3516	13,96	0,961	2,24	0,195	1,04
MetOH pH 1	19,3253	9,33	0,689	1,81	0,265	4,06

Los polifenoles totales determinados en la muestra de rosa Rita se encuentran entre 136-306 mg ácido gálico/g muestra seca, siendo un valor más elevado con el extracto de MetOH sin ácido.

De la misma manera, los resultados de la actividad antioxidante de los extractos sin ácido son mayores que los extractos con MetOH a pH 1. Para TEAC se encuentran valores entre 572-590 meq Trolox/g muestra seca y para ORAC entre 360-654 meqTrolox/g muestra seca.

En cuanto a flavonoides y antocianinas, en la rosa Rita se obtiene entre 0,68-0,96 equivalente en mg rutina/mL de extracto en la determinación de flavonoides y 0,19-0,27 equivalente en malvidin-3-glucósido/mL de extracto para antocianinas. En estos casos los valores del extracto ácido son menores que el extracto sin ácido en flavonoides y mayor en antocianinas.

- Estudio del color

En el estudio del color se pretende definir el color de la muestra en su estado inicial (pétalo fresco), la tabla 10 expone las coordenadas del espacio color.

Tabla 10. *Coordenadas del color de rosa Rita.*

	Espacio Color		
	L	a	b
Pétalo fresco	80,695	1,71	15,81

A continuación aparece el barrido espectral de los extractos de rosa Rita. Se comparan los dos espectros para determinar si existe una variación de color cuando el medio es ácido. Se observan varios picos de absorción alrededor de 280, que podría corresponder a las absorciones de polifenoles. El resto no presenta picos remarcables.

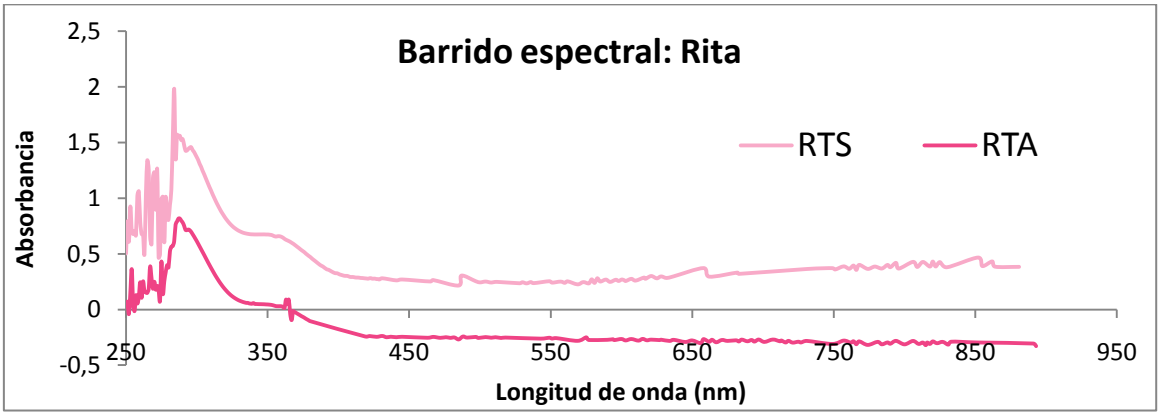


Figura 23. *Barrido espectral de rosa Rita.*

ROSA RIMINI

En las Tablas 11 y 12 aparecen los resultados numéricos obtenidos de la muestra de rosa Rimini.

Tabla 11. *Resultados de rosa Rimini, extracción completa.*

	Folin		TEAC		ORAC	
Extracción completa	mg ac.gálico/g	Desviación típica %	meq Trolox/g muestra seca	Desviación típica %	meq Trolox/g muestra seca	Desviación típica %
MetOH	21,63	6,58	700,23	10,59	454,40	21,49
MetOH pH 1	6,76	1,93	1043,10	5,50	791,77	9,08

Tabla 12. *Resultados de rosa Rimini, extracción simplificada.*

	TEAC		Flavonoides		Antocianinas	
Extracción simple	meq Trolox/L	Desviación típica %	Equivalente en mg rutina/mL	Desviación típica %	Equivalente en malvidin-3-glucósido/mL	Desviación típica %
MetOH	15,76	6,78	0,9198	4,43	0,2007	44,08
MetOH pH 1	15,18	9,49	0,7704	8,99	0,1810	2,85

Los polifenoles totales determinados en la muestra de rosa Rimini se encuentran entre 328-350 mg ácido gálico/g de muestra seca, siendo un valor más elevado con el extracto de MetOH a pH 1.

De la misma manera, los resultados de la actividad antioxidante de los extractos ácidos son mayores que los extractos sin ácido. Para TEAC se encuentran valores entre 700-1044 meq Trolox/g de muestra seca y para ORAC entre 45-80 meqTrolox/g de muestra seca.

En cuanto a flavonoides y antocianinas, en la rosa Rimini se obtiene entre 0,77-0,92 equivalente en mg rutina/mL de extracto en la determinación de flavonoides y 0,18-0,20 malvidin-3-glucósido/mL de extracto para antocianinas. En estos casos los valores del extracto ácido son menores que el extracto sin ácido en los dos ensayos.

- Estudio del color

En el estudio del color se pretende definir el color de la muestra en su estado inicial (pétalo fresco), la tabla 13 expone las coordenadas del espacio color.

Tabla 13. *Coordenadas del color de rosa Rimini.*

	Espacio Color		
	L	a	b
Pétalo fresco	78,945	2,09	59,59

En la figura 24 aparece el barrido espectral de los extractos de rosa Rimini. Aparece un ruido de fondo en absorbancias anteriores a 300 nm, lo que nos impide ver si hay absoroición característica de polifenoles. Cabe destacar que el medio ácido extrae mayor cantidad, lo cual se refleja en una absorbancia por encima del otro medio a lo largo de todo el barrido

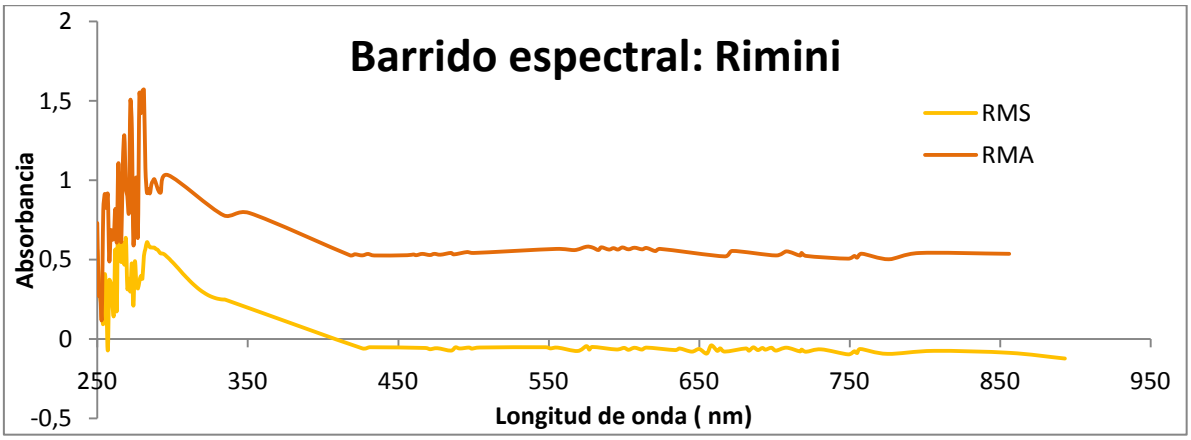


Figura 24. *Barrido espectral de rosa Rimini.*

ROSA AQUA

En las Tablas 14 y 15 aparecen los resultados numéricos obtenidos de la muestra de rosa Aqua.

Tabla 14. *Resultados de rosa Aqua, extracción completa.*

	Folin		TEAC		ORAC	
Extracción completa	mg ac.gálico/g	Desviación típica %	meq Trolox/g muestra seca	Desviación típica %	meq Trolox/g muestra seca	Desviación típica %
MetOH	335,00	1,38	708,31	4,22	356,40	16,75
MetOH pH 1	350,88	5,76	429,63	15,72	447,41	5,61

Tabla 15. *Resultados de rosa Aqua, extracción simplificada.*

	TEAC		Flavonoides		Antocianinas	
Extracción simple	meq Trolox/L	Desviación típica %	Equivalente en mg rutina/mL	Desviación típica %	Equivalente en malvidin-3-glucósido/mL	Desviación típica %
MetOH	14,70	13,95	1,3950	14,24	0,1143	4,21
MetOH pH 1	20,19	13,91	0,9958	16,08	0,2955	3,34

Los polifenoles totales determinados en la muestra de rosa Aqua se encuentran entre 335-351 mg ácido gálico/g de muestra seca, siendo un valor más elevado con el extracto de MetOH a pH 1.

Por otro lado, los resultados de la actividad antioxidante de los extractos ácidos son menores que los extractos sin ácido. Para TEAC se encuentran valores entre 429-709 meq Trolox/g de muestra seca y para ORAC entre 35-75 meqTrolox/g de muestra seca.

En cuanto a flavonoides y antocianinas, en la rosa Aqua se obtiene entre 0,99-1,40 equivalente de mg rutina/mL de muestra seca en la determinación de flavonoides y 0,21-0,37 malvidin-3-glucósido/mL de extracto para antocianinas. El extracto a pH 1 resulta tener una cantidad menor de flavonoides pero mayor de antocianinas que el otro extracto.

- Estudio del color

En el estudio del color se pretende definir el color de la muestra en su estado inicial (pétalo fresco), la tabla 16 expone las coordenadas del espacio color.

Tabla 16. *Coordenadas del color de rosa Aqua.*

	Espacio Color		
	L	a	b
Pétalo fresco	69,2	18,95	3,27

A continuación aparece el barrido espectral de los extractos de rosa Aqua. En este caso las dos absorciones son muy similares, tanto en pico como en concentración, lo que puede ser indicativo de que la cantidad extraída en ambos medios (ácido y no ácido) es muy similar. Además del ruido de fondo hay una absorción significativa a 350 nm, que podría ser algún derivado polifenólico

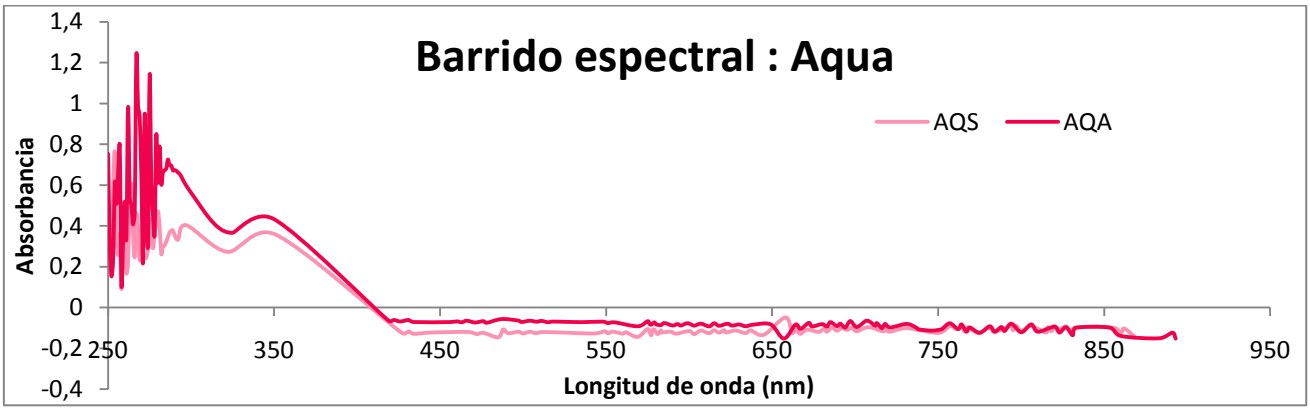


Figura 25. *Barrido espectral de rosa Aqua.*

ROSA AKITO

En las Tablas 17 y 18 aparecen los resultados numéricos obtenidos de la muestra de rosa Akito.

Tabla 17. *Resultados de rosa Akito, extracción completa.*

	Folin		TEAC		ORAC	
Extracción completa	mg ac.gálico/g	Desviación típica %	meq Trolox/g muestra seca	Desviación típica %	meq Trolox/g muestra seca	Desviación típica %
MetOH	363,98	5,25	411,94	13,15	447,41	34,72
MetOH pH 1	344,85	4,55	233,03	6,54	253,46	24,37

Tabla 18. *Resultados de rosa Akito, extracción simplificada.*

	TEAC		Flavonoides		Antocianinas	
Extracción simple	meq Trolox/L	Desviación típica %	Equivalente en mg rutina/mL	Desviación típica %	Equivalente en malvidin-3-glucósido/mL	Desviación típica %
MetOH	17,25	4,59	1,1886	7,72	0,0494	0,6417
MetOH pH 1	16,12	22,62	1,0528	4,91	0,0571	2,6140

Los polifenoles totales determinados en la muestra de rosa Akito se encuentran entre 344-364 mg ácido gálico/g de muestra seca, siendo un valor inferior con el extracto de MetOH a pH 1.

Por otro lado, los resultados de la actividad antioxidante de los extractos ácidos son menores que los extractos sin ácido. Para TEAC se encuentran valores entre 233-412 meq Trolox/g de muestra seca y para ORAC entre 25-45 meqTrolox/g de muestra seca.

En cuanto a flavonoides y antocianinas, en la rosa Akito se obtiene entre 1,05-1,19 equivalente de mg rutina/mL de muestra seca en la determinación de flavonoides y 0,13-0,15 malvidin-3-glucósido/mL de extracto para antocianinas. El extracto a pH 1 resulta tener una cantidad menor de flavonoides pero mayor de antocianinas que el otro extracto.

- Estudio del color

  En el estudio del color se pretende definir el color de la muestra en su estado inicial (pétalo fresco), la tabla 19 expone las coordenadas del espacio color.

Tabla 19. *Coordenadas del color de rosa Akito.*

	Espacio Color		
	L	a	b
Pétalo fresco	85,06	-4,04	15,5

A continuación aparece el barrido espectral de los extractos de rosa Akito. Las dos absorciones son muy similares, tanto en pico como en concentración, lo que puede ser indicativo de que la cantidad extraída en ambos medios (ácido y no ácido) es muy similar. Además del ruido de fondo hay una absorción significativa a 280 y 350 nm, que podría ser algún derivado polifenólico.

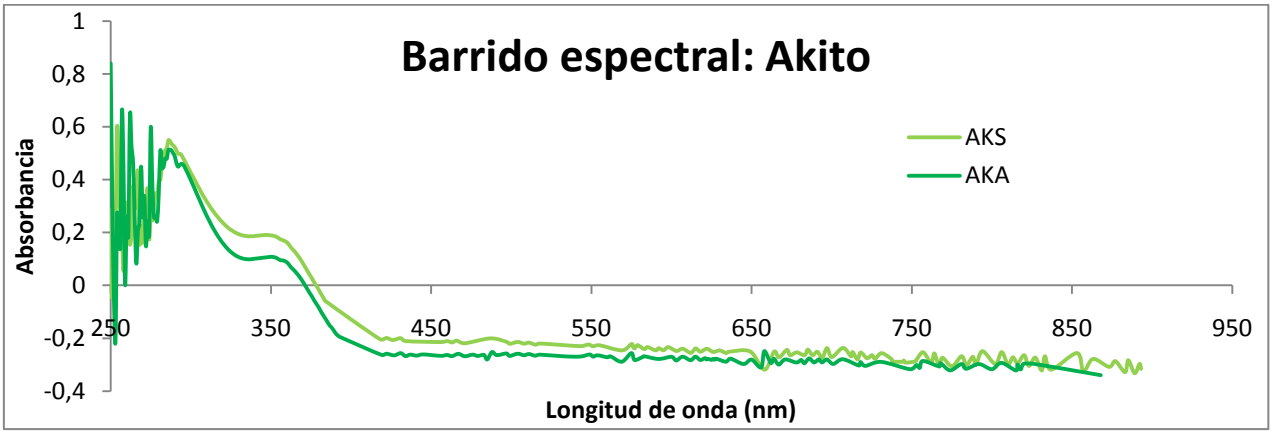


Figura 26. *Barrido espectral de rosa Akito.*

ROSA VANESSA

En las Tablas 20 y 21 aparecen los resultados numéricos obtenidos de la muestra de rosa Vanessa.

Tabla 20. *Resultados de rosa Vanessa, extracción completa.*

	Folin		TEAC		ORAC	
Extracción completa	mg ac.gálico/g	Desviación típica %	meq Trolox/g muestra seca	Desviación típica %	meq Trolox/g muestra seca	Desviación típica %
MetOH	351,78	7,75	520,50	10,23	282,18	18,21
MetOH pH 1	332,86	15,63	563,94	10,23	289,10	10,01

Tabla 21. *Resultados de rosa Vanessa, extracción simplificada.*

	TEAC		Flavonoides		Antocianinas	
Extracción simple	meq Trolox/ L	Desviación típica %	Equivalente en mg rutina/mL	Desviación típica %	Equivalente en malvidin-3-glucósido/mL	Desviación típica %
MetOH	14,66	17,83	0,6482	4,76	0,0853	3,6435
MetOH pH 1	17,63	18,25	0,5586	7,48	0,1718	4,8635

Los polifenoles totales determinados en la muestra de rosa Vanessa se encuentran entre 332-352 mg ácido gálico/g de muestra seca, siendo un valor inferior con el extracto de MetOH a pH 1.

Por otro lado, los resultados de la actividad antioxidante de los extractos ácidos son mayores que los extractos sin ácido, pero muy similares. Para TEAC se encuentran valores entre 520-564 meq Trolox/g de muestra seca y para ORAC entre 28-29 meqTrolox/g de muestra seca.

En cuanto a flavonoides y antocianinas, en la rosa Vanessa se obtiene entre 0,55-0,65 equivalente de mg rutina/mL de muestra seca en la determinación de flavonoides y 0,18-0,28 malvidin-3-glucósido/mL de extracto para antocianinas. El extracto a pH 1 resulta tener una cantidad menor de flavonoides pero mayor de antocianinas que el otro extracto.

- Estudio del color

  En el estudio del color se pretende definir el color de la muestra en su estado inicial (pétalo fresco), la tabla 22 expone las coordenadas del espacio color.

Tabla 22. *Coordenadas del color de rosa Vanessa.*

	Espacio Color		
	L	a	b
Pétalo fresco	67,575	11,305	12,775

A continuación aparece el barrido espectral de los extractos de rosa Vanessa. Las dos absorciones son muy similares, lo que puede ser indicativo de que la cantidad extraída en ambos medios (ácido y no ácido) es muy similar. Aparece un pico alrededor de 280, que podría corresponder a las absorciones de polifenoles.

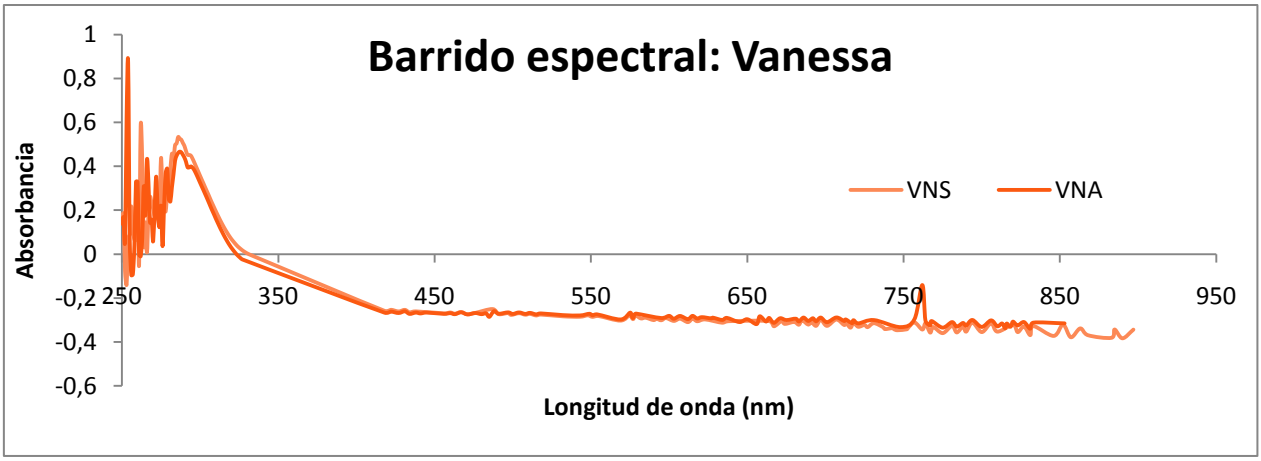


Figura 27. *Barrido espectral de rosa Vanessa.*

ROSA SATISFACTION

En las Tablas 23 y 24 aparecen los resultados numéricos obtenidos de la muestra de rosa Satisfaction.

Tabla 23. *Resultados de rosa Satisfaction, extracción completa.*

	Folin		TEAC		ORAC	
Extracción completa	mg ac.gálico/g	Desviación típica %	meq Trolox/g muestra seca	Desviación típica %	meq Trolox/g muestra seca	Desviación típica %
MetOH	307,69	5,80	680,19	22,44	447,11	7,17
MetOH pH 1	313,60	3,50	365,16	13,37	196,15	25,42

Tabla 24. *Resultados de rosa Satisfaction, extracción simplificada.*

	TEAC		Flavonoides		Antocianinas	
Extracción simple	meq Trolox/L	Desviación típica %	Equivalente en mg rutina/mL	Desviación típica %	Equivalente en malvidin-3-glucósido/mL	Desviación típica %
MetOH	15,21	24,21	0,4038	3,08	0,0735	5,1620
MetOH pH 1	11,66	16,03	0,3196	3,89	0,1201	4,2413

Los polifenoles totales determinados en la muestra de rosa Satisfaction se encuentran entre 307-314 mg ácido gálico/g de muestra seca, siendo un valor superior el del extracto de MetOH a pH 1.

Por otro lado, los resultados de la actividad antioxidante de los extractos ácidos son menores que los extractos sin ácido. Para TEAC se encuentran valores entre 365-680 meq Trolox/g de muestra seca y para ORAC entre 19-45 meqTrolox/g de muestra seca.

En cuanto a flavonoides y antocianinas, en la rosa Satisfaction se obtiene entre 0,31-0,41equivalente de mg rutina/mL de muestra seca en la determinación de flavonoides y 0,16-0,22 malvidin-3-glucósido/mL de extracto para antocianinas. El extracto a pH 1 resulta tener una cantidad menor de flavonoides pero mayor de antocianinas que el otro extracto.

- Estudio del color

  En el estudio del color se pretende definir el color de la muestra en su estado inicial (pétalo fresco), la tabla 25 expone las coordenadas del espacio color.

Tabla 25. *Coordenadas del color de rosa Satisfaction.*

	Espacio Color		
	L	a	b
Pétalo fresco	66,395	9,585	23,94

A continuación aparece el barrido espectral de los extractos de rosa Satisfaction. Las dos absorciones son muy similares, lo que puede ser indicativo de que la cantidad extraída en ambos medios (ácido y no ácido) es muy similar. Aparece un pico alrededor de 280, que podría corresponder a las absorciones de polifenoles.

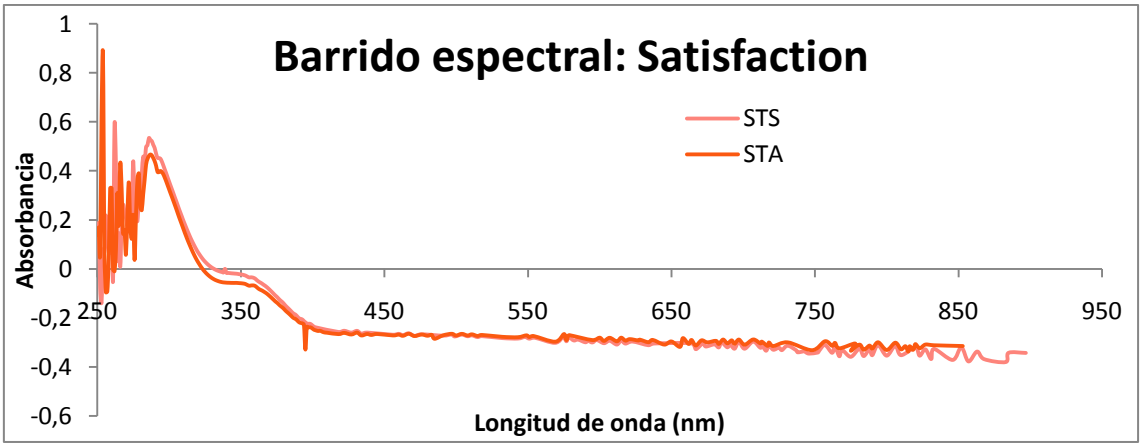


Figura 28. *Barrido espectral de rosa Satisfaction.*

ROSA GRAN GALA

En las Tablas 26 y 27 aparecen los resultados numéricos obtenidos de la muestra de rosa Gran Gala.

Tabla 26. *Resultados de rosa Gran Gala, extracción completa.*

	Folin		TEAC		ORAC	
Extracción completa	mg ac.gálico/g	Desviación típica %	meq Trolox/g muestra seca	Desviación típica %	meq Trolox/g muestra seca	Desviación típica %
MetOH	203,72	0,41	610,02	18,65	396,55	66,54
MetOH pH 1	277,18	0,00	800,54	12,46	689,07	7,02

Tabla 27. *Resultados de rosa Gran Gala, extracción completa.*

	TEAC		Flavonoides		Antocianinas	
Extracción simple	meq Trolox/L	Desviación típica %	Equivalente en mg rutina/mL	Desviación típica %	Equivalente en malvidin-3-glucósido/mL	Desviación típica %
MetOH	17,95	1,94	0,3223	12,72	0,2276	9,2396
MetOH pH 1	22,10	0,28	0,3875	10,79	1,7185	0,0000

Los polifenoles totales determinados en la muestra de rosa Gran Gala se encuentran entre 203-277 mg ácido gálico/g de muestra seca, siendo un valor superior el del extracto de MetOH a pH 1.

De la misma manera, los resultados de la actividad antioxidante de los extractos ácidos son mayores que los extractos sin ácido. Para TEAC se encuentran valores entre 610-801 meq Trolox/g de muestra seca y para ORAC entre 39-69 meqTrolox/g de muestra seca.

En cuanto a flavonoides y antocianinas, en la rosa Gran Gala se obtiene entre 0,32-0,39 equivalente de mg rutina/mL de muestra seca en la determinación de flavonoides y 0,31-0,98 malvidin-3-glucósido/mL de extracto para antocianinas. El extracto a pH 1 resulta tener una cantidad mayor de flavonoides y de antocianinas (de antocianinas muy superior) que el otro extracto.

- Estudio del color

En el estudio del color se pretende definir el color de la muestra en su estado inicial (pétalo fresco), la tabla 28 expone las coordenadas del espacio color.

Tabla 28. *Coordenadas del color de rosa Gran gala.*

	Espacio Color		
	L	a	b
Pétalo fresco	31,28	50,72	21,695

A continuación aparece el barrido espectral de los extractos de rosa Gran Gala. Las dos absorciones son prácticamente idénticas, lo que puede ser indicativo de que la cantidad extraída en ambos medios (ácido y no ácido) es muy similar. Aparece un pico alrededor de 280, que podría corresponder a las absorciones de polifenoles.

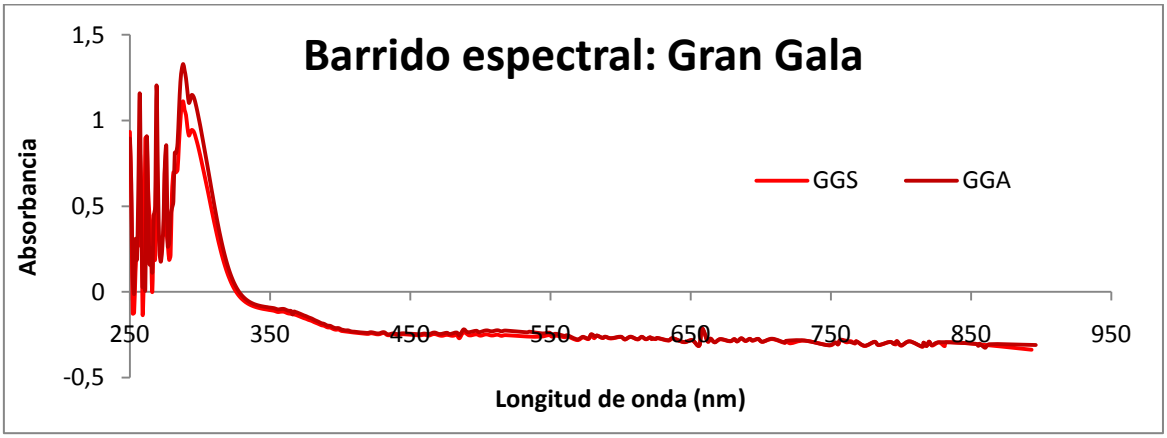


Figura 29. *Barrido espectral de rosa Gran Gala.*

5.2.2. Resultados de Folin Ciocalteu

Se realiza el análisis de polifenoles totales siguiendo el método Folin-Ciocalteu descrito en el apartado 5.5. La representación de los resultados obtenidos se expone en el gráfico de la figura 30. Corresponden a los resultados de los extractos realizados con el método explicado en el apartado 5.1., extracción completa.

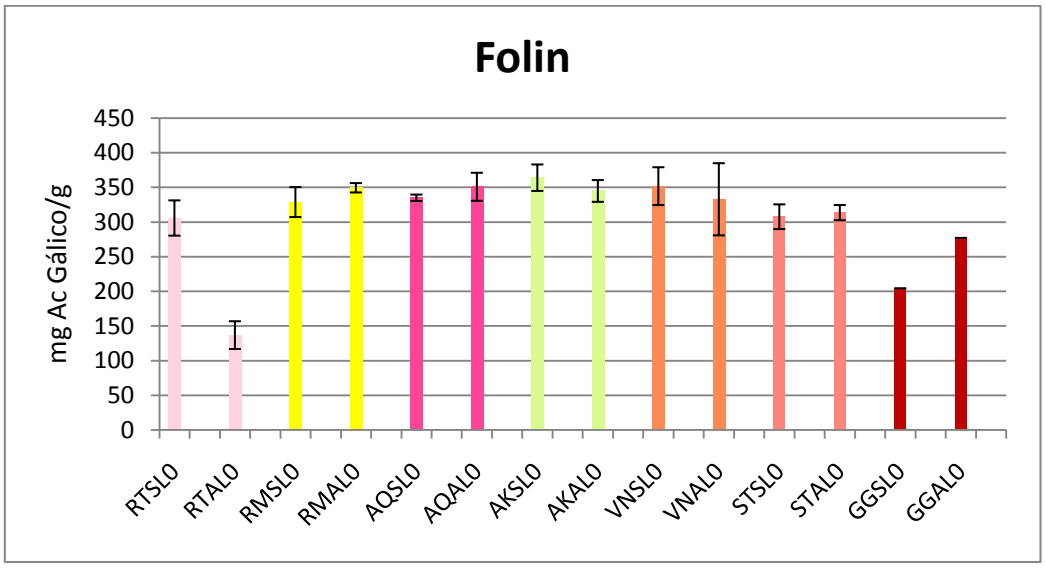


Figura 30. *Ensayo Folin- Ciocalteu de las flores estudiadas.*

Se muestran los resultados de los extractos de los siete tipos de rosa estudiados (Rita, Rimini, Aqua, Akito, Vanessa, Satisfaction y Gran Gala) con los dos tipos de disolventes utilizados (MetOH y MetOH a pH 1).

Los valores más elevados de polifenoles totales (expresados como equivalentes en mg de ácido gálico/g muestra seca) corresponden a los extractos obtenidos a partir de pétalos de rosa Akito y los más bajos a los de los pétalos de rosa Rita y Gran Gala.

El valor más elevado corresponde a la rosa de color blanco Akito de extracto sin ácido y se encuentra por encima de 360 eq en mg AG/g muestra. El valor mínimo, por debajo de 205 eq en mg AG/g muestra pertenece a la rosa más oscura Gran Gala del extracto sin ácido.

5.2.3. Resultados de TEAC

Para la realización de este ensayo, se ha proseguido tal y como se describe en el apartado 5.6., obteniendo los resultados representados en la figura 31. Corresponden a los resultados de los extractos realizados con el método explicado en el apartado 5.1., extracción completa.

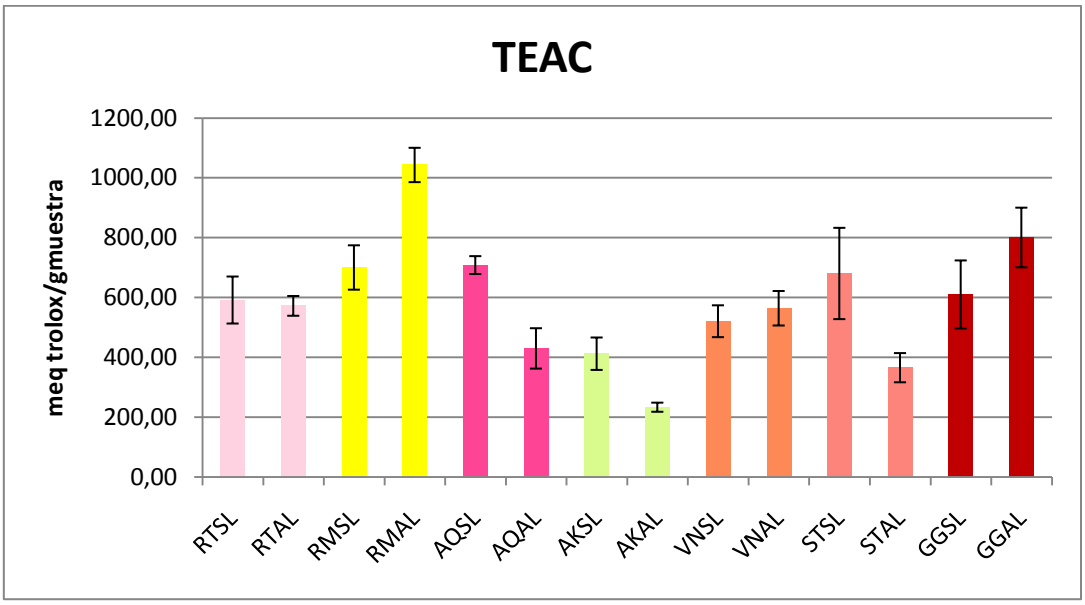


Figura 31. *Ensayo TEAC de las flores estudiadas.*

Se muestran los resultados del ensayo TEAC para los extractos con MetOH y MetOH a pH 1 de pétalos secos de las rosas Rita, Rimini, Aqua, Akito, Vanessa, Satisfaction y Gran Gala.

Los resultados son muy distintos a los obtenidos en el apartado anterior, por lo que no se encuentra correlación entre ambos métodos.

Los valores más elevados de capacidad antioxidante (expresados como equivalentes en mg de meqTrolox/g muestra seca) corresponden a los extractos obtenidos a partir de pétalos de rosa Rimini, Aqua y Gran Gala y los más bajos a los de los pétalos de rosa Akito, todo lo contrario al ensayo anterior.

El valor más elevado corresponde a la rosa de color amarillo Rimini de extracto ácido y se encuentra por encima de 1000 meqTrolox/g muestra. El valor mínimo, por debajo de 235 meqTrolox /g muestra pertenece a la rosa blanca Akito del extracto ácido.

Existen diferencias entre todos los tipos de rosa estudiados, posiblemente se debe a que los compuestos que presentan un color característico son diferentes y proporcionan distinta actividad antioxidante.

5.2.4. Resultados de ORAC

Para la realización de este ensayo, se ha proseguido tal y como se describe en el apartado 5.7., obteniendo los resultados representados en la figura 32. Corresponden a los resultados de los extractos realizados con el método explicado en el apartado 5.1., extracción completa.

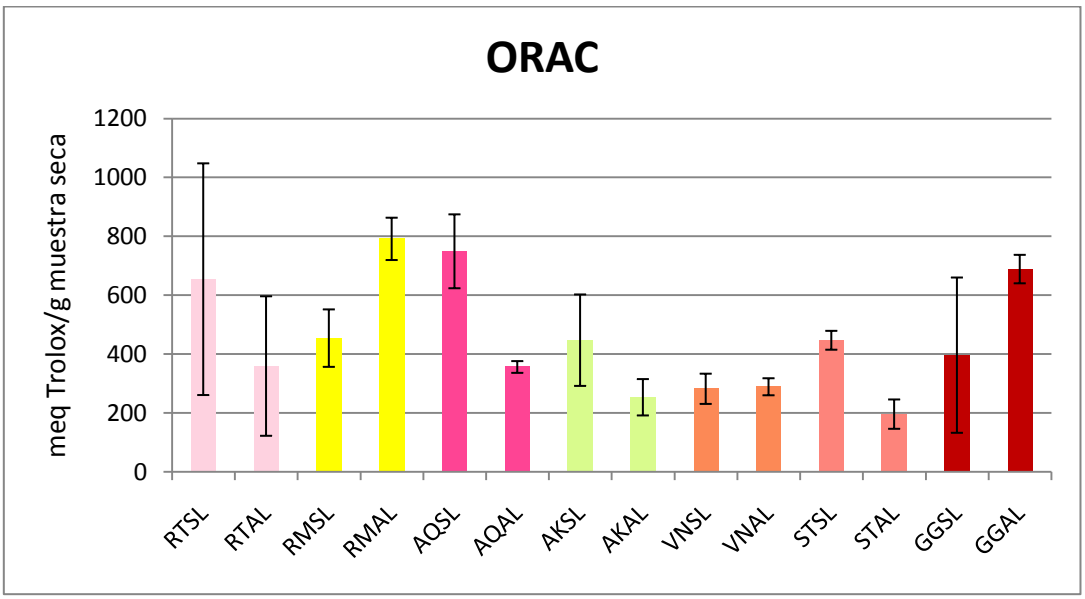


Figura 32. *Ensayo ORAC de las flores estudiadas.*

Se muestran los resultados del ensayo ORAC para los extractos con Metoh y MetOH a pH 1 de pétalos secos de las rosas Rita, Rimini, Aqua, Akito, Vanessa, Satisfaction y Gran Gala.

Los resultados son parecidos a los obtenidos en el apartado anterior, existiendo una correlación entre ambos métodos.

Los valores más elevados de capacidad antioxidante (expresados como equivalentes en meqTrolox/g muestra seca) corresponden a los extractos obtenidos a partir de pétalos de rosa Rita, Rimini, Aqua y Gran Gala y los más bajos a los de los pétalos de rosa Vanessa.

El valor más elevado corresponde a la rosa de color amarillo Rimini de extracto ácido y se encuentra por encima de 79 eqTrolox/g muestra, en cambio el valor de la rosa Aqua (color rosa intenso), también de los más elevados, se encuentra por encima de los 74 eqTrolox/g muestra pero con el extracto sin ácido. El valor mínimo, por debajo de 29 eqTrolox /g de

muestra pertenece a la rosa Vanessa de ambos extractos con resultados similares.

Existen diferencias entre todos los tipos de rosa estudiados, posiblemente se debe a que los compuestos que presentan un color característico son diferentes y proporcionan distinta actividad antioxidante.

Entre los dos métodos de la actividad antioxidante existen similitudes, especialmente si prescindimos de las rosas más claras (que son las que han dado mayor error), cuyos resultados no concuerdan con los anteriores. En la figura 33 Se muestra la correlación para las rosas Rimini, Vanessa, Satisfaction y Gran Gala.

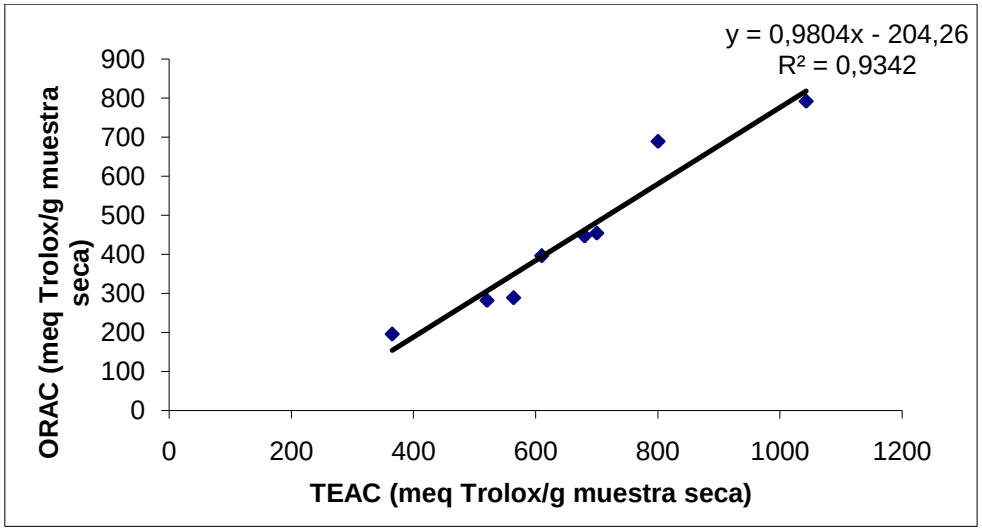


Figura 33. *Correlación TEAC vs ORAC*

5.2.5. Resultados de Flavonoides

Para la realización de este ensayo, se ha proseguido tal y como se describe en el apartado 5.9., obteniendo los resultados representados en la figura 34. Corresponden a los extractos realizados con el método explicado en el apartado 5.2., extracción simplificada.

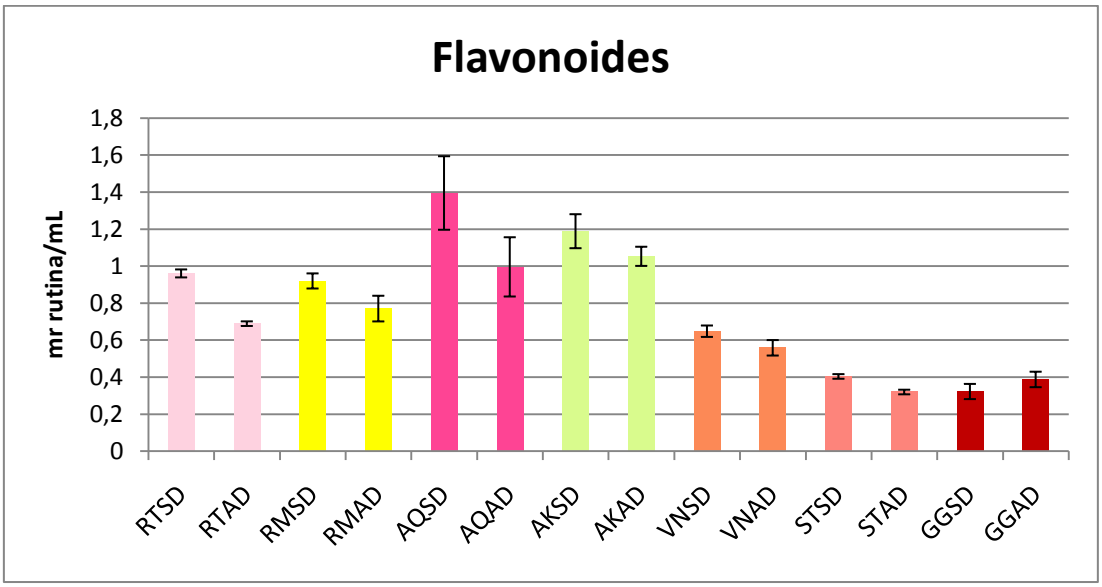


Figura 34. *Ensayo Flavonoides de las flores estudiadas.*

Se muestran los resultados del ensayo de determinación de Flavonoides para los extractos con MetOH y MetOH a pH 1 de pétalos secos de las rosas Rita, Rimini, Aqua, Akito, Vanessa, Satisfaction y Gran Gala.

Los valores más elevados de flavonoides (expresados como equivalentes en mg de rutina/g muestra seca) corresponden a los extractos obtenidos a partir de pétalos de rosa Aqua y Akito y los más bajos a los de los pétalos de rosa Satisfaction y Gran Gala.

El valor más elevado corresponde a la rosa de color rosa intenso Aqua, de extracto sin ácido, y se encuentra por encima de 1,30 mg rutina/mL muestra, el valor de la rosa Akito (color blanco), también de los más elevados, se encuentra por encima de los 1,18 mg rutina/mL con el extracto sin ácido. El valor mínimo, por debajo de 0,32 mg rutina/mL de muestra pertenece a la rosa Satisfaction en medio ácido, en cambio la rosa Gran Gala obtiene en el extracto sin ácido, el segundo valor más pequeño, por debajo de 0,33 mg rutina/mL de muestra. Ello nos indica que en la extracción de flavonoides no influye,no hay correlación ni el color ni el método empleado (con o sin ácido).

5.2.6. Resultados de Antocianinas

Para la realización de este ensayo, se ha proseguido tal y como se describe en el apartado 5.8., obteniendo los resultados representados en la figura35. Corresponden a los extractos realizados con el método explicado en el apartado 5.2., extracción simplificada.

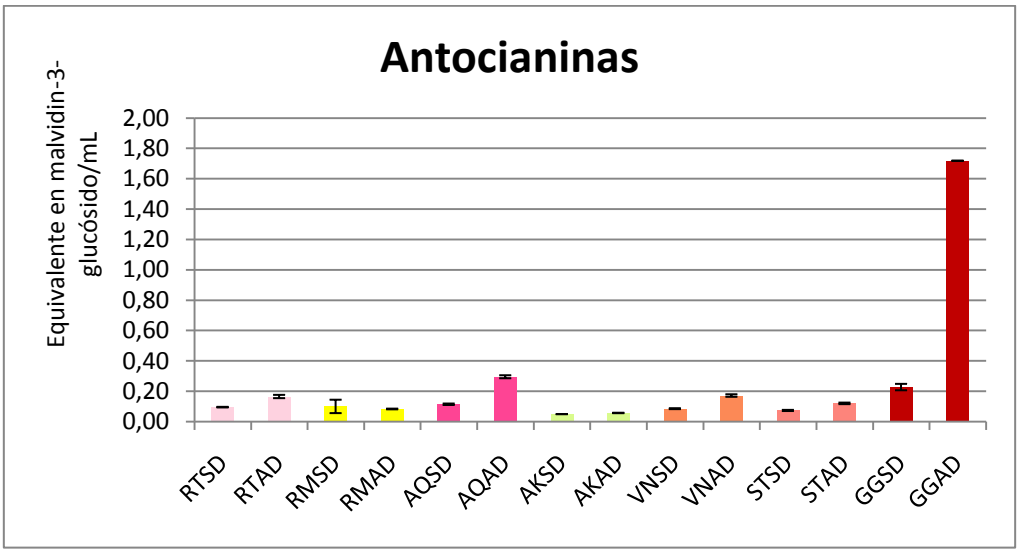


Figura 35. *Ensayo Antocianinas de las flores estudiadas.*

Se muestran los resultados del ensayo de determinación de Antocianinas para los extractos con MetOH y MetOH a pH 1 de pétalos secos de las rosas Rita, Rimini, Aqua, Akito, Vanessa, Satisfaction y Gran Gala.

El valor más elevado, con una diferencia significativa es el del extracto obtenido a partir de la rosa Gran Gala con el disolvente ácido, superando el valor de 1,7 malvidin-3-glucósido/mL de extracto de antocianinas. Ello responde a lo que cabía esperar, ya que las antocianinas son las responsables del color rojo oscuro y son estables en medio ácido.

Para poder observar mejor el resto de resultados en la figura 36 se representan gráficamente los resultados de las demás rosas incluyendo Gran Gala con extracción sin ácido.

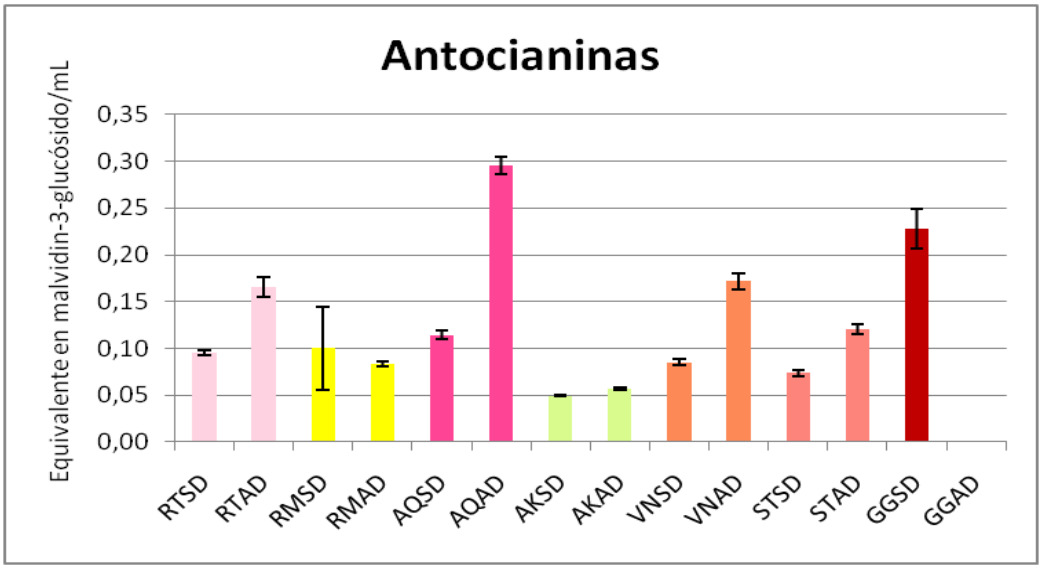


Figura 36. *Ensayo Antocianinas de las flores estudiadas sin resultado de GGA.*

De nuevo se observa que los valores de los extractos ácidos son superiores a los extractos sin ácidos. En algunos extractos como el de rosa Aqua (color rosa intenso) el resultado del extracto ácido es muy elevado en comparación al otro extracto, al igual que sucedía en la Gran Gala. Podría ser debido a que a mayor cantidad de antocianinas, se observa más la diferencia por la estabilidad que presentan en el medio ácido. En cantidades pequeñas no hay casi diferencias.

En la tabla 29 Se recogen todos los valores obtenidos de los diferentes análisis. En la figura 37 se representa la correlación entre la coordenada a del color y las antocianinas solo de los extractos en medio ácidos y prescindiendo de los valores de las rosas más claras . Se observa que existe una linealidad con un R=0,93.

Tabla 29. *Resumen de resultados de algunos ensayos.*

	L	a	b	ORAC	TEAC	PT	Antocianinas	Flavonoides
RTSL	80,7	1,71	15,81	654,72	591,44	305,84	0,1950	0,9610
RTAL				359,57	571,87	136,94	0,2650	0,6890
RMSL	78,95	2,09	59,59	454,40	700,23	21,63	0,2007	0,9198
RMAL				791,77	1043,10	6,76	0,1810	0,7704
AQSL	69,2	18,95	3,27	356,40	708,31	335,00	0,1143	1,3950
AQAL				447,41	429,63	350,88	0,2955	0,9958
AKSL	85,06	-4,04	15,5	447,41	411,94	363,98	0,0494	1,1886
AKAL				253,46	233,03	344,85	0,0571	1,0528
VNSL	67,58	11,31	12,78	282,18	520,50	351,78	0,0853	0,6482
VNAL				289,10	563,94	332,86	0,1718	0,5586
STSL	66,4	9,585	23,94	447,11	680,19	307,69	0,0735	0,4038
STAL				196,15	365,16	313,60	0,1201	0,3196
GGSL	31,28	50,72	21,7	396,55	610,02	203,72	0,2276	0,3223
GGAL				689,07	800,54	277,18	1,7185	0,3875

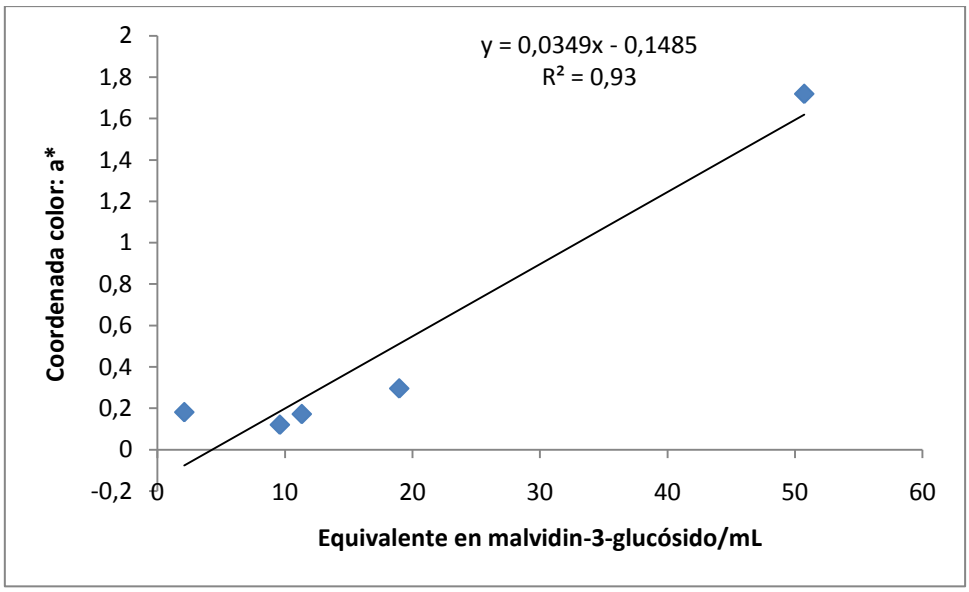


Figura 37. *Correlación entre coordenada a* vs Antocinaninas (de las rosas Rimini, Aqua, Vanessa, Satisfaction y Gran Gala).*

Entre el resto de determinaciones no parece haber ninguna correlación con las coordenadas de color.

5.2.7. Resumen de resultados

En la tabla 30 se resumen los resultados expuestos en los apartados anteriores. Se muestran los valores de polifenoles totales, actividad antioxidante, flavonoides y antocianinas de los distintos tipos de rosas, Rita, Rimini, aqua, Akito, Vanessa, Satisfaction y Gran Gala.

Tabla 30. *Resumen de resultados.*

		Polifenoles Totales	Capacidad antioxidante			
		Folin	TEAC	ORAC	Flavonoides	Antocianinas
	Unidades	mg ac.gálico/g	meq Trolox/g	eq Trolox/g	mgrutina/mL	
Muestras	Rita		572-590	30-36	0,68-0,96	0,19-0,27
	Rimini	328-350	700-1044	45-80	0,77-0,92	0,18-0,20
	Aqua	335-351	429-709	35-75	0,99-1,40	0,21-0,37
	Akito	344-364	233-412	25-45	1,05-1,19	0,13-0,15
	Vanessa	332-352	520-564	28-29	0,55-0,65	0,18-0,28
	Satisfaction	307-314	365-680	19-45	0,31-0,41	0,16-0,22
	Gran Gala	203-277	610-801	39-69	0,32-0,39	0,31-0,98

valor más elevado

CAPÍTULO 6: PRESUPUESTO

Se establecen una serie de resultados simplificados para evaluar económicamente el proyecto.

Las operaciones de cada ensayo tienen en cuenta diversos gastos, de los cuales se tendrán en cuenta los siguientes.

- Costes de material fungible de laboratorio.
- Costes de otros materiales básicos de laboratorio.
- Costes de maquinaria (amortizaciones).
- Costes de reactivos.
- Costes de agua.
- Costes de energía.
- Costes de personal.

6.1. Material fungible

Se considera material fungible a aquel material de laboratorio que después de utilizarlo queda inservible para otros ensayos.

Tabla 31. *Coste del material fungible (IVA incluido).*

Material	Precio	Precio total €
Guantes	3'49€/100u	3,49
Pipetas Pasteur	9'75€/250u	9,75
Eppendorf	9,75€/1000u	2,93
Puntas (10-200µL)	10'00€/1000u	10,00
Puntas (1-5mL)	20'00€/250u	20,00
Cinta adhesiva	1'5€/1u	1,50
Papel de aluminio	2'00€/1u	2,00
TOTAL		49,67

6.2. Material básico de laboratorio

A este tipo de material se le asocia un coste de amortización, que corresponde al precio del desgaste que sufre en función del tiempo. Cada material tiene un tiempo de vida aproximado, y la parte proporcional del tiempo empleado en el proyecto, es el coste de cada objeto.

Tabla 32. *Amortización del material habitual de laboratorio (IVA incluido).*

Material	Cantidad	Vida útil(año)	Precio/unidad	Precio amortización €
Matraz aforado(250ml)	1	2	25,50 €	6,38
Matraz aforado(50ml)	2	2	2,39 €	0,60
Espátula	1	2	4,80 €	1,20
Probeta 1L	1	2	14,60 €	3,65
Balón (250ml)	3	2	15,60 €	3,90
Cubetas (4,5mL)		0,5	59,00 €	59,00
Gradilla	1	2	4,20 €	1,05
Pipeta autom. (10-100µL)	1	3	60,95 €	10,16
Pipeta autom. (1-5mL)	1	3	60,95 €	10,16
Pipeta multicanal	1	3	325,00 €	54,17
Erlermeyer (250ml)	1	2	1,76 €	0,44
Kitasatos (500mL)	1	2	13,00 €	3,25
Embudo	1	2	2,85 €	0,71
Soporte	1	2	11,00 €	2,75
Pinzas	2	2	5,30 €	1,33
Nuez	2	2	3,40 €	0,85
Frasco topacio (30mL)	87	1	0,25 €	0,13
Bata	1	2	15,00 €	3,75
Gafas	1	2	5,00 €	1,25
TOTAL €				164,71

6.3. Maquinaria

Las máquinas necesarias, igual que el material habitual de laboratorio tiene una vida útil, pero en este caso más duradera. Su coste es en función del tiempo.

Tabla 33. *Amortización de máquinas (IVA incluido).*

Material	Cantidad	Vida útil(año)	Precio/unidad	Precio amortización €/año
Milipore	1	10	2955	147,75
Bomba de aceite	1	10	211,15	10,56
Espectrofotómetro	1	10	5600	280,00
Rotavapor	1	8	1112,4	69,53
Liofilizador	1	10	7012,76	350,64
pH metro	1	6	218	18,17
Agitador magnético	2	6	456,17	38,01
Centrífuga	1	10	1797,05	89,85
Baño de precisión	1	10	931,5	46,58
Balanza analítica	1	10	123,4	6,17
Congelador	1	10	1698	84,90
Fluorímetro	1	10	19600	980,00
Estufa	1	8	645,00	40,31
Sonicador	1	8	4700,00	293,75
TOTAL				2456,21

6.4. Reactivos

Tabla 34. *Reactivos utilizados (IVA incluido).*

Reactivo	Cantidad usada	Casa comercial	Precio unidad	Precio total €
Metanol	2L	Panreac	16,4 € / 1L	32,80
HCl 37%	50mL	Panreac	52,2€ / 500mL	5,22
Folin-cicloteau	16mL	Panreac	44€/250ml	2,82
Carbonato de sodio anhidro	50g	Panreac	27,60€/500g	2,76
PBS	1 sobre	Sigma-Aldrich	50,82 € /10 sobres	5,08
Trolox	3g	Sigma-Aldrich	129€/5g	77,40
Ácido gálico	0,3g	Sigma-Aldrich	47,70€/100g	0,14
ABTS	0,1g	Sigma-Aldrich	173,5€ / 5g	3,47
AAPH	2g	Sigma-Aldrich	23€/25g	1,84
Flurosceina	0,5g	Fluka	15,70€/25g	0,31
Persulfato Potásico	1g	Sigma-Aldrich	52,60 € / 500 g	0,11
Ácido acético	3mL	Panreac	32,90€/1L	0,10
Cloruro de hierro (II)	1g	Sigma-Aldrich	69,60€/25g	2,80
Tiocianato de amonio	1g	Sigma-Aldrich	30,30€/500g	1,80
Óxido de aluminio	1kg	Panreac	47,60€/500g	95,20
Etanol Absoluto	100mL	Panreac	19,80€/1L	2,0
TOTAL				233,85

6.5. Agua

Se tiene en cuenta el consumo de agua para los ensayos, limpieza, etc. Correspondería aproximadamente 0,1m3agua/hora El precio de agua corresponde a las Tarifas de uso Industrial o Comercial del 2009 d'Aigües de Barcelona.

Para encontrar el coste solo se ha considerado el consumo en los servicios del ciclo del agua, no se contará con la cuota de servicio, el canon del agua ni de cloaca, tampoco otrs tipos de servicios.

Se supone la utilización de contadores sobre batería y el Caudal Nominal de Subministro mínimo, que es de 1,00 m3/hora a 7,12 €/mes, por lo tanto el precio de consumo, será solo el de Tramo 1 (incluye los primeros 12 m3/mes)ya que no se superan, que son 0,6359€/m3.

Tabla 35. *Consumo de agua (IVA incluido).*

Material	Consumo m3/h	horas	Precio €/m3	IVA consumo 7%	Coste total€
Agua	0,1	145	0,6359	0,044513	9,87

6.6. Energía

Potencia contratada: 3,5 kW

Tabla 36. *Coste de consumo eléctrico.*

Concepto	Cálculos	Importe
Potencia	3,5 KW* 1,52/KW	5,32
Consumo	27 KW/h * 0,09·h/Kw	2,43
	Subtotal	7,75
Impuesto	7,75 * 1.05113 * 4,864%	0,40
Alquiler de los equipos	1 * 0,54	0,54
	Base Imponible	16,44
IVA	16%	2,63
TOTAL		19,07

6.7. Personal

Para el cálculo de los gastos de personal se han simulado dos tipos de contratos, el del estudiante (contrato de empleado titulado en período de prácticas) y del profesorado (contrato de empleado titulado superior) responsable de la supervisión del trabajo del estudiante.

Se debe contabilizar no sólo lo que ganan los titulados (sueldo bruto) sino también la parte que pagaría la empresa por empleado en concepto de seguridad social.

Como se trabaja en el ámbito de la industria química, el Sueldo Bruto Anual equivale al Sueldo Mínimo Garantizado (SMG) según el vigente convenio colectivo, el XV Convenio General de la Industria Química. Cada contrato con su correspondiente SMG del grupo profesional al que pertenecen.

Sueldo bruto anual de Titulados Técnicos: 21.456,14 €/año

Sueldo bruto anual de Titulados Superiores: 33.057,38 €/año

El contrato de titulado técnico en periodo de prácticas, implica que el SBA (sueldo bruto anual) corresponda al 60% del SMG.

SS corresponde a los gastos de seguridad social, que significa el 32% del SBA.

Tabla 37. *Coste de personal.*

	Horas de trabajo	SBA	SS	Gasto de personal
Titulado técnico	202	12.873,68	4119,58	1806,652159
Titulado superior	30	33.057,38	10578,4	688,9853937
			TOTAL	2495,637553

6.8. Presupuesto total

El resultado del presupuesto es el sumatorio de todos los gastos expuestos, que se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 38. *Cálculo del coste total.*

	€
Costes de material fungible de laboratorio.	49,67
Costes de otros materiales básicos de laboratorio.	164,71
Costes de maquinaria (amortizaciones).	2456,21
Costes de reactivos	233,85
Costes de agua	9,87
Costes de Energía	19,07
Costes de Personal	2495,64
TOTAL	5429,02

El coste total del proyecto es aproximadamente de 5400 €.

CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo experimental, referidas pétalos de rosa de distintos tipos estudiados son:

1. Se ha determinado que los extractos de pétalos de flores presentan actividad protectora frente a la oxidación del aceite en el seno de una emulsión de aceite en agua. La rosa roja, extraída en extracto metanólico al 50 %, retrasa más de 7 veces el tiempo que tarda en alcanzar el valor de meq de hidroperóxidos/kg de emulsión (233 horas, frente a las 31 horas que tarda el control)

2. Se han analizado las coordenadas cromáticas (l, a y b) de 7 tipos diferentes de rosas. También se han analizado los espectros (entre 200 y 900 nm) de los extractos metanólicos y metanólicos acidificados. Los espectros no han proporcionado una información extrapolable a la actividad antioxidante

3. Se han evaluado los polifenoles totales de los extractos liofilizados de los 7 tipos de rosas. Los valores están comprendidos entre 203 mg de ácido gálico/g de muestra seca para el más bajo y 364 mg de ácido gálico/g de muestra seca para el más alto.

4. Se ha determinado la actividad antioxidante por dos métodos, el TEAC y el ORAC. Existe una correlación entre ambos con un R=0,93, si se prescinde de los colores más claros. La flor con mayor actividad antioxidante es la rosa Rimini de color amarillo, seguida de la rosa Gran Gala de color rojo oscuro.

5. En la extracción directa se han evaluado las antocianinas totales y los flavonoides, tanto en medio ácido como en medio metanólico. Todos los extractos ácidos presentan mayor cantidad de antocianinas.

6. Existe una correlación entre la coordenada a del color y las antocianinas, se ha observado en los extractos en medio ácidos sin tener en cuenta los valores de las rosas más claras. Hay una linealidad con un R=0,93.

7. El resto de determinaciones no parecen presentar correlación con las coordenadas de espacio del color.

CAPÍTULO 8: BIBLIOGRAFÍA

8.1. Referencias bibliográficas

Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S., & Tonogai, Y. (2000). High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. Journal of Chromatography A, 896(1-2), 87.

Cai, YZ; Xing, J; Sun, M. (2005) Phenolic antioxidants (hydrolyzable tannins, flavonols, and anthocyanins) identified by LC-ESI-MS and MALDI-QIT-TOF MS from Rosa chinensis flowers. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53 (26) : 9940-9948

Choi, EM; Hwang, JK. (2003) Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of Piper cubeba, Physalis angulata and Rosa hybrida. Journal of Ethnopharmacology. 89 (1) : 171-175.

Contor, L., Aggett, P., & Asp, N. (2005). European process for the assessment of scientific support for claims on foods (PASSCLAIM). Food Australia, 57(9), 392.

Fuentes Yagüe, J.L. Iniciación a la botánica. Madrid [etc.] : Mundi-Prensa, 2001.

González, A. (2009). Morfología de plantas vasculares. Universidad Nacional de Nordoeste.

Halliwell B, Whiteman M. "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo on incell culture: how should you do it and what do the results mean?"*Brj Pharmacol* 142, 231-255 (2004)

Kroon, P., Clifford, M., Crozier, A., Day, A., Donovan, J., & Manach, C. (2004). How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? The American Journal of Clinical Nutrition, 80(1), 15.

Kumar, N; Bhandari, P; Singh, B. (2009) Antioxidant activity and ultra-performance LC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for phenolics-based fingerprinting of Rose species: Rosa damascena, Rosa bourboniana and Rosa brunonii. Food and Chemical Toxicology. 47 (2) : 361-367.

Kuskoski, EM; Asuero, A; García-Parrilla, MC; Troncoso, A. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos.

Larrosa, M., Llorach, R., Espin, J., & Tomas-Barberan, F. (2002). Increase of antioxidant activity of tomato juice upon functionalisation with vegetable byproduct extracts. Lebensmittel-Wissenschaft [i.e.Und] Technologie, 35(6), 532.

Labrinea, E.P.; Georgiou, C.A. (2004) Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ATBS total antioxidant capacity assay. Analytica Chimica Acta. Vol. 526 (1), p- 63-68.

Manach C, Scalbert A, Monard C. "Polyphenols: food sources and bioaveribility"*Am Jllin Nutri* 79, 727-747(2004)

Martin, L., Price, A., McClendon, K., Al-Abdulla, N., Subramaniam, J., & Wong, P. (2003). Early events of target deprivation/axotomy-induced neuronal apoptosis in vivo: Oxidative stress, DNA damage, p53 phosphorylation and subcellular redistribution of death proteins. Journal of Neurochemistry, 85(1), 234.

Martinez-Valverde, I., Periago, M., & Ros, G. (2000). Nutritional meaning of the phenolic compounds from the diet. Archivos Latinoamericanos De Nutrición, 50(1), 5.

Mikanagi, Y; Yokoi, M; Ueda, Y. (1995) Flower flavonol and anthocyanin distribution in Subgenus Rosa. Biochemical Systematics and Ecology. 23 (2) : 183-200.

Ozcan, G; Sagdic, O; Baydar, NG. (2004) Antioxidant and antibacterial activities of Rosa damascena flower extracts. Food of Science and Technology International. 10 (4) : 277-281

Primo, E. (1995) Química orgánica basica y aplicada: de la molécula a la industria. Ed. Reverté . España.

Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(10), 4290.

Robards, K., Prenzler, P., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chemistry, 66(4), 401.

Roberfroid, M. (2000). A european consensus of scientific concepts of functional foods. Nutrition, 16(7-8), 689.

Ruenroengklin, N. [et al.].(2008) Effects of various temperatures and pH values on the extraction yield of phenolics from litchi fruit pericarp tissue and the antioxidant activity of the extracted anthocyanins. International Journal of Molecular Sciences. Vol. 9 (7), p. 1333-1341.

RuizLarrea, M., Mohan, A., Paganga, G., Miller, N., Bolwell, G., & RiceEvans, C. (1997). Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. Free Radical Research, 26(1), 63.

Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food Science and Technology International, 8(3), 121.

Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V., & Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. Free Radical Research, 36(2), 177.

Udris, I. (1990). [Organizational and personal resources of health promotion. staying healthy despite or because of stress?]. Zeitschrift Für Die Gesamte Hygiene Und Ihre Grenzgebiete, 36(8), 453.

Velioglu, YS; Mazza, G. (1991) Characterization of flavonoids in petals of Rosa-damascena by HPLC and Spectral-Analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 39 (3) : 463-467.

Vinokur, Y; Rodov, V; Reznick, N. (2006) Rose petal tea as an antioxidantrich beverage: Cultivar effects. Journal of Food Science. 71 (1) : S42-S47.

Vinson, J.A. [et al.](2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 49 (11) p. 5315-5321.

Wagner GJ. (1982) Cellular and Subcellular Location in Plant Metabolism. In: Creazy L, Hrazdina G. (ed) *Recent advances in Phytochemistry*. New York, Plenum Press; . p. 1-45.

Wong, D. (1995) Química de los Alimentos: Mecanismos y Teoría. Ed. Acribia, S. A. España. 476 p.

Yassa, N; Masoomi, F; Rankouhi, SER. (2009) Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Extract and Essential oil of Rosa damascena from Iran, Population of Guilan. Daru-Journal of Faculty of Pharmacy. 17 (3): 175-180.

8.2. Bibliografía de consulta

Aigües de Barcelona. http://www.aiguesdebarcelona.es (Mayo 2010)

Belitz H., Grosch W. "química de los alimentos"Acribia, s.a.(2002):231-247

Imagen digital.Conceptos sobre el color.http:// www.gusgsm.com(Febrero 2010)

Infojardín. http:// www.articulos.infojardin.com(Abril 2010)

Panreac. http:// www.panreac.com (Mayo 2010)

Quirumed. http:// www.quirumed.com (Mayo 2010)

Rice-Evans C.Flavonoid Antioxidants. Curr Medcherm 8, 797-807(2001)

Sigma -Aldrich http://www.sigmaaldrich.com(Mayo 2010)