

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y FENOLES TOTALES
EN EL KINO DE *Eucalyptus citriodora* (Myrtaceae)**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

EDGAR ALDAIR JOACHIN MARTINEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA

ENERO 2020

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

ING. FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. REYNA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIA

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

ASESORES DE AREA EN:

APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza

Dr. David Francisco Torres Romero

DOCENTES ASESORES

Dr. Marvin José Núñez Rivas

MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por estar siempre presente y poner en mi camino a personas con gran calidad humana, que me guiaron y apoyaron de manera desinteresada.

A los Docentes Directores:

Dr. Marvin José Núñez Rivas y MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz, por la paciencia, dedicación, el conocimiento, tiempo y apoyo brindado para poder realizar la investigación.

A la Directora General y Asesores de Área:

MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez, Dr. David Francisco Torres Romero y Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza, por la objetividad en sus evaluaciones y la crítica constructiva, ayudando a mejorar y perfeccionar este trabajo.

A mis amigos:

Al Lic. Ulises Castillo, por brindar desinteresadamente sus conocimientos, consejos y su apoyo; A Josué Daniel Zaldaña Burgos y Alex Mauricio Gálvez Rivas, por su amistad, su capacidad de escuchar y la gran ayuda.

A todos, infinitas gracias y que Dios los Bendiga por siempre.

DEDICATORIAS

A Dios

Por brindarme toda su protección, darme sabiduría y fuerza en los momentos que creí ya no poder seguir más, por haberme permitido llegar hasta aquí y culminar uno de mis más grandes sueños.

A mi madre:

María Delfina Martínez Juárez, por el sacrificio de todos estos años, por su amor, paciencia, apoyo y comprensión, por estar ahí a pesar de mis imperfecciones. Sin ella, no hubiera podido alcanzar esta meta.

Al equipo de investigación del LIPN:

Por darme la oportunidad de trabajar con ellos, creer en mis capacidades y ayudarme a mejorar mi formación académica y personal. Mil gracias.

A la Universidad de El Salvador:

Por proporcionarme educación de calidad, apoyarme con el programa de becas y hacer posible este sueño, ser todo un profesional.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	
CAPÍTULO I	
I. INTRODUCCIÓN	xxi
CAPÍTULO II	
II. OBJETIVOS	
CAPÍTULO III	
III. MARCO TEÓRICO	26
3.1 GENERALIDADES DEL EUCALIPTO	26
3.1.1 Descripción botánica	26
3.1.2 Usos etnobotánicos en El Salvador	27
3.2 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL EXUDADO DE <i>Eucalyptus citriodora</i>	29
3.3 GENERALIDADES DE LOS EXUDADOS VEGETALES	35
3.3.1 Resinas	36
3.3.2 Gomas	37
3.3.3 Goma resinas	38
3.3.4 Kino	39
3.3.5 Látex	41
3.4 GENERALIDADES DEL PROCESO OXIDATIVO	41
3.4.1 Proceso oxidativo	41
3.4.2 Estrés oxidativo	41
3.4.3 Radicales libres	42
3.4.4 Especies reactivas de oxígeno (ERO)	42
3.4.4.1 Radicales libres	42
3.4.4.1.1 Anión superóxido ($\cdot\text{O}_2$)	42
3.4.4.1.2 Hidroxilos ($\cdot\text{OH}$)	43
3.4.4.2 Compuestos no radicales	43
3.4.4.2.1 Oxígeno singlete	43
3.4.4.2.2 Peróxido de hidrógeno	43

3.4.5	Especies reactivas de nitrógeno (ERN)	44
3.4.5.1	Radicales libres	44
3.4.5.1.1	Óxido nítrico (NO [•])	44
3.4.5.1.2	Peroxinitrito (ONO [•] ₂)	44
3.4.5.1.3	Dióxido de nitrógeno (NO [•] ₂)	44
3.4.5.1.4	Ácido nitroso (HNO ₂)	44
3.4.6	Relación con el envejecimiento	44
3.5	GENERALIDADES DE LOS ANTIOXIDANTES POLIFENÓLICOS	45
3.5.1	Metabolitos secundarios polifenólicos con actividad antioxidante	46
3.5.1.1	Fenoles simples	47
3.5.1.2	Fenoles ácidos	47
3.5.1.2.1	Ácidos hidroxibenzóicos	48
3.5.1.2.2	Ácidos hidroxicinámicos	48
3.5.1.3	Cumarinas	49
3.5.1.4	Xantonas, estilbenos y benzofenonas	50
3.5.1.5	Quinonas	51
3.5.1.6	Benzoquinonas	51
3.5.1.7	Betacianinas	52
3.5.1.8	Lignanós y ligninas	52
3.5.1.9	Flavonoides	53
3.5.1.9.1	Chalconas	56
3.5.1.9.2	Auronas	57
3.5.1.9.3	Flavononas y flavanóles	57
3.5.1.9.4	Flavonas y flavonóles	58
3.5.1.9.5	Isoflavonas y neoflavonoides	59
3.5.1.9.6	Flavanos (flavan-3-oles)	59
3.5.1.9.6.1	Catequinas	59
3.5.1.9.6.2	Leucoantocianinas	60
3.5.1.9.6.3	Antocianidinas	61

3.5.1.9.6.4 Deoxiantocianidinas	61
3.5.1.9.6.5 Antocianinas	62
3.5.1.9.7 Taninos	63
3.5.1.9.7.1 Taninos condensados	64
3.5.1.9.7.2 Taninos hidrolizables	66
3.5.1.9.7.3 Galotaninos	67
3.5.1.9.7.4 Elagitaninos	67
3.5.1.9.7.5 Taninos complejos	68
3.5.1.9.8 Flobafenos	68
3.5.2 Fuentes exógenas de antioxidantes	69
3.6 ENSAYO DE FOLIN-CIOCALTEU	69
3.7 ENSAYO DE DPPH	70
CAPÍTULO IV	
IV. DISEÑO METODOLÓGICO	74
4.1 TIPO DE ESTUDIO	74
4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA	74
4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO	75
4.4 PARTE EXPERIMENTAL DE LABORATORIO	76
4.4.1 Obtención del extracto etanólico del kino de <i>Eucalyptus citriodora</i> .	76
4.4.2 Obtención de la fracción diclorometánica del kino de <i>Eucalyptus citriodora</i> por partición líquido/líquido.	76
4.4.3 Fraccionamiento mediante cromatografía en columna.	77
4.4.3.1 Preparación de la columna cromatográfica a media presión (Cromatografía Flash).	77
4.4.3.2 Preparación de la muestra para la cromatografía en columna.	77
4.4.3.3 Elución de las fracciones en la cromatografía en columna.	78
4.4.4 Cuantificación de fenoles totales de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna a partir de la fracción diclorometánica por el método de Folin-Ciocalteu.	79

4.4.4.1 Preparación de solución madre y línea de calibración con el estándar ácido gálico.	79
4.4.4.2 Preparación de soluciones de trabajo.	79
4.4.4.3 Preparación del blanco.	79
4.4.4.4 Cuantificación de fenoles totales	80
4.4.5 Cuantificación de la actividad antioxidante de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna a partir de la fracción diclorometánica por el método del DPPH.	81
4.4.5.1 Preparación de la línea de calibración con el estándar Trolox®	81
4.4.5.2 Preparación de soluciones de trabajo	81
4.4.5.3 Preparación del blanco	81
4.4.5.4. Preparación del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).	82
4.4.5.5. Determinación de la actividad antioxidante.	82
4.4.6. Lectura en Espectrofotómetro UV-Vis	83
4.5 PROCESAMIENTO DE DATOS.	84
4.5.1 Análisis estadístico	84
CAPÍTULO V	
V. CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	86
5.1 Identificar la especie vegetal y recolectar el kino proveniente de <i>Eucalyptus citriodora</i> .	86
5.2 Preparar el extracto etanólico a partir del kino de <i>Eucalyptus citriodora</i> .	88
5.3 Obtener las fracciones de la columna cromatográfica a partir de la fracción diclorometánica seca del kino del <i>Eucalyptus citriodora</i> .	90
5.4 Cuantificar los fenoles totales y la capacidad antioxidante de cada una de las fracciones obtenidas en la cromatografía en columna.	94
5.4.1 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	94
5.4.2 Cuantificación de la actividad antioxidante por el método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).	98

5.5 Determinar si existe diferencia estadística entre los resultados de las diferentes fracciones en la cuantificación de fenoles totales y la actividad antioxidante.	105
CAPÍTULO VI	
VI. CONCLUSIONES	109
CAPÍTULO VII	
VII. RECOMENDACIONES	112
BIBLIOGRAFÍA	
GLOSARIO	
ANEXOS	

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

- 1 Esquema general para la cuantificación de fenoles totales y actividad antioxidante.
- 2 Descripción de reactivos, cristalería, material y equipo necesarios en la determinación de fenoles totales y actividad antioxidante.
- 3 Equipos utilizados en el proceso experimental.
- 4 Cálculos para la preparación de soluciones estándar de ácido gálico para la curva de calibración en Folin-Ciocalteu.
- 5 Cálculos para la preparación de soluciones estándar de Trolox® para la curva de calibración en la determinación de la actividad antioxidante.
- 6 Constancia de identificación de la especie vegetal *Eucalyptus citriodora*.
- 7 Resultados del coeficiente de variación de las absorbancias en la prueba de Folin-Ciocalteu.
- 8 Resultados de la cuantificación de fenoles totales en las fracciones obtenidas por cromatografía en columna a partir de la fracción diclorometánica del kino de *Eucalyptus citriodora*.
- 9 Resultados del coeficiente de variación de las absorbancias en la prueba del DPPH.
- 10 Resultados de la cuantificación de la actividad antioxidante en las fracciones obtenidas por cromatografía en columna a partir de la fracción diclorometánica del kino de *Eucalyptus citriodora*.

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N°		Pág. N°
1	Usos etnobotánicos del “Eucalipto” en El Salvador.	28
2	Análisis fitoquímicos preliminares realizados al exudado de <i>Eucalyptus citriodora</i> .	30
3	Metabolitos secundarios en las fracciones de la fracción diclorometánica de la goma-resina de <i>Eucalyptus citriodora</i> por RMN- ¹ H.	31
4	Resultados del fraccionamiento por cromatografía en columna de la fracción diclorometánica.	92

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°		Pág. N°
1	<i>Eucalyptus citriodora</i> , Universidad de El Salvador.	26
2	Estructura química de HEMA (6-[1-(<i>p</i> -hidroxifenil)-etil]-7-O-metilaromadendrina).	32
3	Estructura de siete flavonoides aislados del kino de <i>Corymbia torelliana</i> con actividad contra <i>Pseudomona aeruginosa</i>	34
4	Espectro de RMN ¹³ C de 75 MHz de la resina de <i>Pinus rudis</i> con desacoplamiento normal y con desfase dipolar.	37
5	Estructura de la hexosa, grupos funcionales característicos de los azúcares.	37
6	Espectro de RMN ¹³ C de 75 MHz de la goma de <i>Prunus armeniaca</i> con desacoplamiento normal y con desfase dipolar.	38
7	Los espectros de RMN ¹³ C de 75 MHz de la goma resina de <i>Schinus molle</i> con desacoplamiento normal y con desfase dipolar.	39
8	Espectros de RMN ¹³ C a 100 MHz del kino de <i>Corymbia citriodora</i> , con desacoplamiento normal y desfase dipolar.	40
9	Espectro de RMN ¹ H a 500 MHz del kino de <i>Corymbia citriodora</i> .	41
10	Estructura química del fenol.	46
11	Estructura química de algunos compuestos fenólicos simples.	47
12	Estructura química de ácidos fenólicos.	47
13	Estructura química de algunos ácidos hidroxibenzóicos.	48

14	Ácidos hidroxicinámicos de mayor recurrencia en la naturaleza.	49
15	Estructura química del ácido ferúlico, grupos funcionales de importancia en la actividad antioxidante.	49
16	Ejemplos de estructuras químicas de cumarinas simples.	50
17	Ejemplos de furanocumarinas y piranocumarinas.	50
18	Estructuras básicas de benzofenonas, xantonas y estilbenos.	51
19	Quinonas, estructura de la coenzima Q10 (ubiquinona) y la emodina (antraquinona).	51
20	Oxidación y reducción de benzoquinonas.	52
21	Estructura química de la betanidina.	52
22	Estructura química de sesamina y pinoresinol	53
23	Estructura básica de un flavonoide.	53
24	Características estructurales básicas de los diferentes tipos de flavonoides.	55
25	Estructura química de chalconas comunes.	56
26	Estructura química de una aurona común, aureusidina.	57
27	Diferencias estructurales entre flavanonas y flavanones.	58
28	Estructura química de la apigenina, una flavona.	58
29	Diferencia estructural entre isoflavonas y neoflavonoides.	59
30	Ejemplos de estructuras químicas presentadas por catequinas.	60
31	Diferencia estructural entre leucoantocianinas y la catequina.	61
32	Estructura química de algunas antocianidinas.	61
33	Ejemplos de estructuras químicas de deoxiantocianidinas.	62

34	Ejemplo de estructura química de una antocianina 3-glucósido.	63
35	La unidad básica de repetición en taninos condensados.	65
36	Prodelfinidina.	65
37	Modelo de estructura para un tanino condensado.	66
38	Estructura química del pentagalolil-glucosa, un galotanino.	67
39	Acutissimina A, ejemplo de tanino complejo en el vino tinto.	68
40	Ejemplo de la estructura de un flobafeno.	69
41	Reacción entre el ácido gálico y el reactivo de Folin-Ciocalteu.	70
42	Forma radical y no radical del DPPH.	71
43	Estructura del Trolox®	72
44	Kino de <i>Eucalyptus citriodora</i> antes de ser recolectado, secretado debido al crecimiento secundario del árbol.	87
45	Apariencia del kino de <i>Eucalyptus citriodora</i> cristalizado.	88
46	Montaje del equipo para la obtención de la fracción diclorometánica, apariencia de la fracción diclorometánica y del extracto etanólico durante el fraccionamiento.	89
47	Preparación de la columna cromatográfica.	91
48	Fracciones totales obtenidas de la cromatografía en columna en orden creciente de polaridad de izquierda a derecha.	91
49	Fracciones finales obtenidas por rotaevaporación de solventes.	92
50	Porcentajes de rendimiento de las fracciones del kino de <i>Eucalyptus citriodora</i> por cromatografía en columna.	93

51	Esquema de soluciones de trabajo y cubetas correspondientes a una fracción "X" obtenida en la cromatografía en columna.	94
52	Curva de calibración promedio para la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.	96
53	Resultados de la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu de las fracciones obtenidas por cromatografía de columna a partir de la fracción diclorometánica.	98
54	Curva de calibración promedio para la cuantificación de la actividad antioxidante por el método del DPPH.	100
55	Resultados de la cuantificación de la actividad antioxidante por el método del DPPH de las fracciones obtenidas por cromatografía de columna a partir de la fracción diclorometánica.	105

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°		Pág. N°
1	Lecturas de absorbancia, promedios, desviación estándar y coeficiente de variación de los estándares en la prueba de Folin-Ciocalteu.	95
2	Resultado del coeficiente de variación de las absorbancias de cada solución de trabajo correspondiente a la fracción <i>n</i> -hexano:AcOEt 50% en la prueba de Folin-Ciocalteu.	96
3	Resultados de la cuantificación de fenoles totales de cada una de las fracciones obtenidas por cromatografía de columna a partir de la fracción diclorometánica.	97
4	Lecturas de absorbancia, promedios, desviación estándar y coeficiente de variación de los estándares en la prueba del DPPH.	99
5	Resultado del coeficiente de variación de las absorbancias de cada solución de trabajo correspondiente a la fracción <i>n</i> -hexano:AcOEt 50% en la prueba del DPPH.	101
6	Resultados de cuantificación de la actividad antioxidante de cada una de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna a partir de la fracción diclorometánica.	101
7	Resultados de la fracción <i>n</i> -hexano:AcOEt 50% en la cuantificación de fenoles totales.	104
8	Resultados de la fracción <i>n</i> -hexano:AcOEt 50% en la cuantificación de la actividad antioxidante.	104

9	ANOVA simple para fenoles totales en las 6 fracciones obtenidas por cromatografía en columna.	106
10	ANOVA simple para la actividad antioxidante en las 6 fracciones obtenidas por cromatografía en columna.	106
11	Prueba de múltiples rangos para fenoles totales en las 6 fracciones obtenidas por cromatografía en columna.	106
12	Prueba de múltiples rangos para la actividad antioxidante en las 6 fracciones obtenidas por cromatografía en columna.	107

RESUMEN

El Salvador posee una gran variedad de plantas que aún no se investigan y que no se han determinado las propiedades terapéuticas que pueden aportar a la población, sin embargo, algunas ya son conocidas y utilizadas para curar diversos padecimientos, tal es el caso del “Eucalipto”, del cual se utilizan las hojas para aliviar enfermedades de las vías respiratorias, pero se ha limitado el uso a tan solo uno de sus órganos, sin aprovechamiento total de la planta.

En este estudio se investigó el kino del *Eucalyptus citriodora*, un tipo de exudado vegetal caracterizado por la abundante presencia de compuestos polifenólicos. La muestra del exudado se recolectó directamente del árbol, ubicado dentro del campus de la Universidad de El Salvador, en la sede central. La especie vegetal se identificó botánicamente y se proporcionó su respectivo número de voucher.

La disolución asistida por ultrasonido del kino resultó en una solución homogénea que fue sometida a una partición líquido/líquido con diclorometano; la fracción diclorometánica fue concentrada a sequedad y luego sometida a una cromatografía en columna, utilizando mezclas de los solventes *n*-hexano:acetato de etilo, en orden creciente de polaridad para finalmente eluir con metanol.

A las fracciones obtenidas se les cuantificaron los fenoles totales y la actividad antioxidante, con la prueba de Folin-Ciocalteu y la del DPPH, respectivamente. La fracción más polar fue la de mejores resultados, al aumentar la polaridad se mejora la obtención de polifenoles y en el kino, dichos compuestos son responsables de la actividad antioxidante. En conclusión, el kino de *Eucalyptus citriodora* posee gran cantidad de polifenoles que proporcionan actividad antioxidante, y se sugiere incluir en la formulación de un fitomedicamento o fitocosmético. El tratamiento y análisis de muestras se realizó en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador en el periodo de mayo a septiembre del 2019.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Eucalyptus citriodora, comúnmente llamado en El Salvador como “Eucalipto”, ha sido muy estudiado por el aceite esencial presente en sus hojas, sin embargo, se han pasado desapercibido otros órganos y los metabolitos secundarios presentes en ellos. El “Eucalipto” produce y libera un exudado ante la necesidad de protección a todo aquel factor que genere rupturas en la corteza como lo son los daños físicos, infecciones o el crecimiento mismo del árbol, dicho exudado actualmente ha sido poco estudiado.

La tintura elaborada con oleorresina de “Eucalipto” posee actividad antimicótica ante *Candida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes* que suelen producir dermatomicosis, así también, ha demostrado actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*, que producen neumonía, otitis externa y faringitis entre muchas otras enfermedades, dichas actividades se deben a la presencia de flavonoides, antraquinonas, sesquiterpenlactonas, glicósidos cardiotónicos y taninos, por lo que las expectativas son muy grandes respecto a la oleorresina.⁽³³⁾

El oxígeno es esencial para la vida, pero dada su alta reactividad, también es un elemento tóxico, por lo que la naturaleza desarrolló sistemas de control para mantener un equilibrio entre las sustancias pro-oxidantes y las antioxidantes. Al romperse el equilibrio, favoreciendo a las sustancias pro-oxidantes, se genera el estrés oxidativo, relacionado a la aparición de enfermedades cardiovasculares e infecciosas, cáncer, diabetes mellitus y trastornos neurodegenerativos⁽⁵⁹⁾, dando así, gran importancia a la búsqueda e investigación de sustancias con propiedades antioxidantes, especialmente de origen natural, que ofrezcan óptimos resultados y mínimos o nulos efectos adversos.

El propósito del estudio fue cuantificar el contenido de fenoles totales y determinar la actividad antioxidante de cada una de las fracciones obtenidas de

la cromatografía en columna a partir de la fracción diclorometánica procedente de la partición líquido/líquido del extracto etanólico del kino de *Eucalyptus citriodora*, utilizando el método de Folin-Ciocalteu para fenoles totales y el método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) para la actividad antioxidante.

La principal dificultad que existe para llevar a cabo estos métodos es la necesidad de realizar todo el proceso en la mayor ausencia de luz posible para evitar la degradación de los reactivos como de los polifenoles que también son fotosensibles.

La fracción metanólica superó a las demás fracciones en ambos métodos, obtuvo la mayor cantidad de fenoles totales y la mayor actividad antioxidante; por la concordancia entre los resultados de ambos métodos, la actividad antioxidante puede ser atribuida a los compuestos polifenólicos, corroborando investigaciones realizadas por otros investigadores donde revelaron, según los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de las mismas fracciones utilizadas en esta investigación, que los compuestos mayoritarios presentes en el kino de *Eucalyptus citriodora* eran polifenoles.

Esta investigación ha ayudado a la caracterización de la especie vegetal *Eucalyptus citriodora* de El Salvador, proporcionándole un número de voucher que dará trazabilidad para futuras investigaciones y debido a la afinidad mostrada de los polifenoles por solventes polares, este estudio deja una gran perspectiva sobre la inclusión del kino de *E. citriodora* en un fitofármaco o fitocosmético, pudiendo utilizar agua como solvente para tal fin, convirtiéndose en una fuente exógena de antioxidantes que ayuden a prevenir o disminuir la probabilidad de aparición de enfermedades o daños causados por radicales libres.

El tratamiento y análisis de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador en el periodo de mayo a septiembre del 2019.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antioxidante y fenoles totales en el kino de *Eucalyptus citriodora* (Myrtaceae).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Identificar la especie vegetal y recolectar el kino proveniente del *Eucalyptus citriodora*.

2.2.2 Preparar el extracto etanólico a partir del kino de *Eucalyptus citriodora*.

2.2.3 Obtener las fracciones de la columna cromatográfica a partir de la fracción diclorometánica seca del kino del *Eucalyptus citriodora*.

2.2.4 Cuantificar los fenoles totales y la capacidad antioxidante de cada una de las fracciones obtenidas en la cromatografía en columna.

2.2.5 Evaluar si existe diferencia estadística entre los resultados de las diferentes fracciones en la cuantificación de fenoles totales y la actividad antioxidante.

CAPÍTULO III
MARCO TEÓRICO

III. MARCO TEÓRICO

3.1 GENERALIDADES DEL EUCALIPTO⁽⁵⁶⁾

Nombre común en El Salvador: “Eucalipto”

Nombre científico: *Eucalyptus citriodora* Hook

Sinonimia: *Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson

Género: *Eucalyptus*

Especie: *citriodora*

Familia: Myrtaceae



Figura N°1. *Eucalyptus citriodora*, Universidad de El Salvador. Propiedad del LIPN.

3.1.1 Descripción botánica

Este árbol crece hasta 30 metros de altura, 0.6 a 1.3 m de diámetro, con copa regular poco densa (Figura N° 1). El tronco es de base recta o ligeramente ensanchada, fuste cilíndrico recto y limpio, corteza gris, lisa y desprendible en escamas o parches delgados e irregulares que dejan pequeñas hendiduras redondeadas. Al desprenderse estas porciones de epidermis dejan expuesta la corteza interior de color blanquecino. Su follaje es abundante y de color verde, al

estrujar las hojas despiden un fuerte olor, parecido al del alcanfor. Tiene ramas pequeñas, delgadas, ligeramente aplanadas, de color verde claro, teñidas de marrón. El tamaño y la forma de las hojas varía con la edad, cuando jóvenes son opuestas, estrechas a lanceoladas-anchas, con márgenes ondulados, vellosas, muchas veces peltadas. Las hojas adultas son alternas, ligeramente acuminadas en el ápice, de forma lanceolada con base decurrente y borde entero, glabras, verde claro por el haz y el envés; con numerosas nervaduras poco visibles y dos nervaduras paralelas a los bordes.^(12; 18)

Presenta cabezuelas florales ramificadas en corimbos terminales que nacen en la base de las hojas. Flores numerosas, de color blanco, en umbelas de 3 a 5 flores juntas sobre pecíolos cortos. Los frutos son cápsulas de forma ovalada, de color marrón, con pequeños puntos redondeados emergentes y una pequeña tapa redondeada, con tres líneas delgadas. Cada cápsula contiene pocas semillas irregularmente elípticas, relativamente grandes comparadas con las semillas de otros “Eucaliptos” de color negro brillante, de 4 a 5 mm de longitud.

Normalmente cada cápsula contiene también algunas semillas estériles de tamaño pequeño. El número de semillas por kilogramo oscila entre 60,000 y 110,000. La madera es de color marrón claro a gris-marrón, de grano recto a ondulado, fuerte y resistente, moderadamente durable a durable y moderadamente resistente a las termitas.⁽¹⁸⁾

3.1.2 Usos etnobotánicos en El Salvador

El *Eucalyptus spp* ha sido utilizado para diversos tratamientos (Ver Cuadro N° 1), especialmente para enfermedades que implican la obstrucción de las vías respiratorias, debido a su actividad mucolítica y expectorante.

La vía de administración más común es la oral y las inhalaciones en aromaterapia, las actividades se atribuyen a la relativamente gran cantidad de aceite esencial presente en sus hojas.

Cuadro N°1. Usos etnobotánicos del “Eucalipto” en El Salvador.⁽¹⁷⁾

Enfermedad	Órgano vegetal	Preparación	Vía de administración	Dosis
Artritis	Hojas secas	Decocción	Baños locales tibios	3 al día
		Maceración con etanol	Fomentos	
	Hojas frescas	Maceración con etanol	Cataplasmas	Varios
Asma	Hojas secas	Infusión o decocción	Oral	3-4 tazas/día
			Inhalaciones	3-4 veces/día
Bronquitis	Hojas secas	Infusión	Oral	3-4 tazas/día
Fiebres	Hojas secas	Infusión	Oral	1-2 tazadas
Trastornos de la circulación	Hojas secas	Infusión	Oral	3 tazas/día
Catarrros	Hojas secas	Decocción	Oral caliente	3 tazas/día
			Inhalaciones	Varias
Dolor de estómago	Corteza seca o fresca, hojas	Infusión	Oral	½ - 1 taza
Dolor muscular	Hojas secas	Decocción	Baños locales y generales tibios	1-2 al día
Afecciones de la garganta	Hojas secas	Infusión	Oral	1-2 tazas
			Inhalaciones	Varias
Golpes	Corteza y hojas	Maceración	Cataplasmas	Varios
	Hojas secas	Decocción	Baños y lienzos tibios	Varios
Gripe	Hojas secas	Infusión	Oral	3 tazas/día
			Inhalaciones	Varias
Heridas	Hojas secas o frescas y corteza fresca	Decocción	Baños locales y lienzos calientes	Varios
Malestar del cuerpo	Hojas secas	Decocción	Baños generales tibios	1-2 al día
Afecciones del pecho	Hojas secas	Infusión	Oral	3 tazas/día
Sinusitis	Hojas secas	Infusión	Inhalaciones	Varias

Cuadro N°1. Continuación.

Reumatismo	Hojas secas	Decocción	Baños locales y lienzos calientes	3 al día
	Hojas frescas	Maceración con etanol	Frotamientos, cataplasmas	Varios
Tos	Hojas secas	Decocción	Oral	1-2 tazas
			Inhalaciones	Varias
Tuberculosis	Hojas secas	Infusión	Oral	1-2 tazas
			Inhalaciones	Varias
Varices	Hojas y corteza frescas o secas	Infusión	Oral	3 tazas/día
		Decocción	Pediluvios tibios	3/día/10 min.

3.2 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL EXUDADO DE *Eucalyptus citriodora*

La determinación de la actividad antimicótica *in vitro* de una tintura de oleorresina procedente de *Eucalyptus citriodora* colectada en El Salvador reveló que la tintura al 30% inhibe el crecimiento de *Candida albicans*, mientras que *Trichophyton mentagrophytes* es sensible a la tintura en todas las concentraciones ensayadas (5%, 15%, 30%), en especial a la concentración intermedia. Los resultados propusieron alternativas al tratamiento de dermatomicosis causadas por las cepas ensayadas y su efectividad está ampliamente relacionada con la presencia de taninos con gran poder astringente, entre otros metabolitos secundarios (Cuadro N° 3).⁽³³⁾

En el 2005 se realizó la determinación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la oleorresina del *E. citriodora* frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*. Todas las bacterias ensayadas fueron susceptibles al extracto etanólico y sus diluciones, y en el caso de *P. aeruginosa* la inhibición fue mayor que el disco de Gentamicina 10 µg (patrón); de los metabolitos secundarios presentes (Cuadro N° 3), se presumió que las sesquiterpenlactonas, taninos y flavonoides actuaron sinérgicamente.⁽³⁹⁾

Méndez y Ramírez, en el 2006 llevaron un estudio similar al anterior, determinando la actividad antimicrobiana del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*, utilizando como patrón los antibióticos Penicilina, Gentamicina y Ampicilina. Las tres bacterias resultaron sensibles al extracto diclorometánico, siendo *S. aureus* el más susceptible, seguido de *P. aeruginosa* y *S. pyogenes*, respectivamente.

El resultado de la inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa* fue mayor que la obtenida por el patrón Gentamicina 10 µg. El exudado fue clasificado como goma-resina y no como una oleorresina, ya que los compuestos presentados fueron terpenos y carbohidratos (Cuadro N° 2).⁽³⁴⁾

Cuadro N°2. Análisis fitoquímicos preliminares realizados al exudado de *Eucalyptus citriodora*.^(33; 34; 39)

Tintura al 30% p/v	Extracto etanólico	Extracto diclorometánico
Flavonoides	Flavonoides	Ácidos hidroxicinámicos
Glicósidos antraquinónicos	Glicósidos antraquinónicos	Compuestos fenólicos
Glicósidos cardiotónicos	Glicósidos cardiotónicos	Esteroles
		Flavonoides
Sesquiterpenlactonas	Sesquiterpenlactonas	Glicósidos antraquinónicos
Taninos	Taninos	Terpenos

En el 2007 Alas y Pinto, por medio de cromatografía en columna, obtuvieron fracciones de *n*-hexano:AcOEt 10%, 30% y 50% procedentes del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* colectada en el campus de la Universidad de El Salvador, a las cuales determinaron la actividad antimicrobiana. Las fracciones fueron sometidas a un análisis de metabolitos secundarios por RMN-¹H (Cuadro N° 3) y se comprobó por ensayos *in vitro* la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae*. Los resultados obtenidos revelaron que *S. aureus* fue susceptible a las fracciones del 30% y 50% pero no a la fracción

del 10%. La cepa de *P. aeruginosa* fue susceptible a las diluciones de las fracciones de 10%, 30% y 50%, mientras que la cepa de *S. pneumoniae* fue altamente resistente a todas las fracciones en todas sus diluciones.

La mayor inhibición se logró con la concentración del 0.75% de las fracciones de 10%, 30% y 50% para *P. aeruginosa* y la concentración del 3.0% de las fracciones del 30% y 50% para *S. aureus*.⁽²⁾ En ese mismo año, se determinó la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna (*n*-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro y metanol puro) procedentes del extracto diclorometánico de la goma-resina de *E. citriodora*.

Los resultados evidenciaron que las fracciones de *n*-hexano:AcOEt 70%, acetato de etilo puro y metanol puro, poseían actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, pero no contra *Streptococcus pneumoniae*. Realizaron también un análisis de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN-¹H) en la que determinaron la presencia de metabolitos secundarios que se detallan en el Cuadro N° 3.⁽²¹⁾

Cuadro N°3. Metabolitos secundarios en las fracciones del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* por RMN-¹H.^(2; 21)

Fracciones <i>n</i> -hexano:AcOEt				Fracción AcOEt puro	Fracción MeOH puro
10%	30%	50%	70%		
Cafeato <i>n</i> -alquílico	Ácidos fenólicos	Ácidos fenólicos	Ácidos fenólicos	Ácidos fenólicos	Ácidos fenólicos
	Chalconas	Chalconas	Chalconas	Ácidos cinámicos	Ácidos cinámicos
	Flavonoides	Flavonoides	Isoflavonoides	Isoflavonoides	Isoflavonoides
	Flavononas	Flavononas	Flavonoles	Triterpenos glicosados	Triterpenos glicosados
	Triterpenos	Triterpenos			

Duh et al., 2012, investigaron la actividad antiproliferativa e inducción de apoptosis de la resina de *Eucalypto citriodora* de Taiwán. El extracto etanólico de

la resina de *Eucalyptus citriodora* contenía fenoles totales altos y la apoptosis generada se relacionó con la disminución de potenciales transmembrana mitocondrial, el aumento de la relación Bax/Bcl2 y la activación de la caspasa 3.

La fracción de acetato de etilo poseía un compuesto bioactivo principal denominado HEMA (6-[1-(*p*-hidroxifenil)-etil]-7-O-metil aromadendrina), el cual se aisló e identificó mediante espectrofotometría de masas (MS) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN), siendo el principal flavonoide detectado (Figura N°2).

La fracción de acetato de etilo y HEMA, lograron inhibir la proliferación de células B16F10 por apoptosis, la fracción a 500 µg/mL logró reducir la viabilidad del 60.3% en comparación con las células no tratadas, mostraron un potencial reducido de la membrana mitocondrial, su rendimiento y efecto antiproliferativo fue mayor que las demás fracciones. Además, la fracción a 200 y 500 µg/ml y HEMA a 40 µg/ml, aumentaron la generación de ERO/NO en 649.5%/362.4% y 217.0%/103.4% aumentando la apoptosis.⁽¹⁰⁾

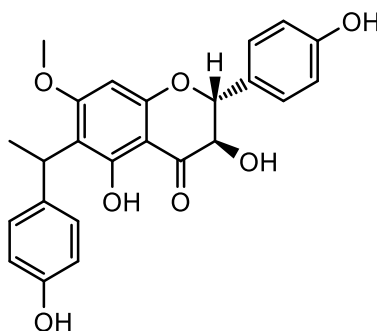


Figura N°2. Estructura química de HEMA (6-[1-(*p*-hidroxifenil)-etil]-7-O-metil-aromadendrina).

Shen, Chen y Duh, en 2012, investigaron el efecto citotóxico de la resina de *Eucalyptus citriodora* colectada en Taiwán sobre las células hepatoma HepG2 humanas. Todos los extractos a 500 µg/mL disminuyeron la proliferación celular, siendo la fracción acuosa la que obtuvo un mayor porcentaje de inhibición con el 81.71%. El lactato deshidrogenasa se libera por daño en la membrana y muerte celular, indicando necrosis o apoptosis y todos los extractos mostraron una

liberación significativa en 24 horas. La fracción acuosa obtuvo la mayor liberación, acción citotóxica y sensibilidad de las células HepG2.

La caspasa-3 es una de las principales enzimas de ejecución en la apoptosis y su actividad en presencia de la fracción acuosa del extracto de la resina resultó en inducción de su activación conllevando a la apoptosis de las células HepG2. La fracción acuosa aumento significativamente la relación Bax/Bcl-2, por lo que puede considerarse anticancerígeno.⁽⁵⁰⁾

En 2017, se realizó la extracción de polifenoles de la corteza de *Eucalyptus nitens* y *Eucalyptus globulus* recolectada en Chile, determinando la cinética experimental, modelado y evaluación de sus actividades antioxidantes y antifúngicas. Buscaron el aprovechamiento de la corteza que suele ser un residuo con gran cantidad de resina, en cuya composición figuran compuestos polifenólicos, algunos demandados por la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica por sus propiedades antimicrobianas, hipoglucemiantes, antiinflamatorias y antitumorales.

Los fenoles totales fueron determinados por el ensayo de Folin-Ciocalteu, con un espectrofotómetro UV a 765 nm reportando en mg equivalentes de ácido gálico, y la capacidad antioxidante se determinó con el método de DPPH. La concentración mínima inhibitoria (CIM) para detener el crecimiento de los hongos *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma australe*, se determinó con los extractos de corteza de *E. nitens* y *E. globulus*, ambos mostraron inhibición del crecimiento de la especie fúngica *T. versicolor*. El estudio demostró una fuerte correlación lineal entre los compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante.⁽¹⁹⁾

Nobakht, et al., 2017, investigaron las propiedades antibacterianas de los flavonoides del kino de *Corymbia citriodora*, *Corymbia torelliana* x *Corymbia citriodora* y *Corymbia torelliana*, recolectados en Australia, frente a bacterias Gram-negativas, Gram-positivas y *Candida albicans*.

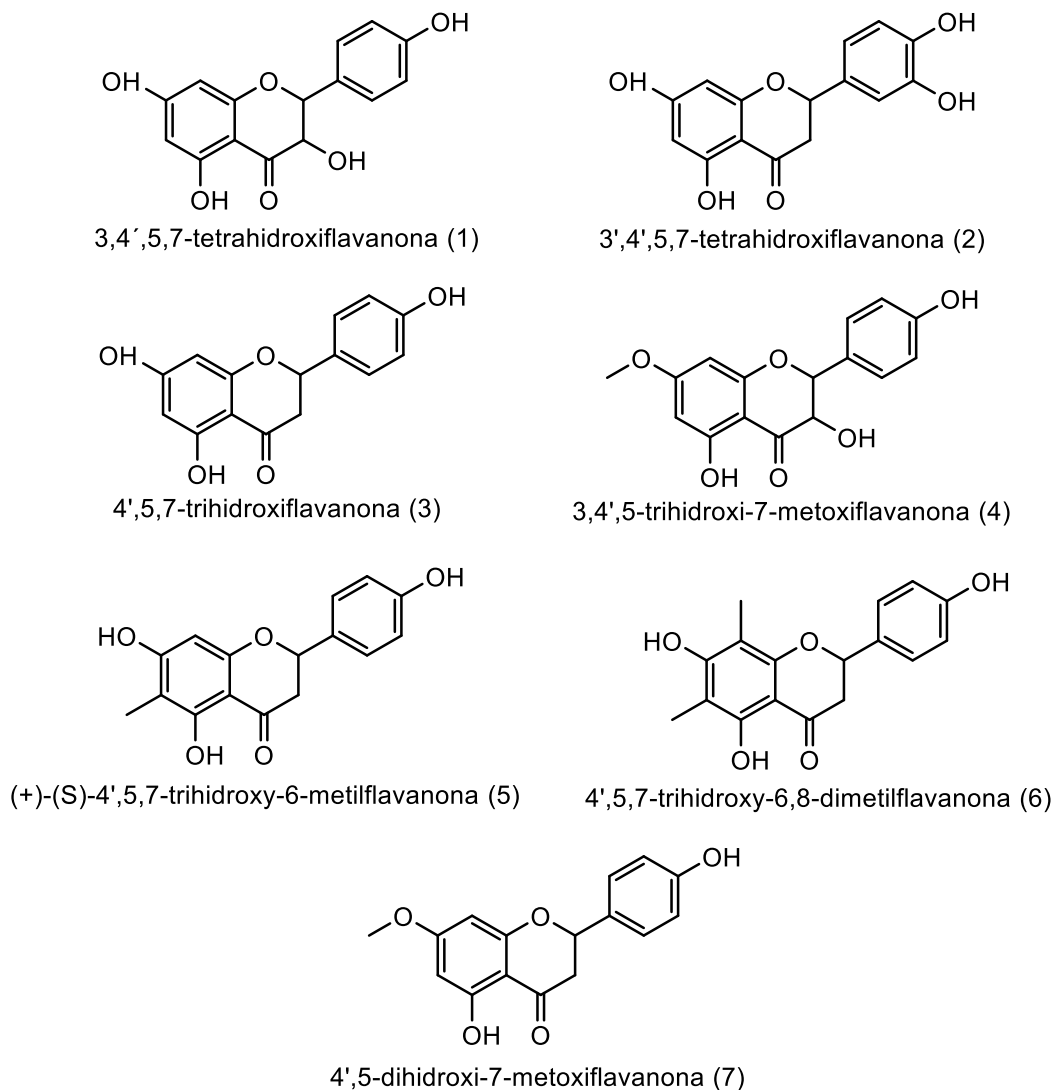


Figura N°3. Estructura de siete flavonoides aislados del kino de *Corymbia torelliana* con actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*

Siete flavonoides aislados del kino de *C. torelliana* poseían actividad antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* superando los canales de porina que aumentan la tolerancia a antibióticos en Gram-negativas (Figura N°3). Solo el compuesto (+)-(S)-4',5,7-trihidroxi-6-metilflavanona fue activo contra *Staphylococcus aureus*. Los extractos etanólicos de los kinos de *C. citriodora* y *C. torelliana*, mostraron fuerte actividad frente a *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* y *C. albicans*.

Debido a que la actividad más alta fue frente a *P. aeruginosa*, centraron su atención en la actividad frente a cuatro grupos clonales diferentes de esta bacteria, aislados de casos clínicos, C1, C8, C11 y C19. Los extractos de kino mostraron fuerte actividad frente a las cuatro cepas, excepto contra C11 que fue resistente al extracto de *C. torelliana*, así como también a Ticarcilina, Aztreonam y Ácido clavulánico-Ticarcilina (antibióticos). Se determinó que los grupos hidroxilo aumentan la actividad de los flavonoides contra *S. aureus* resistente a la meticilina, mientras los metoxilos reducen su actividad; sin embargo, esto no es definitivo.⁽⁴³⁾

3.3 GENERALIDADES DE LOS EXUDADOS VEGETALES

Los exudados son producidos principalmente por los árboles, generados en las células y liberados en la superficie como resultado de una lesión, muchos pueden ser recogidos o raspados de la superficie. La producción se asocia a lesiones o infecciones de los tejidos de las plantas, incluidos accidentes como rayos o incendios, condiciones ambientales extremas, suelo pobre y clima seco.

El aspecto y propiedades físicas de los diferentes tipos de exudados pueden ser muy similares, pero molecularmente muy diferentes; existe una carencia de métodos simples para identificarlos, pero mediante estudios por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se ha logrado clasificar cada uno de ellos por el tipo de compuestos químicos orgánicos que poseen, entre ellos terpenos y polisacáridos de alto peso molecular. Mientras que los géneros de gimnospermas son principalmente productores de resinas, las angiospermas pueden producir resinas, gomas, o látex.

Anatómicamente la producción varía según el tipo de exudado y el grupo (gimnosperma y angiosperma). Las resinas son producidas por células derivadas del epitelio adyacentes a las células parenquimatosas, el contenido se libera en canales de resina alargados (para gimnospermas) o en ampollas de resina más

globulares (para angiospermas), las gomas por células parenquimatosas derivadas del cambium, los látex por células (laticíferos), a partir de varios tejidos vegetales, como el parénquima y el floema secundario.

Históricamente los diferentes tipos de exudados como las gomas, resinas, resinas de goma (goma-resinas), que pueden ser indistinguibles a simple vista, y el látex, han sido utilizados para diferentes fines que van desde cosméticos, joyería y adhesivos dentales hasta aditivo en materiales de construcción o ser aplicados en cultivos.⁽²⁸⁾ La caracterización de los exudados puede realizarse por RMN de manera inequívoca en los siguientes tipos:

3.3.1 Resinas

Las resinas son mezclas insolubles en agua, en gran parte de terpenos (bloques de isopreno). La fosilización hace que sean resistentes a la disolución, generalmente se llaman resinas fósiles, resinitas o inadecuadamente, ámbar. Las mezclas complejas de terpenos proporcionan huellas digitales específicas para la identificación de las resinas y diferenciación entre familias. Los carbonos terpenoides saturados (C-C) unidos solo al hidrógeno u otros carbonos producen resonancias en la región δ 10-50, los carbonos insaturados (C=C) resuenan en la región δ 110-150 y los carbonos saturados unidos a oxígeno (C-O) aparecen en la región δ 60-80. En ocasiones, por oxidación se producen grupos carbonilo (C=O), que se muestran en la región δ 170-210.

En las resinas específicamente están ausentes las resonancias de carbonos unidos a dos oxígenos por enlaces simples (OCO) en δ 95-105, lo que permite diferenciarlas de las gomas y las goma resinas, ya que dicho enlace está en todos los carbohidratos.⁽²⁸⁾ En la Figura N°4, de *Pinus rudis*, puede observarse la región saturada con desacoplamiento normal se caracteriza por grandes picos en δ 17, 24, 38 y 48. Hay un pico amplio de baja intensidad en la región C-O δ ca. 70, nada en la región OCO (azúcar), picos insaturados principalmente entre δ 114 y

138 con picos muy pequeños de carbono de exometileno ($C=CH_2$) a δ ca. 110 y 146, y un pico carbonilo pequeño y agudo en δ 187.

En el espectro con desfase dipolar, la región saturada contiene cuatro picos afilados en δ 17, 24, 38 y 48 (el pico en δ 38 a menudo se divide en dos, lo que da un total de cinco picos). Un pequeño pico de C-O sobrevive a δ ca. 70, y el pico de carbonilo en δ 187 está realzado.

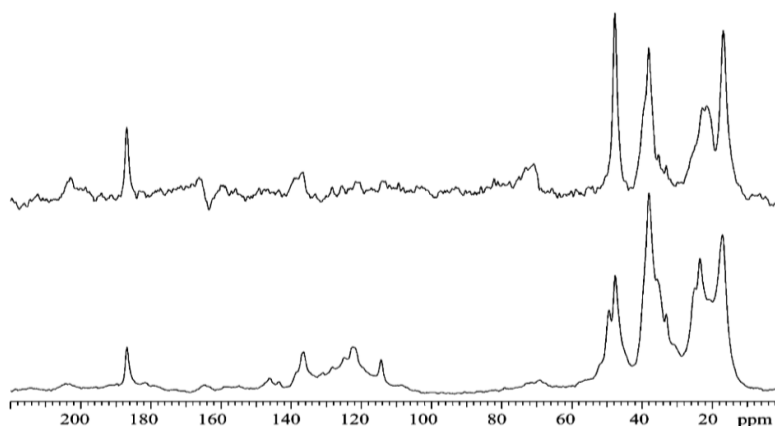


Figura N°4. Espectro de RMN ^{13}C de 75 MHz de la resina de *Pinus rudis* con desacoplamiento normal (inferior) y con desfase dipolar (superior).⁽²⁸⁾

3.3.2 Gomas

El principal componente son los azúcares (Figura N°5) y se presentan como mezclas de oligosacáridos y polisacáridos de alto peso molecular, hidrosolubles o dispersables en agua. Se han usado como adhesivos, acuarelas, productos alimenticios y un ejemplo de ellas es la Goma Arábica.

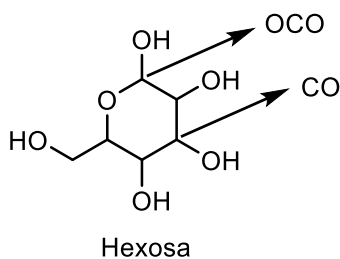


Figura N° 5. Estructura de la hexosa, grupos funcionales característicos de los azúcares.⁽²⁸⁾

Normalmente no hay terpenos, por lo que, la región saturada del espectro de ^{13}C NMR está vacía. Ocasionalmente, se pierde agua de un azúcar para producir moléculas insaturadas como el ácido ascórbico, y la oxidación puede producir ácidos glicáricos con grupo carbonilo. Los azúcares contienen varios enlaces C-O que resuenan en la región δ 60-80, y un solo carbono OCO que resuena en la región δ 95-105. Como los alcoholes simples, ésteres y éteres también resuenan en la región C-O, la región OCO es altamente diagnóstica para los azúcares. Los espectros de *Prunus armeniaca* (albaricoque) no muestran resonancias por debajo de δ 60 (Figura N° 6), indicando la ausencia de resinas.

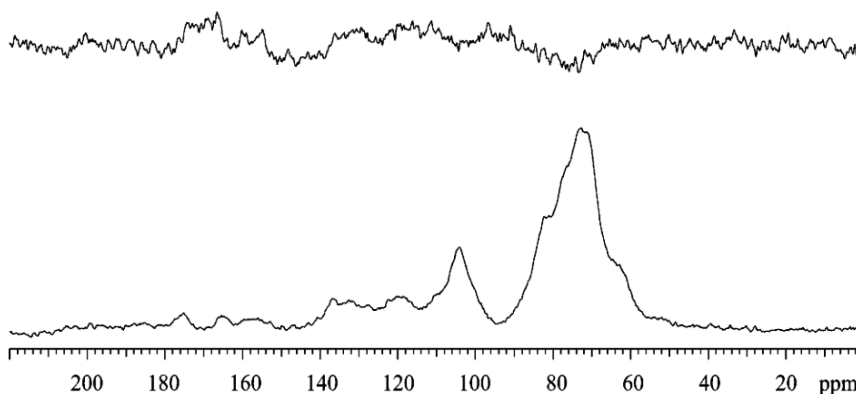


Figura N°6. Espectro de RMN ^{13}C de 75 MHz de la goma de *Prunus armeniaca* con desacoplamiento normal (inferior) y con desfase dipolar (superior).⁽²⁸⁾

Las características dominantes están en la región C-O de δ 60 a 85, con un doble máximo en δ 71 y 74 y dos hombros en δ 62 y 82; lo más crítico es la presencia del pico mediano en δ 104 de los enlaces OCO. Pueden existir resonancias C-O en ausencia de azúcares, pero generalmente son más pequeños y agudos que en las gomas. Además, la ausencia del pico de OCO confirma que la fuente no es un azúcar.⁽²⁸⁾

3.3.3 Goma resinas

Estas contienen terpenos y carbohidratos, entre ellos se encuentran la mirra y el incienso. Los espectros deben exhibir características de ambos grupos:

- Goma, el espectro debe contener una resonancia C-O dominante, una resonancia OCO clara y carecer de todas las resonancias saturadas (terpenoides).
- Resina, el espectro debe contener una banda dominante de resonancias en la región saturada y carecer de la resonancia OCO, aunque puede haber una pequeña resonancia C-O.

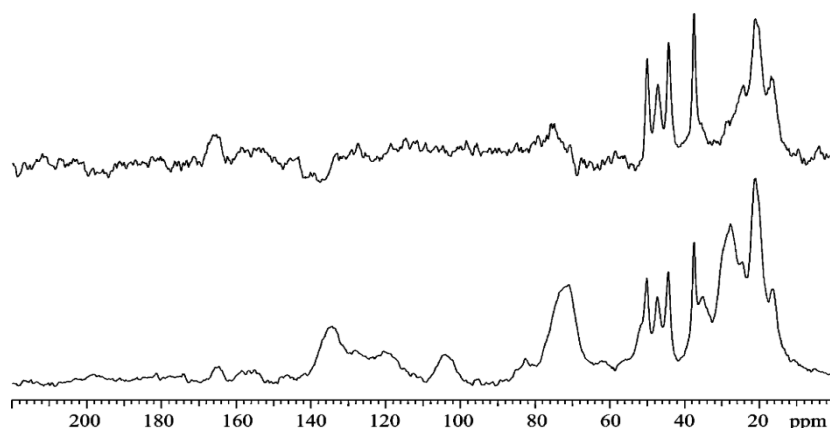


Figura N°7. Los espectros de RMN ^{13}C de 75 MHz de la goma resina de *Schinus molle* con desacoplamiento normal (inferior) y con desfase dipolar (superior).⁽²⁸⁾

El espectro de *Schinus molle* de las Anacardiáceas, posee características clásicas de gomas y resinas (Figura N°7). Tiene una serie de picos de terpenoides en la región δ 15-50, un gran pico de C-O centrado en δ 72 y un pico de OCO pronunciado en δ 104. Tanto resinas como gomas pueden dar resonancias insaturadas y carbonil. Por lo tanto, la goma resina debe contener resonancias saturadas significativas, una resonancia C-O grande y una resonancia OCO significativa.⁽²⁸⁾

3.3.4 Kino

Poseen coloración rojiza profunda, alto contenido de taninos y la propiedad de precipitar proteínas, además carecen de polisacáridos característicos de una goma.⁽³⁰⁾

Los kinos se asemejan en apariencia a las resinas y las gomas, pero sus espectros de resonancia magnética nuclear son drásticamente diferentes, posee las resonancias saturadas de terpenos pequeñas en comparación con las de las resinas, pero exhiben fuertes resonancias insaturadas que dominan los espectros, las cuales son débiles para las resinas y ausentes para las gomas, por lo que se denomina kino a aquellos exudados conformados mayoritariamente por fenoles y compuestos aromáticos.

A manera de ejemplo, el espectro de RMN ^{13}C de kino de *Corymbia citriodora* (Figura N°8), posee en la región insaturada un pico grande en δ 138 y ninguno en δ 155, otro pico grande y ancho de δ 110 a 120 y un nuevo pico en δ 94, mientras que en la región carbonilo tiene un pico sustancial en δ 168. Finalmente, la región saturada (terpenoides) está completamente vacía.⁽²⁷⁾ En el espectro de RMN ^1H del kino *Corymbia citriodora* (Figura N°9), las resonancias son extremadamente agudas. Las regiones de alcano saturado y EWG (Electron-Withdrawing Group, Grupo de Extracción de Electrones: O, N, C=O) de baja frecuencia (0-4) están casi vacías.

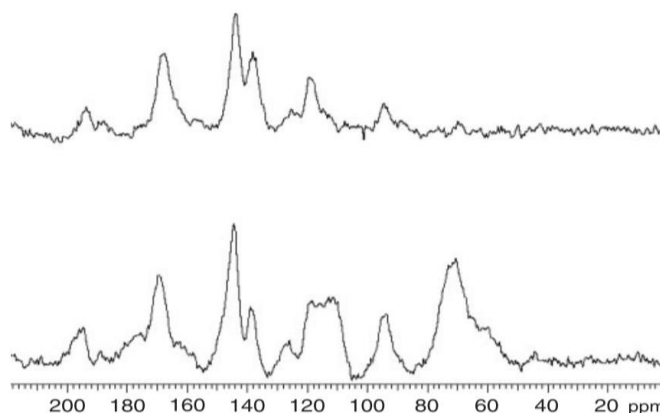


Figura N°8. Espectros de RMN ^{13}C a 100 MHz del kino de *Corymbia citriodora*, con desacoplamiento normal (inferior) y desfase dipolar (superior).⁽²⁷⁾

Las regiones de EWG y alquénicas de alta frecuencia (δ 4-6.5) están ocupadas de manera uniforme por numerosos picos pequeños y agudos. Hay picos de CH aromático en δ 6.8-7.0 (fenólico) y 7.3-7.6 (areno). El único pico amplio en los

espectros es el de δ 8.5-9.5 a partir de protones OH fenólicos. Hay picos de ácido carboxílico y aldehídicos significativos en la región $\delta > 9.5$.⁽²⁷⁾

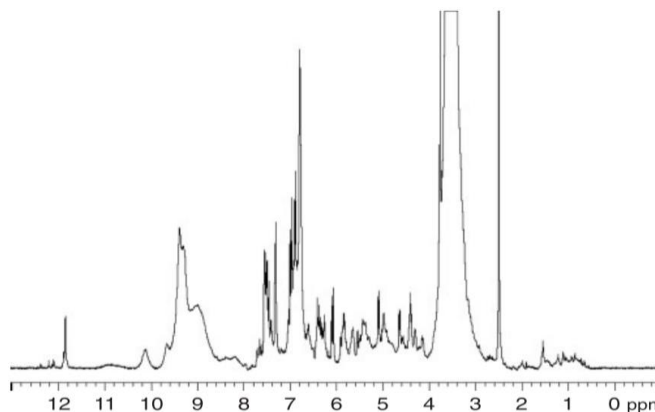


Figura N°9. Espectro de RMN ^1H a 500 MHz del kino de *Corymbia citriodora*.⁽²⁷⁾

3.3.5 Látex

Con frecuencia son líquidos lechosos blanquecinos que consisten en gotículas de compuestos orgánicos suspendidos o dispersos en un medio acuoso. Pueden distinguirse fácilmente por su espectro de RMN distintivo de poliisopreno lineal.⁽²⁸⁾

3.4 GENERALIDADES DEL PROCESO OXIDATIVO

3.4.1 Proceso oxidativo

El equilibrio entre oxidantes y antioxidantes determina la salud. Los radicales libres se producen inevitablemente en los organismos causando trastornos degenerativos, como mutagénesis, carcinogénesis, trastornos cardiovasculares y envejecimiento.⁽²⁵⁾ El proceso de óxido reducción tiene dos fases, la oxidación, que implica la pérdida de electrones de hidrógeno con la ganancia de oxígeno en la molécula y la reducción, que implica la ganancia de electrones de hidrógeno con la pérdida de oxígeno.

3.4.2 Estrés oxidativo

Se refiere a la acción de un radical libre que afecta a las células, en condiciones normales se logra un equilibrio entre la producción de especies reactivas y

mecanismos antioxidantes endógenos del cuerpo. Este equilibrio disminuye la toxicidad y daño celular por oxidación, si hay una proliferación descontrolada de radicales o un déficit del sistema antioxidante el equilibrio se rompe.

3.4.3 Radicales libres

Son especies químicas que tienen en su estructura uno o más electrones no apareados, altamente reactivos y clave para formar otros radicales libres en cadena, con vida media de microsegundos, pero con rápida propagación y daño potencial a tal punto que un radical libre puede dañar un millón de moléculas durante la reacción en cadena.

Se liberan durante el metabolismo, pero también se producen por contaminantes ambientales, radiaciones, alcohol, tabaco, drogas, alimentación no adecuada, fertilizantes o pesticidas, incluso con el elevado estrés físico o psíquico.⁽⁹⁾ Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las especies reactivas de nitrógeno (ERN) son compuestos que dañan las células e incluyen radicales libres y sustancias que son altamente reactivas y con capacidad oxidante. Las especies reactivas se generan principalmente en peroxisomas, mitocondrias y el retículo endoplásmico.

3.4.4 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

3.4.4.1 Radicales libres

3.4.4.1.1 Anión superóxido ($\cdot\text{O}_2$)

Resulta de la reducción incompleta del oxígeno, donde adquiere 1 electrón ($\cdot\text{O}_2$), siendo precursor de otros oxidantes reactivos y tóxicos. No atraviesa membranas por sí solo, pero actúa lejos del sitio de producción por los transportadores de aniones. El principal efecto tóxico del anión superóxido y el peróxido de hidrógeno es dado por los radicales hidroxilos formados en la reacción de Haber–Weiss:



3.4.4.1.2 Hidroxilos ($\cdot\text{OH}$)

Pueden formarse por exposición a rayos gamma (γ) o en la reacción de Haber–Weiss, y también en la reacción de Fenton si hay metales de transición:



Atraviesan fácilmente membranas, pero en general reaccionan cerca de su origen, es la especie de oxígeno reactiva más poderosa y dañina, reacciona con muchos compuestos orgánicos tomando un electrón, forma agua y el sustrato se convierte en un radical, así también, es el principal iniciador de la peroxidación lipídica.

3.4.4.2 Compuestos no radicales

3.4.4.2.1 Oxígeno singlete

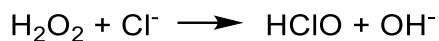
La molécula de oxígeno (O_2) en estado basal, tiene dos electrones no apareados con giro paralelo, uno en cada uno de los dos orbitales externos, siendo birradical y se denomina oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$). Este reacciona muy lento y para aceptar un par de electrones, uno de los electrones no apareados debe revertir su giro, lo que impone una barrera termodinámica.

3.4.4.2.2 Peróxido de hidrógeno

Es una molécula reactiva que participa en reacciones que resultan en otros productos reactivos. Puede atravesar las membranas, lo que le permite causar daños lejos de su lugar de origen. Comúnmente las reacciones catalizadas por oxidasas forman peróxido de hidrógeno, se forma abundantemente en peroxisomas, al degradar ácidos grasos de más de 20 carbonos.

En las células fagocíticas, la mieloperoxidasa activada durante la explosión respiratoria u oxidativa produce peróxido de hidrógeno que puede reaccionar con los iones de cloruro para producir oxidantes y bactericidas poderosos como el

ácido hipocloroso (hipoclorito, ClO^-) y los radicales hidroxilos, siendo la principal línea de defensa contra patógenos.



3.4.5 Especies reactivas de nitrógeno (ERN)

3.4.5.1 Radicales libres

3.4.5.1.1 Óxido nítrico (NO^\cdot)

Altamente reactivo por lo que su vida es menor a 5 segundos, la liberación repentina del óxido nítrico tiene efectos tóxicos en bacterias, células tumorales y otras partículas fagocitadas. Durante la explosión respiratoria en macrófagos (rápida liberación de especies reactivas de oxígeno), el óxido nítrico y el radical superóxido pueden reaccionar y producir una molécula oxidante activa, el ácido peroxinitroso que a pH neutro es peroxinitrito.

3.4.5.1.2 Peroxinitrito (ONO_2^-)

Reacciona con residuos de cisteína y metionina en las proteínas, también con los residuos de tirosina, agregando NO_2 al anillo de benceno de este aminoácido. Mediante la modificación de proteínas, el estrés oxidativo puede afectar los sistemas de transducción de señales.⁽⁶⁾

3.4.5.1.3 Dióxido de nitrógeno (NO_2^\cdot)

3.4.5.1.4 Ácido nitroso (HNO_2)

3.4.6 Relación con el envejecimiento

Se ha mencionado que la expectativa de vida humana podría aumentar al disminuir los procesos oxidativos. Los radicales libres como las especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden alterar la membrana interna o el ADN mitocondrial, llevando a una mayor producción de ERO, mayor daño y estrés oxidativo y pérdida del equilibrio.

El genoma mitocondrial es susceptible al ataque de los radicales que la misma mitocondria genera, esto sumado al estrés oxidativo puede asociarse a enfermedad conduciendo a destrucción celular propia del envejecimiento, cabe destacar que al envejecer disminuye la protección antioxidante, sin embargo, la longevidad parece aumentar al incluir antioxidantes en la dieta con una reducción calórica. Una situación constante de estrés oxidativo puede alterar el sistema inmunológico, estos cambios degenerativos pueden conllevar a formación de cataratas, inicios de Alzheimer, Parkinson o problemas cardiovasculares.⁽⁹⁾

3.5 GENERALIDADES DE LOS ANTIOXIDANTES POLIFENÓLICOS

Los antioxidantes son compuestos endógenos o exógenos, que intervienen ya sea en la iniciación, propagación o finalización del proceso oxidativo mediado por radicales libres.⁽²⁵⁾ Hay dos tipos principales de antioxidantes, el "primario" (ruptura de la reacción en cadena, secuestradores de radicales libres) y el "secundario" o "preventivo" que pueden incluir la desactivación de metales, la regeneración de antioxidantes "primarios", eliminar el oxígeno singlete, entre otros.⁽⁵⁴⁾ Un antioxidante tiene la capacidad de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, al poseer un electrón desapareado son altamente reactivos, el antioxidante aun a bajas concentraciones previene o retarda significativamente la oxidación.⁽⁵⁸⁾

Los polifenoles son de los principales metabolitos secundarios de las especies vegetales. Estos intervienen en el crecimiento, reproducción y procesos defensivos contra agentes biológicos o físicos. En su estructura presentan más de un grupo fenol, son reactivas y regularmente están unidas a azúcares, como glucosa, galactosa, arabinosa, ramosa, xilosa o los ácidos glucorónicos, galacturónicos, ácidos carboxílicos, aminoácidos y lípidos.

La actividad biológica de los polifenoles está relacionada con su carácter antioxidante debido a la capacidad de quelar metales, inhibir la actividad de la lipooxigenasa y atrapar radicales libres. La cantidad y tipo de polifenoles

presentes en un alimento varía en función de la especie, parte vegetal, exposición solar, grado de madurez, condiciones de cultivo, procesado y almacenamiento, entre otros.⁽¹⁵⁾

3.5.1 Metabolitos secundarios polifenólicos con actividad antioxidante

El fenol es la estructura básica de los compuestos fenólicos (Figura N°10) y está constituido por un anillo aromático que se une a un grupo hidroxilo.

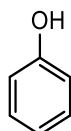


Figura N°10. Estructura química del fenol.

Los polifenoles son en su mayoría potentes antioxidantes al donar electrones o H^+ , además son parte del sistema de defensa contra microorganismos, insectos y herbívoros, así como también a radiaciones ultravioletas y relativas altas temperaturas. Están ampliamente distribuidos en frutas y vegetales, encontrándose generalmente conjugados con uno o más residuos de azúcar por medio de los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se producen uniones directas entre el azúcar y un carbono aromático.⁽²³⁾

Los compuestos fenólicos se forman por la vía del ácido shikímico, comenzando con la producción de fenilalanina y tirosina. La fenilalanina es el sustrato de la fenilalanina amonio-liasa, enzima que conduce a la formación de polifenoles. Otros compuestos fenólicos como el ácido gálico se forman por la 3-dehidroshikimato, vía dehidroshikimato deshidrogenasa.⁽⁴⁵⁾

En los últimos años ha aumentado el interés por los compuestos fenólicos debido a su contribución a la salud, la ingesta de ellos en la dieta habitual puede ayudar a atenuar enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer que se asocian con el estrés oxidativo.⁽⁵²⁾

3.5.1.1 Fenoles simples

Los fenoles vegetales se sintetizan a partir de hidratos de carbono a través de la vía del shikimato, ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos exclusiva para microorganismos y plantas.

Dichos fenoles están en todas las frutas y hortalizas, en casi toda la planta, pero difiere la cantidad entre cada parte, individuo y poblaciones de la misma especie.⁽⁴⁷⁾ Son compuestos que tienen dos (en las posiciones 1,2; 1,3 o 1,4) o tres (en las posiciones 1, 3, 5 o 1, 2, 3) grupos hidroxilo en el anillo aromático (Figura N°11).⁽⁴⁵⁾

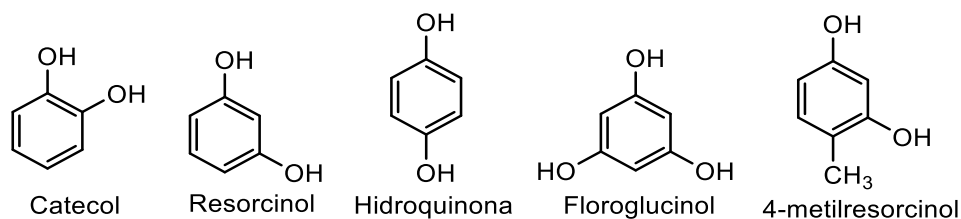


Figura N°11. Estructura química de algunos compuestos fenólicos simples.⁽⁴⁵⁾

3.5.1.2 Fenoles ácidos

Se dividen en ácidos hidroxibenzóicos y en ácidos hidroxicinámicos, la presencia de más de un grupo hidroxilo y una mayor separación del grupo carbonilo al anillo aromático (Figura N°12), aumentan la capacidad antioxidante, por lo tanto, los ácidos hidroxicinámicos tienen mayor capacidad antioxidante que los ácidos hidroxibenzóicos.⁽⁴⁵⁾

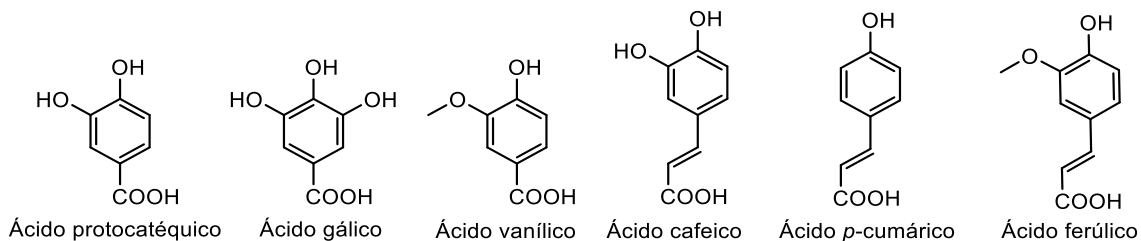


Figura N°12. Estructura química de ácidos fenólicos.⁽⁵²⁾

3.5.1.2.1 Ácidos hidroxibenzóicos

Son ácidos fenólicos que tienen un esqueleto C₆-C₁ de ácido hidroxibenzóico, presentan un grupo carboxílico y grupos hidroxilo (uno o más) en un anillo aromático (Figura N°13) e incluyen los ácidos protocatéquico, gálico, vanílico, gentísico y siríngico. Existen principalmente en los alimentos como glucósidos; los tipos más comunes de glucósidos incluyen los ácidos *p*-hidroxibenzóico, protocatéquico y vanílico. Están presentes en frutas, verduras y cereales, además de la capacidad antioxidante, presentan actividad hepatoprotectora como es el caso del ácido protocatéquico.^(45; 60)

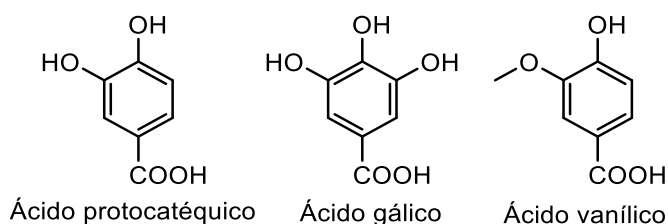


Figura N°13. Estructura química de algunos ácidos hidroxibenzóicos.⁽⁴⁵⁾

3.5.1.2.2 Ácidos hidroxicinámicos

Caracterizados por la presencia del grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ en reemplazo del grupo COOH de los ácidos hidroxibenzóicos (Figura N°14). El doble enlace entre carbonos aumenta la resonancia, la deslocalización de electrones y de la misma manera la actividad antioxidante, además de eso, poseen actividades antígenotóxicas y antiproliferativas. Las uvas, manzanas, arándanos, espinacas, brócoli, el café y los cereales son algunas de sus fuentes.⁽⁴⁵⁾

Entre los ácidos fenólicos, el ácido ferúlico, es el ácido hidroxicinámico más abundante en el mundo vegetal, ha mostrado actividades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, antitrombosis y anticancerígenas; también son abundantes los ácidos hidroxicinámicos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinapínico (Figura N°14).⁽¹⁶⁾

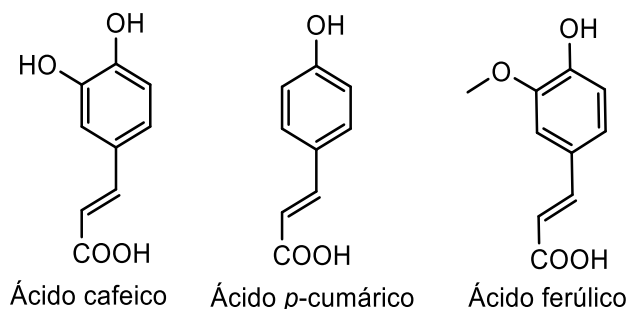


Figura N°14. Ácidos hidroxicinámicos de mayor recurrencia en la naturaleza.⁽¹⁶⁾

Las propiedades antioxidantes se atribuyen a su estructura (Figura N°15), específicamente al núcleo fenólico acoplado a una cadena lateral conjugada extendida que facilita la formación de un radical fenoxi estabilizado por resonancia. Además, los grupos donadores de electrones en el anillo de benceno (3-metoxilo y, más importante, 4-hidroxilo) proporcionan la propiedad de terminar las reacciones de la cadena de radicales libres; el doble enlace C-C adyacente proporciona sitios de ataque adicionales para los radicales libres evitando así que ataquen las membranas; y el grupo ácido carboxílico que actúa como un grupo de anclaje que lo une a la bicapa lipídica, brindando cierta protección contra la peroxidación lipídica.⁽¹⁾

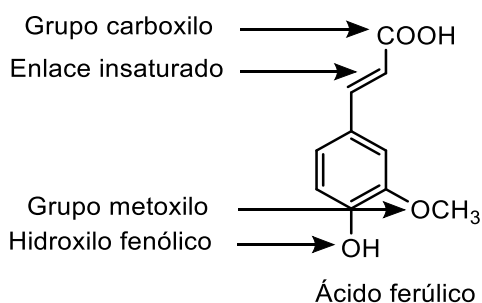


Figura N°15. Estructura química del ácido ferúlico, grupos funcionales de importancia en la actividad antioxidante.⁽¹⁾

3.5.1.3 Cumarinas

Contienen un anillo aromático unido a un heterociclo con oxígeno, se consideran fenoles cuando el grupo hidroxilo está unido a un esqueleto de cumarina, como

en la umbeliferona, el grupo hidroxilo se encuentra en la posición 7 (Figura N°16) y entre sus propiedades están la actividad antioxidante y antibacteriana.⁽⁴⁵⁾

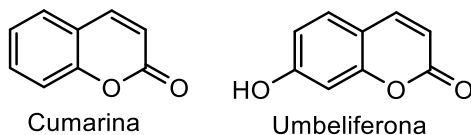


Figura N°16. Ejemplos de estructuras químicas de cumarinas simples.⁽⁵⁾

El núcleo de cumarina consiste en un anillo pirona unido a un anillo de benceno. Derivan de la isomerización *trans-cis* de la cadena lateral del ácido *o*-cumárico seguida de la lactonización.

Las cumarinas son 1,2-benzopironas (benzo-2-pironas, cromeno-2-onas) y se clasifican como: cumarinas simples, furanocumarinas y piranocumarinas (Figura N°17), además de cumarinas sustituidas con pirona (benzocumarinas y furano-benzocumarinas con anillo de benceno o benzofurano respectivamente). Los isómeros de las cumarinas (isocumarinas) también se encuentran en las plantas.

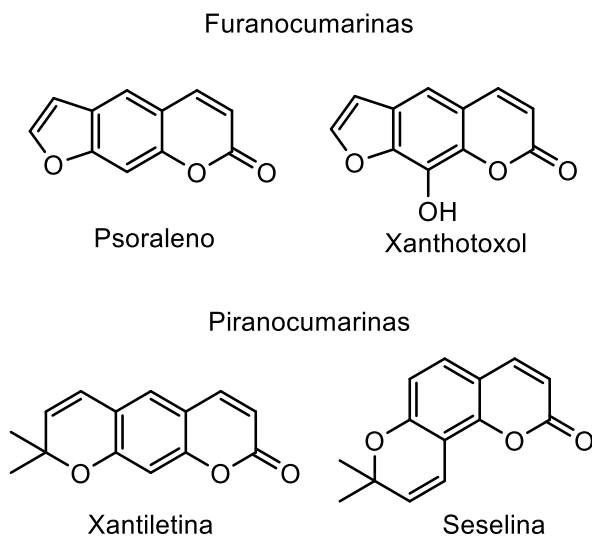


Figura N°17. Ejemplos de furanocumarinas y piranocumarinas.⁽⁵⁾

3.5.1.4 Xantonas, estilbenos y benzofenonas

Sus estructuras se relacionan debido a que poseen dos anillos aromáticos unidos por cetona, cetonas heterocíclicas o grupos vinilo (Figura N°18). El resveratrol es

un estilbeno antiinflamatorio y con actividad contra artritis, enfermedades cardiovasculares y retrasa el envejecimiento, mientras que las xantonas muestran actividad antiprotozoaria y contra Leishmania.⁽⁴⁵⁾

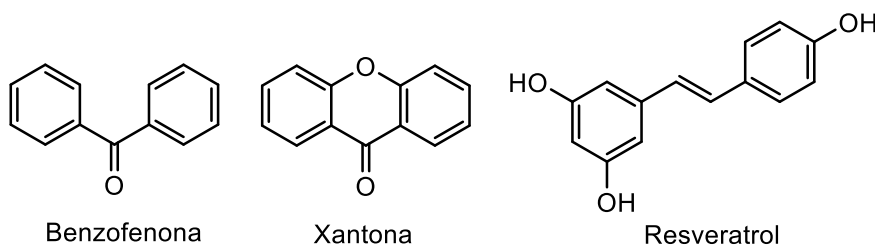


Figura N°18. Estructuras básicas de benzofenonas, xantonas y estilbenos.⁽⁴⁵⁾

3.5.1.5 Quinonas

Se caracterizan por un anillo diona completamente conjugado. Se clasifican como (1) ubiquinonas, como la coenzima Q10, (2) antraquinonas, cuando tienen dos anillos fenólicos en la estructura de quinona como la emodina y (3) naftoquinonas, que tienen un solo anillo aromático ligado al anillo conjugado por un grupo cetona doble (Figura N°19). Las quinonas poseen propiedades redox y la coenzima Q10 es un potente antioxidante.⁽⁴⁵⁾

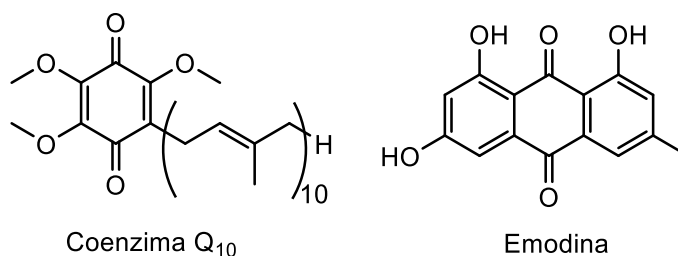


Figura N°19. Quinonas, estructura de la coenzima Q10 (ubiquinona) y la emodina (antraquinona).⁽⁴⁵⁾

3.5.1.6 Benzoquinonas

Proviene de la ruta del acetato y se forman a partir de las quinonas (dicetonas insaturadas), que al reducirse se convierten en polifenoles que pueden regenerarse por oxidación (Figura N° 20).

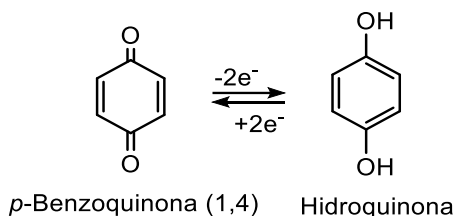


Figura N°20. Oxidación y reducción de benzoquinonas.

3.5.1.7 Betacianinas

Son pigmentos presentes en alimentos como la remolacha, en este caso los componentes responsables de la coloración roja son la betanidina (Figura N°21) y la isobetanidina, que han demostrado una alta capacidad antioxidante *in vitro*.⁽⁴⁵⁾

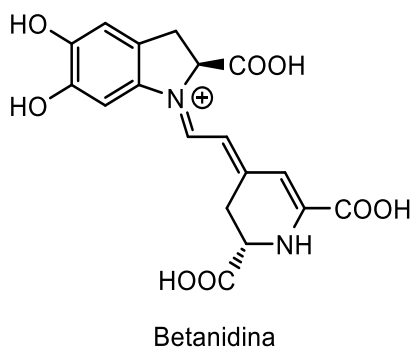


Figura N°21. Estructura química de la betanidina.

3.5.1.8 Lignanos y ligninas

Los lignanos son compuestos fenólicos dímeros derivados de la fenilalanina y alcoholes cinámicos presentes en varios alimentos como granos, hortalizas y uvas. Presentan capacidad antioxidante y se consideran fuente de fitoestrógenos, particularmente el sesamol, un derivado de la sesamina (Figura N°22).

Las ligninas son polímeros fenólicos complejos con estructuras muy heterogéneas y se polimerizan con azúcares. Su función biológica proporcionar apoyo estructural y de transporte de agua en las plantas.⁽⁴⁵⁾

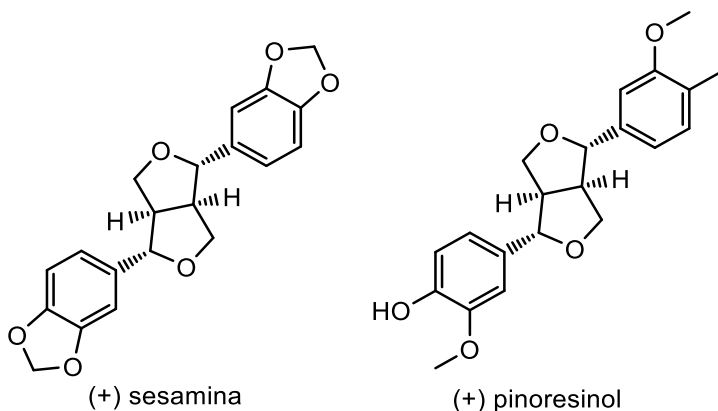


Figura N°22. Estructura química de sesamina y pinoresinol

3.5.1.9 Flavonoides

La estructura básica de los flavonoides (Figura N°23) consta de tres anillos: un anillo aromático dihidroxilado en las posiciones 5 y 7 (anillo A), un segundo anillo fenólico generalmente mono-hidroxilado (anillo B) que también pueden contener grupos metoxi y el anillo heterocíclico (anillo C).⁽⁴⁵⁾

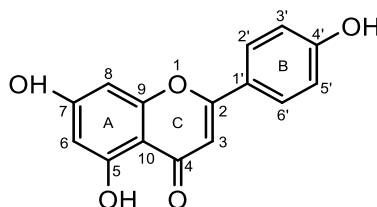


Figura N°23. Estructura básica de un flavonoide.⁽⁴⁵⁾

Los flavonoides son derivados benzo-gamma-pirona y ofrecen a las plantas protección frente a patógenos, herbívoros y a la radiación ultravioleta. Poseen propiedades antioxidantes y quelantes de metales; son capaces de prevenir el daño producido por los radicales mediante los siguientes mecanismos: (1) Neutralización directa de las ERO, (2) activación de enzimas antioxidantes, (3) actividad quelante de metales, (4) reducción de radicales de α -tocoferol, (5) inhibición de oxidasas, (6) mitigación del estrés oxidativo causado por óxido nítrico y (7) aumento de los niveles de ácido úrico.⁽⁵⁸⁾

La actividad antioxidante de los flavonoides depende de su estructura, por lo que alquilaciones o la glicosilación conduce a un aumento o disminución de la actividad. Físicoquímicamente el almacenamiento, luz, oxígeno, pH, temperatura y oscuridad son factores que provocan variaciones significativas en la actividad antioxidante, especialmente el oxígeno y la luz, que generan degradación severa de los flavonoides, sin embargo, son estables ante la luz en alimentos crudos debido a la protección que les proporciona la matriz vegetal, mientras que en alimentos procesados sufren fotodegradación.

Los flavonoides no son estables incluso en la oscuridad y con una cantidad baja de oxígeno, los que no poseen una estructura enona exhiben la mayor estabilidad, mientras que aquellos con un grupo hidroxilo en la posición 3 son los más sensibles.

Estos son un grupo de compuestos relacionados estructuralmente divididos por el grado de hidroxilación, metoxilación, prenilación, glicosilación y unión del anillo B en la posición C-2 (más frecuentemente) o C-3. Las características estructurales básicas de los flavonoides se presentan en la Figura N°24.⁽⁵⁾

La degradación lleva a un aumento de la actividad antioxidante en el caso de la rutina y el mesquitol, indicando que la actividad antioxidante de los productos de degradación es mayor en comparación con las moléculas nativas, así como, los efectos sinérgicos entre las moléculas nativas y las neoformadas también pueden ser el origen de este aumento.⁽⁸⁾

Los flavonoides son sintetizados en plantas a través de la vía metabólica fenilpropanoide o acetato-malonato y se han informado más de diez mil variantes estructurales. El término "flavonoide" describe metabolitos secundarios generalmente con estructuras C6-C3-C6 que forman un núcleo de 2-fenilbenzo-gamma-pirano (cromano) que consiste en dos anillos de benceno (A y B) unidos a través de un anillo pirano heterocíclico (C). Los flavonoides se clasifican de

acuerdo con el nivel de oxidación del anillo C del pirano central. En las flavonas y los flavonoles, los grupos hidroxilo están presentes principalmente en el C-5 y C-7 (anillo A), C-4' (anillo B), y algunas veces uno de esos grupos está ausente. Otra posible hidroxilación ocurre en el C-3' y C-5' (anillo B) y C-3 o C-2 (anillo C).

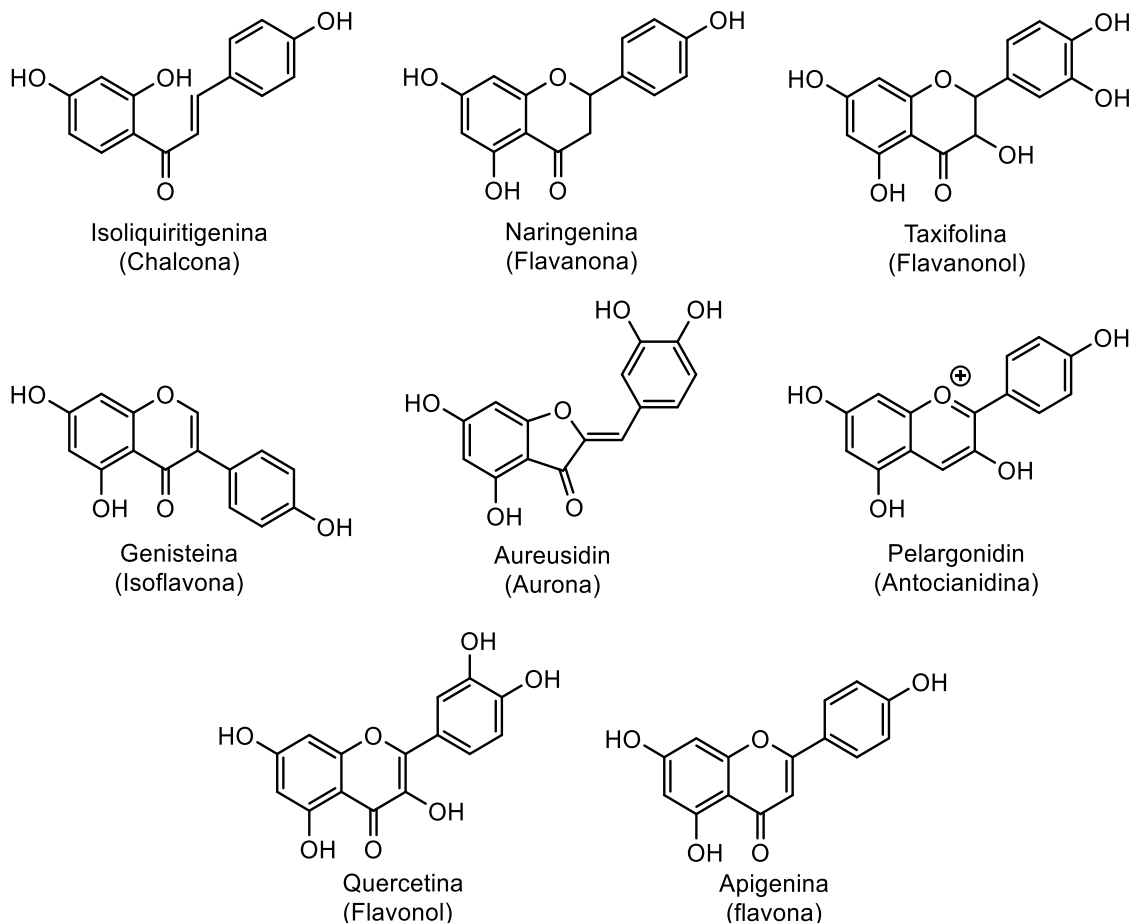


Figura N°24. Características estructurales básicas de los diferentes tipos de flavonoides.⁽⁵⁾

La diferencia también depende de la presencia de un doble enlace entre el C-2 y C-3, que está ausente en las flavanonas donde el C-2 asimétrico está generalmente en la configuración 2S. Las isoflavonas se caracterizan por la unión del anillo B de fenol en la posición C-3. Las chalconas y dihidrochalconas tienen la estructura C3 de cadena abierta con una funcionalidad cetona y una insaturación α, β que une los anillos A y B (en lugar de un anillo C heterocíclico),

distinguiéndolos de otros flavonoides. Las auronas son 2-bencilidenocoumaranonas, y las antocianidinas tienen una estructura de 2-fenilbenzopirilo. También las antocianidinas están frecuentemente presentes como estructuras oligoméricas y poliméricas.⁽⁵⁾

3.5.1.9.1 Chalconas

Son flavonoides que difieren de la estructura básica, ya que tienen una cadena lineal para conectar los anillos A y B en lugar del anillo heterocíclico C (Figura N°25). Son pigmentos amarillos que suelen dar color a flores y frutas.⁽⁴⁵⁾

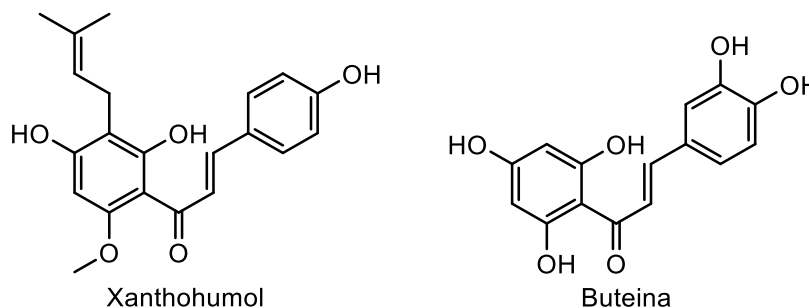


Figura N°25. Estructura química de chalconas comunes.

La actividad de las chalconas está relacionada a (1) la presencia de sustituyentes que retiran electrones en el anillo A o un anillo de quinolina en esta ubicación favorece una buena actividad, (2) en general, la presencia de grupos donantes de electrones en el anillo B se asocia con una mejor actividad y (3) un puente cetona α - β insaturado es esencial para la actividad.⁽³⁸⁾

Las chalconas están compuestas por dos núcleos aromáticos unidos por un puente carbonilo α - β insaturado de tres carbonos. La interconversión isomérica de chalconas y flavononas en presencia de ácido o base las hace importantes ligandos.

El oxígeno carbonilo y/u otro(s) heteroátomo(s) en la molécula actúan como donadores de electrones para la formación de complejos con iones metálicos.⁽³²⁾

3.5.1.9.2 Auronas

El nombre "aurona" proviene de la palabra latina *aurum* (oro) debido al color amarillo dorado de los pigmentos en muchas plantas. Químicamente son un anillo heterocíclico de benzofuranona que contiene un grupo fenilo unido a través de un doble enlace exocíclico carbono-carbono (Figura N°26).

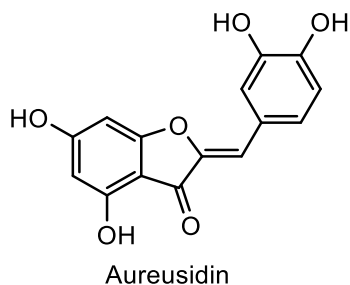


Figura N°26. Estructura química de una aurona común, aureusidina.⁽⁴⁵⁾

La principal ventaja de las auronas es su alta estabilidad, en comparación a las chalconas, y su simplicidad, aunque tienen presencia limitada en la naturaleza, son un grupo bioactivo muy prometedor con diversas actividades biológicas que incluyen la antioxidante, anticancerígena, antiparasitaria, antiinflamatoria, antimicrobiana, antimalárica, antileishmanial y propiedades anti-Alzheimer, también pueden ayudar en el tratamiento de la hiperuricemia y la gota.^(3; 22)

3.5.1.9.3 Flavononas y flavanoles

Se diferencian por el anillo C (Figura N°27), en flavononas es un anillo heterocíclico saturado de seis miembros, con un grupo cetona en la posición 4 del anillo heterocíclico de oxígeno, mientras que en flavanoles existe un grupo hidroxilo que se añade al anillo en la posición 3, cerca del grupo cetona. La naringenina usualmente está presente en frutas cítricas y se ha encontrado que exhibe efectos antioxidantes, antimutagénicos y anticarcinogénicos, previene la peroxidación lipídica y el daño celular hepático, además protege el sistema antioxidante en la hepatocarcinogénesis inducida por *N*-nitrosditilamina.^(4; 45)

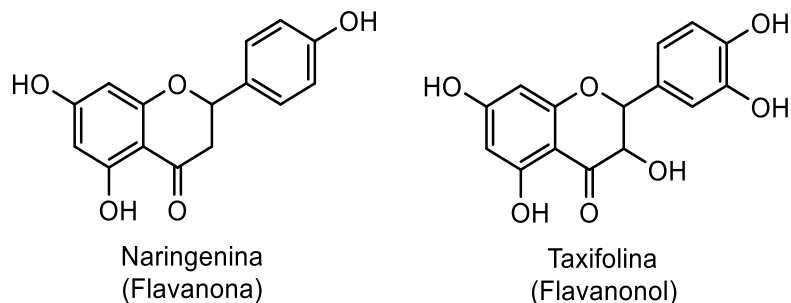


Figura N°27. Diferencias estructurales entre flavanonas y flavanonoles.⁽⁴⁵⁾

3.5.1.9.4 Flavonas y flavonoles

Estos compuestos son similares a flavononas y flavanonoles, con la diferencia que presentan en su anillo C un doble enlace entre las posiciones 2 y 3 (Figura N°28). Suelen encontrarse en alimentos vegetales en forma de O-glicósidos y C-glicósidos. Poseen actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antígenotóxicas y antihiper glucemiantes.⁽⁴⁵⁾

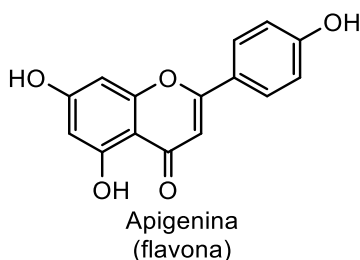


Figura N°28. Estructura química de la apigenina, una flavona.⁽⁴⁵⁾

Los flavonoles poseen el esqueleto de 3-hidroxi flavona y existen como mono, di o triglicósidos en las especies vegetales; están involucrados en los procesos de crecimiento, desarrollo y defensa de las plantas, como la protección contra los daños causados por radiación ultravioleta y la invasión de patógenos o insectos, además mejoran la tolerancia a la sequía y la oxidación, atraen polinizadores, intervienen en la interacción entre los pelos radiculares y las bacterias simbióticas, y modulan la apertura de estomas para eliminación de especies reactivas de oxígeno (ERO), pueden regular el crecimiento de brotes y raíces.⁽⁵³⁾

3.5.1.9.5 Isoflavonas y neoflavonoides

Se caracterizan por una diferencia en la posición del anillo B en comparación con la estructura básica de los flavonoides (Figura N°29). En las isoflavonas (3-fenilbenzopirano) el anillo B se encuentra en la posición 3 en el heterociclo C, mientras que en neoflavonoides (4-fenilbenzopirano) el anillo B está en la posición 4 y el grupo de cetona en la posición 2.

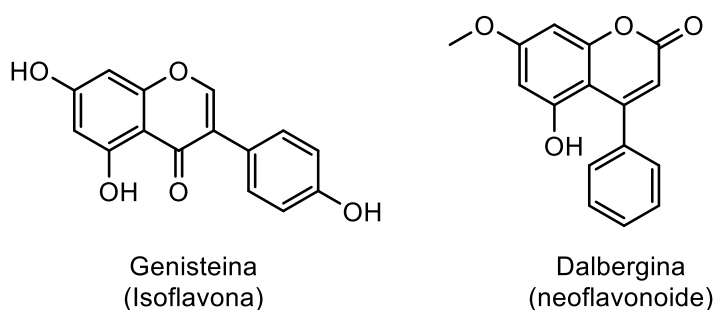


Figura N°29. Diferencia estructural entre isoflavonas y neoflavonoides.⁽⁴⁵⁾

Su consumo en la dieta se asocia con protección contra el cáncer de seno en las mujeres y de próstata en hombres, enfermedades cardiovasculares, cánceres relacionados con procesos hormonales, así como, actividad antioxidante con efectos antiinflamatorios y vasodilatadores.⁽⁴⁵⁾

3.5.1.9.6 Flavanos (flavan-3-oles)

Son compuestos que poseen un hidroxilo en la posición 3 del anillo heterociclo C, que no muestra la instauración entre la posición 2 y 3. En este grupo se encuentran las catequinas, taninos condensados y las leucoantocianinas.⁽⁴⁵⁾

3.5.1.9.6.1 Catequinas

Las catequinas están presentes en la naturaleza como agliconas, presentan en el heterociclo un grupo hidroxilo o galato en la posición 3 y en la posición 2 el grupo fenilo con uno o más sustituyentes hidroxilo (Figura N°30). Están presentes en el cacao en grano, té, arándanos y el vino.

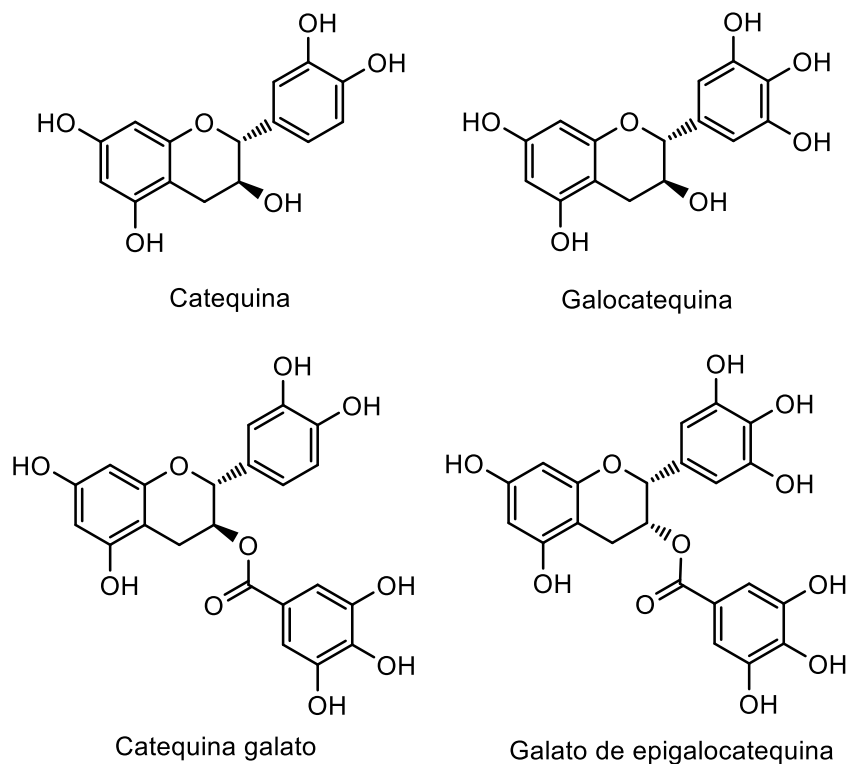


Figura N°30. Ejemplos de estructuras químicas presentadas por catequinas.

Entre las actividades están la antioxidante, antiinflamatoria, la inhibición de la trombosis arterial, reducción del colesterol total y lipoproteína de baja densidad.⁽⁴⁵⁾ La catequina, uno de los principales compuestos fenólicos en el té verde, posee actividades antioxidantes, antidiabéticas, antiinflamatorias, anticancerígenas y antimicrobianas, además, puede injertarse en polisacáridos como el quitosano, el dextrano y la inulina para mejorar las actividades antioxidantes, antidiabéticas y antitumorales de los polisacáridos originales.⁽²⁹⁾

3.5.1.9.6.2 Leucoantocianinas

Pueden ser referidos como flavan-3,4-cis-dioles debido a la presencia de un grupo hidroxilo extra en la posición 4 del heterociclo C, en comparación con las catequinas (Figura N°31). Están presentes en las plantas y son precursores de las antocianinas, catequinas y taninos. Por ejemplo, el compuesto leucocianidina resultó ser precursor en la biosíntesis de flavonoides en las fresas.⁽⁴⁵⁾

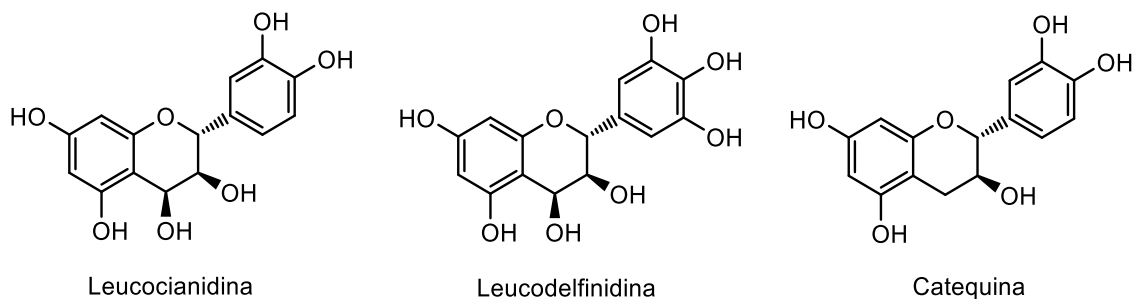


Figura N°31. Diferencia estructural entre leucoantocianinas y la catequina.⁽⁴⁵⁾

3.5.1.9.6.3 Antocianidinas

Su principal característica es la presencia de un catión pirulina como anillo C y un grupo hidroxilo en la posición 3 del mismo anillo. Son agliconas de las antocianinas y se encuentran ampliamente distribuidas. Las antocianidinas principales son la cianidina, pelargonidina, delphinidina, peonidina, petunidina y la malvidina (Figura N°32).

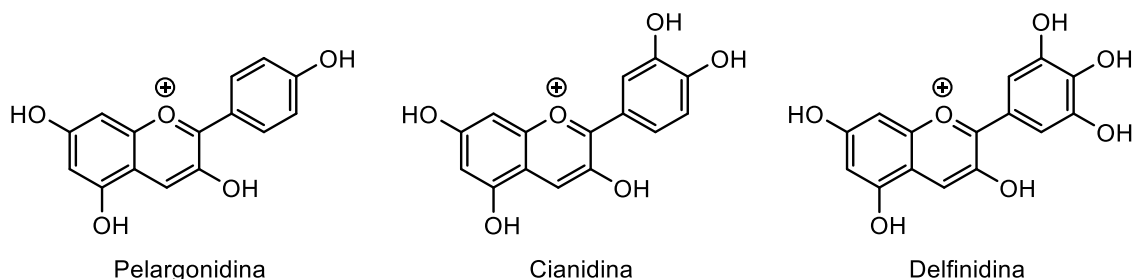


Figura N°32. Estructura química de algunas antocianidinas.⁽⁴⁵⁾

Son responsables del color rojo, naranja, azul, violeta y morado en frutas, flores y demás partes de plantas. Su color depende del pH, los iones metálicos y la combinación de las diferentes antocianidinas. Están ampliamente distribuidas en los alimentos y la más común es la cianidina.⁽⁴⁵⁾

3.5.1.9.6.4 Deoxiantocianidinas

Sus estructuras son similares a las antocianidinas, excepto que no tienen el grupo OH en la posición 3 en el anillo C, razón por la cual se les llama

antocianinas y las antocianidinas aumentan la respuesta antioxidante de las plantas, ayudando a la correcta fisiología de los tejidos.

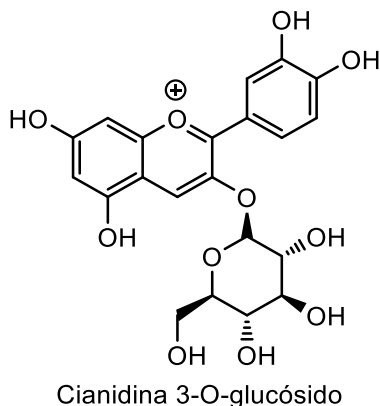


Figura N°34. Ejemplo de estructura química de una antocianina 3-glucósido.

Numerosos estudios han sugerido que las antocianinas poseen numerosas propiedades que promueven la salud humana, mostrando efectos antidiabéticos y antiobesidad y actúan como agentes neuroprotectores. Además, parecen ser capaces de reducir las inflamaciones e influir en la recuperación de las complicaciones de la visión, así como de inhibir el crecimiento del cáncer y, como se observa en las plantas, pueden prevenir o retrasar algunos tipos de daño celular.⁽⁵¹⁾

3.5.1.9.7 Taninos

Son metabolitos secundarios polifenólicos complejos y heterogéneos, biosintetizados por plantas superiores, con altos pesos moleculares, entre 500 y más de 20,000 Da.⁽⁴⁹⁾ Se clasifican según su estructura en taninos condensados, hidrolizables y complejos.⁽⁴⁵⁾

Forman complejos reversibles e irreversibles con proteínas (principalmente), polisacáridos (celulosa, hemicelulosa, pectina, entre otros), alcaloides, ácidos nucleicos y minerales. Los factores que promueven la formación de complejos incluyen su peso molecular relativamente alto y su gran flexibilidad estructural. La alta afinidad por las proteínas es debida al gran número de grupos fenólicos

que proporcionan muchos puntos de unión con los grupos carbonilo de los péptidos. Las proteínas con mayor afinidad por los taninos son relativamente grandes e hidrófobas, tienen una estructura abierta y flexible y son ricas en prolina. Los complejos formados entre taninos y proteínas u otros compuestos son generalmente inestables, los enlaces que los unen continuamente se rompen y se vuelven a formar.

Presentan cuatro posibles tipos de enlaces: (1) enlaces de hidrógeno (reversibles y dependientes del pH) entre los radicales hidroxilo de los grupos fenólicos y el oxígeno de los grupos amida en los enlaces peptídicos de las proteínas, (2) por interacciones hidrófobas (reversible y dependiente del pH) entre el anillo aromático de los compuestos fenólicos y las regiones hidrófobas de la proteína, (3) por enlaces iónicos (reversibles) entre el ion fenolato y el sitio catiónico de la proteína (exclusivo de taninos hidrolizables), y (4) por enlace covalente (irreversible) a través de la oxidación de polifenoles a quinonas y su posterior condensación con grupos nucleófilos de la proteína.

Durante mucho tiempo se creyó que la formación de complejos de taninos y proteínas se debía principalmente a los enlaces de hidrógeno. Sin embargo, ahora se sabe que las interacciones hidrófobas son importantes.⁽¹⁴⁾

3.5.1.9.7.1 Taninos condensados

Los taninos condensados (o proantocianidinas) comprenden un grupo de oligómeros de polihidroxiflavan-3-ol y polímeros unidos por enlaces C-C entre subunidades de flavanol (Figura N°35, 37).⁽⁴⁹⁾ Su reactividad con moléculas de importancia biológica se debe a sus múltiples grupos hidroxilo fenólicos que conducen a la formación de complejos con proteínas, iones metálicos y otras macromoléculas como los polisacáridos.⁽⁴⁸⁾

Los taninos condensados son polímeros de unidades de flavanol. Los grupos sustituyentes R1, R2, R3 en la Figura N°35 pueden influir en la reactividad del

tanino, R2 es un grupo OH, a veces esterificado a ácido gálico, por ejemplo, el galato de epigalocatequina (R1 = R3 = OH, R2 = O-galato), un ingrediente polifenólico importante del té verde.

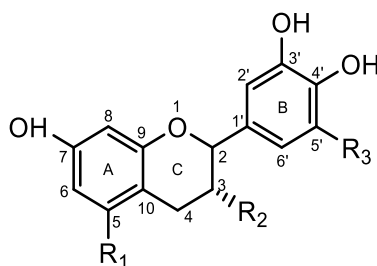


Figura N°35. La unidad básica de repetición en taninos condensados.

La presencia de ésteres de galato en los taninos puede cambiar significativamente sus propiedades biológicas. R1 y R3 pueden ser diferentes combinaciones de grupos OH e H, que conducen a diferentes clases de polímeros de flavanol (Figura N°35).

Así, las procianidinas se pueden distinguir de las prodelfinidinas (Figura N°36) porque las prodelfinidinas tienen un grupo hidroxilo en la posición 5 del anillo B. El acoplamiento oxidativo entre los monómeros de flavanol ocurre más comúnmente entre las posiciones 4 y 8, pero también puede implicar las posiciones 4 y 6 del monómero (Figura N°37) y otras posiciones también.⁽⁴⁸⁾

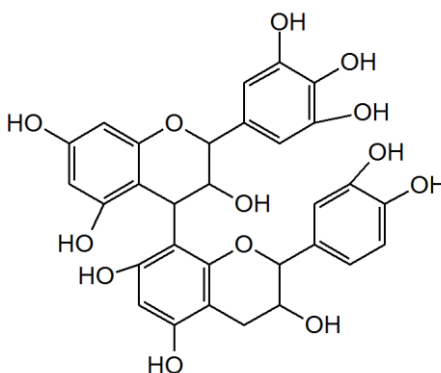


Figura N°36. Prodelfinidina.

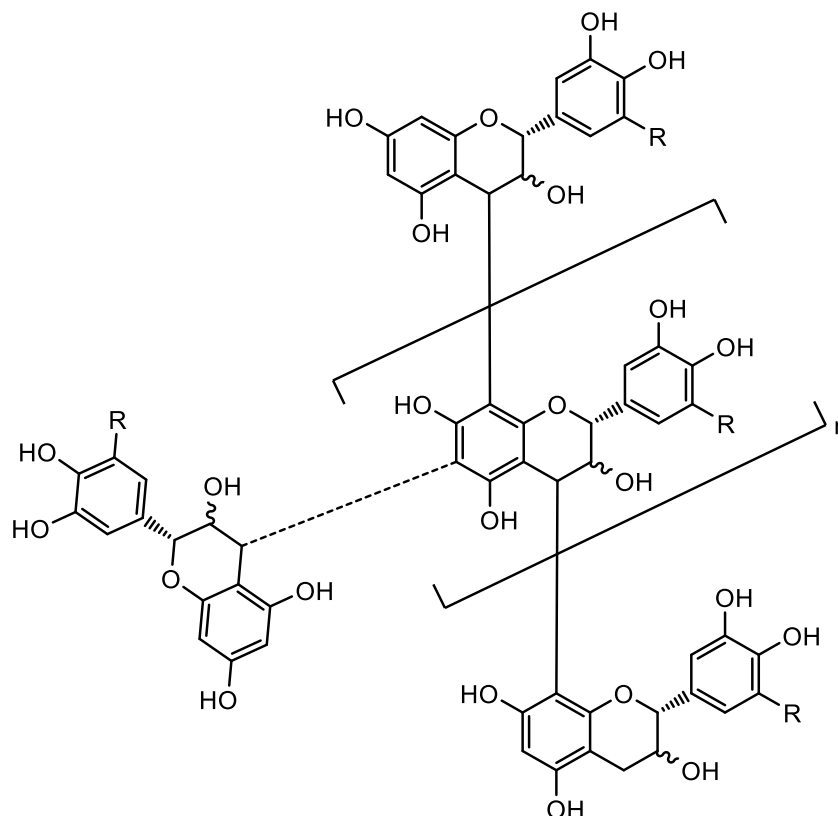


Figura N°37. Modelo de estructura para un tanino condensado. Si R = H u OH, entonces la estructura representa una procianidina o prodelfinidina. El enlace 4-6 (línea de puntos) es un enlace interflavan alternativo.⁽⁴⁸⁾

3.5.1.9.7.2 Taninos hidrolizables

La estructura de los taninos hidrolizables se construye a partir de la molécula básica, 1,2,3-trihidroxibenceno (pirogalol). El nombre de tanino hidrolizable se debe a que experimentan escisión hidrolítica de la glicona (generalmente D-glucosa) después del tratamiento con ácido diluido o por acción enzimática, dando una molécula de azúcar o un alcohol polihídrico relacionado y un ácido carboxílico fenólico. Muchas veces, la fructosa, la xilosa y la sacarosa están presentes como un resto de azúcar básico. Esta escisión hidrolítica está asociada con la esterificación completa o parcial con ácidos fenólicos. Cuando la esterificación se debe al ácido gálico, se denominan galotaninos y, cuando está con ácido elágico, se denominan elagitaninos.^(26; 49)

3.5.1.9.7.3 Galotaninos

Son compuestos complejos que consisten básicamente en un núcleo de glucosa u otro azúcar, esterificados con ácido gálico y sus derivados (Figura N° 38), por lo que son hidrosolubles. Han demostrado tener actividad antioxidante y antibacteriana, además de ser considerados como prometedores aditivos naturales para su uso en alimentos. Encontrados en uvas, fresas y frambuesas.⁽⁴⁵⁾

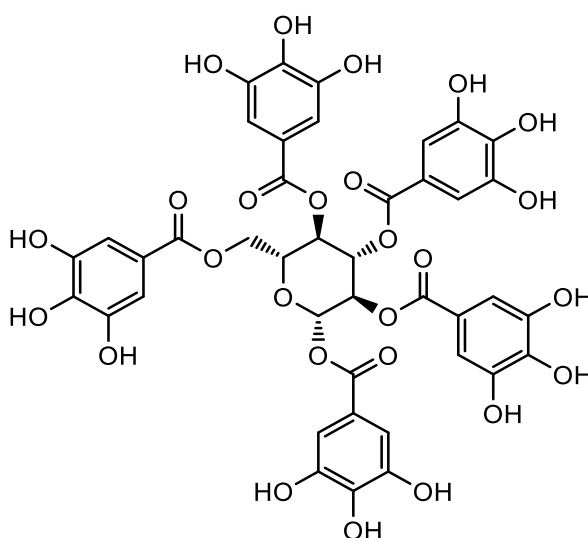


Figura N°38. Estructura química del pentagaloil-glucosa, un galotanino.⁽⁵⁷⁾

3.5.1.9.7.4 Elagitaninos

Están compuestos por un núcleo poliol (glucosa o el ácido quínico) y ésteres del ácido hexahidroxidifenico. En la presencia de bases o ácidos, el ácido hexahidroxidifenico espontáneamente se reordena para formar la unidad de ácido elágico, razón por la cual se les llama elagitaninos. Están principalmente en frutas como el mango y las bayas.

Además de su actividad antioxidante *in vitro*, el ácido elágico ha demostrado actividad antibacteriana. Sin embargo, así como los efectos beneficiosos, se ha asociado hepatotoxicidad con el consumo de elagitaninos en roedores y

rumiantes.⁽⁴⁵⁾ Los elagitaninos son sintetizados en las plantas a partir de los galotaninos por la oxidación de los grupos poliol.⁽⁵⁷⁾

3.5.1.9.7.5 Taninos complejos

Contienen unidades de catequina vinculados a galotaninos o elagitaninos. Está comprobado que los productos del añejamiento en el vino tinto se deben a la reacción entre catequinas de las uvas y galotaninos en los barriles de roble formando estos taninos complejos.

La Acutissimina A es un tanino complejo en el vino tinto (Figura N°39), puede inhibir el crecimiento de células cancerígenas.⁽⁴⁵⁾

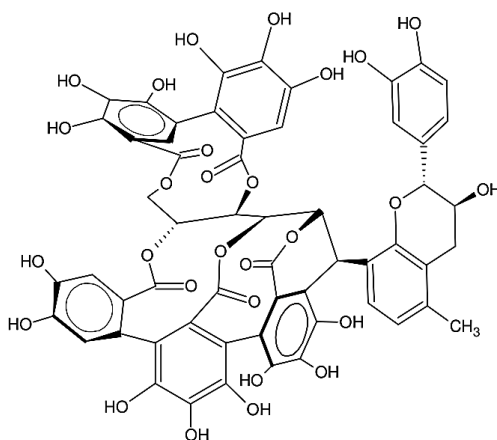


Figura N°39. Acutissimina A, ejemplo de tanino complejo en el vino tinto.⁽⁴⁵⁾

3.5.1.9.8 Flobafenos

Su estructura química es poco conocida, son polímeros de flavan-4-oles. Como ejemplo se pueden tomar las estructuras monómero básicas que corresponden a apiferol y luteoferol (Figura N°40).

Estos compuestos están presentes en el maíz (*Zea mays*) y sorgo (*Sorghum bicolor*) y pueden ser parcialmente responsables del color rojo de algunas variedades de estos cultivos.⁽⁴⁵⁾

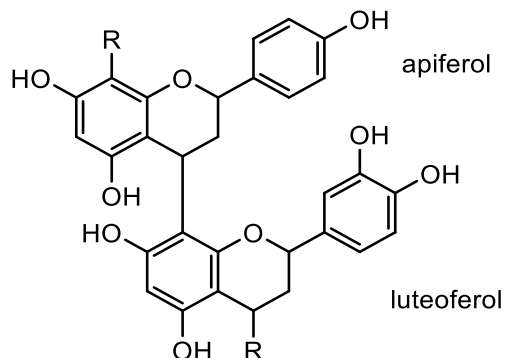


Figura N°40. Ejemplo de la estructura de un flobafeno.⁽⁴⁵⁾

3.5.2 Fuentes exógenas de antioxidantes

Entre los flavonoides destacados se encuentran las antocianidinas (rojo-azulado de fresas), catequinas (té verde y negro), citroflavonoides (naringina, que da sabor amargo a la naranja, limón y toronja), isoflavonoides (genisteína y daidzaína presentes en soya y sus derivados). Protoantocianidinas en semillas de uva y vino tinto.

La ingesta de flavonoides puede ser de 20-26 mg/día contenidos en frutas y verduras. El consumo excesivo da problemas de toxicidad. Los taninos están presentes por ejemplo en el vino y son astringentes.

Entre los productos con antioxidantes, más consumidos, están aquellos con vitamina E: aguacate, aceite de oliva, arroz integral, frutas secas; con vitamina C: acelgas, tomates (licopeno), todos los cítricos (limón, naranja, mandarina), además kiwi, fresa, guayaba; con β -caroteno: zanahoria, espinacas, mango, melón; con flavonoides: té verde, vino, manzana, o peras. El tomate de árbol tiene una cantidad moderada de antioxidantes y el noni una cantidad elevada.⁽⁹⁾

3.6 ENSAYO DE FOLIN-CIOCALTEU

Inicialmente se empleó para cuantificar tirosina en proteínas, pero posteriormente fue modificado para analizar compuestos polifenólicos en extractos vegetales. El

reactivo principal del ensayo, denominado “reactivo de FC”, está formado por una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico de color amarillo, a partir de los cuales, se producen iones de molibdato y tungsteno, existiendo una mayor cantidad de iones molibdato, siendo estos mejores agentes reductores.

La reacción se lleva a cabo a pH 10, con el fin de generar un ion fenolato que reduce al “reactivo de FC” (Figura N°41) y genera un complejo de Mo(V) de color azul, del cual se mide la absorbancia a 765 nm.⁽³⁷⁾

Es un método colorimétrico, en el cual se realiza una curva patrón con ácido gálico como estándar.⁽³⁵⁾ Mediante la sustitución de la absorbancia de la muestra en la ecuación de la recta de calibrado (valor de la ordenada “Y”), se despeja “X”, correspondiendo a la concentración de ácido gálico en la muestra.⁽¹⁵⁾

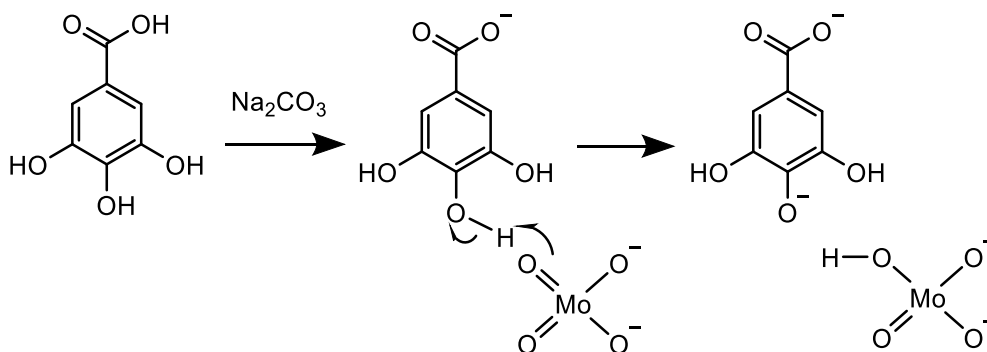


Figura N°41. Reacción entre el ácido gálico y el reactivo de Folin-Ciocalteu.

3.7 ENSAYO DE DPPH

El DPPH se caracteriza por ser un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón de reserva sobre la molécula, de modo que no se dimeriza, además, dicha deslocalización es responsable del color violeta profundo con absorción en solución de etanol a aproximadamente 520 nm.⁽²⁵⁾

La eliminación del radical cromógeno 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), es uno de los ensayos más utilizados para evaluar la actividad antioxidante, está basado

en la transferencia de un solo electrón, con un mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno.⁽⁶¹⁾ El electrón no apareado del nitrógeno en el DPPH se reduce al recibir el átomo de hidrógeno (Figura N°42).

El método consiste básicamente en mezclar el compuesto o extracto prospectivo con una solución del radical DPPH que representa los radicales libres formados en un organismo, con el objetivo de medir la capacidad que posee el extracto de eliminarlo en un periodo de tiempo definido.⁽²⁵⁾

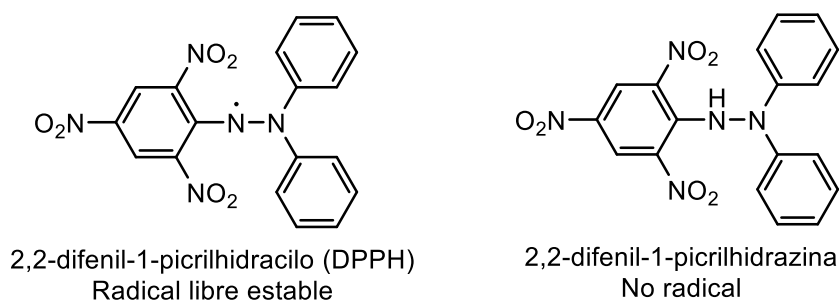


Figura N°42. Forma radical y no radical del DPPH.⁽²⁵⁾

La donación de electrones del antioxidante para neutralizar el radical DPPH, decolora la solución indicando la eficacia antioxidante, que es medida a 517 nm y puede reportarse como EC_{50} (Concentración de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50%), también puede determinarse el TEC_{50} (tiempo necesario para alcanzar el estado estable con EC_{50}).

La eficiencia antirradical (EA) combina ambos parámetros en la ecuación: $EA = (1/EC_{50}) TEC_{50}$. El método es aceptado bajo el supuesto de que la actividad antioxidante es igual a su capacidad de donación de electrones.⁽⁶¹⁾

Una de las ventajas del método es que permite la reacción del DPPH con toda la muestra y el tiempo suficiente permite que reaccione incluso con antioxidantes débiles.

La eficiencia antioxidante se mide a temperatura ambiente para eliminar el riesgo de degradación térmica.

Este radical estable es sensible a algunos tipos de bases y disolventes de Lewis, la interferencia de la absorbancia de los compuestos de la muestra podría ser un problema para el análisis cuantitativo y la absorbancia de DPPH en metanol y acetona disminuye con la luz, el pH, el oxígeno y el tipo de solvente, además de la sustancia antioxidante evaluada.

El método funciona igualmente con metanol o etanol y las cubetas desechables no son atacadas por ellos, además de disminuir los costos. El sistema debe mantenerse en un rango de pH de 5.0 a 6.5.

En el caso de extractos de plantas, los resultados se expresan como equivalentes de DPPH por gramo de material.

Las λ_{\max} registradas van desde 515 nm, 516 nm, 517 nm, 518 nm y 520 nm. Se reportan tiempos de reacción de 5, 10, 30 hasta 120 minutos, pero como la velocidad de reacción varía ampliamente entre los sustratos, lo mejor es seguir la reacción hasta su finalización.⁽²⁵⁾

El Trolox[®] (Figura N°43) es un análogo hidrosoluble del alfa-tocoferol. Posee alta solubilidad en agua y es empleado como estándar en las curvas de comparación de diversos ensayos de actividad antioxidante como CARO (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno), CAET (Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox) y DPPH.⁽²⁴⁾

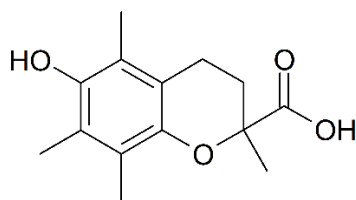


Figura N°43. Estructura del Trolox[®]

CAPÍTULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

IV. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Retrospectivo, ya que se utilizó una muestra de kino del *Eucalyptus citriodora* recolectada en el 2018, almacenada en Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador de la cual se habían reportado análisis fitoquímicos preliminares, actividades antimicrobianas y resultados de Resonancias Magnética Nuclear.

Transversal, por analizar en el 2019 en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, la muestra de kino del *Eucalyptus citriodora* recolectada en el 2018, para determinar la actividad antioxidante y los fenoles totales de las fracciones obtenidas a partir de la fracción diclorometánica seca, por cromatografía en columna.

Experimental, debido a que se trabajó con el kino del *Eucalyptus citriodora* en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador. Se realizó el extracto etanólico del kino de *E. citriodora*, y fue sometido a una partición líquido/líquido con diclorometano, luego la fracción diclorometánica seca fue fraccionada nuevamente mediante cromatografía en columna, para posteriormente cuantificar el contenido de fenoles totales y determinar la actividad antioxidante de las fracciones resultantes.

4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se realizaron consultas en revistas científicas, así como en libros de las siguientes bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

- Central de la Universidad de El Salvador.
- Universidad Alberto Masferrer (USAM).
- Universidad Evangélica de El Salvador (UEES).
- Internet (Journal of Natural Products, Industrial Crops & Products, Journal of Agricultural and Food Chemistry, entre otras).

4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO

Universo: árboles de la flora salvadoreña que producen exudado.

Muestra: kino de *Eucalyptus citriodora*, recolectado en los alrededores de la Facultad de Química y Farmacia en el campus de la Universidad de El Salvador, sede central.

Recolección e identificación de la especie vegetal: se recolectó un espécimen completo y representativo de la especie vegetal que contenía hojas, ramas, flores y frutos, el cual, se presentó en el Herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador para su identificación por el curador del Herbario, siendo el profesional apto para realizar la confirmación de la especie, contribuyendo así a la veracidad de los datos obtenidos. El ejemplar fue debidamente identificado por el profesional experto, quien además asignó un número de voucher para la especie vegetal, que permitirá establecer la trazabilidad si se desea continuar con el estudio. Se registraron los siguientes datos: nombre común, nombre científico, fecha de recolecta, lugar de recolecta, persona que lo recolectó, ubicación por GPS y nombre del botánico responsable de la identificación.

Recolección del kino: se colectó una cantidad aproximada de 250 g, del cual se obtuvieron los siguientes datos: fecha de recolecta, lugar de recolecta, persona que lo recolectó, color y aspecto. Posteriormente, la muestra se trasladó al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, contenida en un recipiente con cierre hermético de capacidad adecuada con protección contra la luz y se almacenó a temperatura ambiente.

4.4 PARTE EXPERIMENTAL DE LABORATORIO

Todo el proceso experimental de laboratorio (Ver Anexo N° 1) se llevó a cabo a una temperatura ambiente de 25°C y en oscuridad, debido a que el entorno fisicoquímico como la luz, el oxígeno y la temperatura afecta los resultados de las pruebas de fenoles totales y la actividad antioxidante.⁽⁸⁾

Materiales, reactivos y equipos utilizados (Ver Anexo N° 2 y N° 3) se encuentran en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

4.4.1 Obtención del extracto etanólico del kino de *Eucalyptus citriodora*.

1. Pulverizar la muestra de kino de *Eucalyptus citriodora* con mortero y pistilo.
2. Pesar 10 g del kino pulverizado y extraer con 100 mL de etanol al 70% en un ultrasonicador a 25°C (potencia 100, frecuencia 37 Hz, durante 90 minutos).
3. Almacenar en refrigeración el extracto etanólico dentro de un Erlenmeyer a 10°C por 24h.
4. Filtrar el extracto etanólico en frío con papel Whatman® número 91.

4.4.2 Obtención de la fracción diclorometánica del kino de *Eucalyptus citriodora* por partición líquido/líquido.⁽²⁾

1. Colocar el extracto etanólico en una ampolla de separación limpia y seca, y llevar a cabo un fraccionamiento con 40 mL de diclorometano.
2. Recibir la fracción diclorometánica en un balón de 250 mL de capacidad, previamente tarado.
3. Realizar al extracto etanólico dos fraccionamientos más con 40 mL de diclorometano.
4. Reunir las tres fracciones diclorometánicas en el balón tarado de 250 mL de capacidad.

5. Llevar a sequedad la fracción diclorometánica en el evaporador rotatorio.
6. Reportar el peso seco y el porcentaje de rendimiento de la fracción diclorometánica.

4.4.3 Fraccionamiento mediante cromatografía en columna.^(2; 21)

4.4.3.1 Preparación de la columna cromatográfica a media presión (Cromatografía Flash).

1. Seleccionar una columna cromatográfica de vidrio de un diámetro adecuado para 2 g de fracción diclorometánica seca.
2. Colocar verticalmente la columna cromatográfica en un soporte metálico.
3. Colocar en el estrechamiento inferior de la columna (si no tiene placa porosa o arena de mar) 1 cm de lana de vidrio en forma de disco, para retener la fase estacionaria sin dificultar el paso del solvente.
4. Añadir aproximadamente 25 mL de solvente (*n*-hexano) a la columna.
5. Hacer una suspensión sobresaturada de adsorbente (gel de sílice) en el solvente (*n*-hexano) en un vaso de precipitados de 400 mL de capacidad.
6. Verter la suspensión dentro de la columna con ayuda de un embudo.
7. Golpear la columna ligeramente con la mano para compactar el gel de sílice sin formar burbujas.
8. Abrir la válvula para que salga el exceso de solvente.
9. Lavar las paredes de la columna con ayuda de una piseta que contenga el mismo solvente (*n*-hexano).
10. Proteger el frente del adsorbente (gel de sílice) añadiendo 1-2 cm de lana de vidrio (frente del solvente y lana de vidrio completamente horizontales).
11. Conectar la columna a un compresor de aire.
12. Asegurar la conexión con una pinza clip.
13. Pasar solvente a través del gel de sílice para compactarlo.

4.4.3.2 Preparación de la muestra para la cromatografía en columna.

1. Disolver 2 g de fracción diclorometánica seca en 10 mL de diclorometano.

2. Añadir 2 g de gel de sílice (proporcional a la muestra).
3. Eliminar el solvente en el evaporador rotatorio.
4. Obtener la mezcla homogénea, pulverulenta y exenta de solvente.
5. Incorporar homogéneamente a la columna con un embudo.

4.4.3.3 Elución de las fracciones en la cromatografía en columna.

1. Añadir con cuidado 500 mL de *n*-hexano por la pared de la columna, para no modificar la horizontalidad del frente del adsorbente.
2. Conectar la columna al compresor de aire.
3. Abrir la válvula dejando que el solvente pase a través de toda la columna.
4. Recolectar la primera porción de solvente que corresponde al volumen muerto de la columna (no contiene ningún producto).
5. Adicionar alícuotas de 500 mL de cada una de las mezclas de solventes (*n*-hexano:acetato de etilo), una después de otra, en el siguiente orden:
 - *n*-hexano:acetato de etilo (90:10) equivalente a 10% de acetato de etilo
 - *n*-hexano:acetato de etilo (70:30) equivalente a 30% de acetato de etilo
 - *n*-hexano:acetato de etilo (50:50) equivalente a 50% de acetato de etilo
 - *n*-hexano:acetato de etilo (30:70) equivalente a 70% de acetato de etilo
 - Acetato de etilo puro equivalente a 100% de acetato de etilo
 - Metanol puro (lavado de columna)
6. Colectar por separado las fracciones en Erlenmeyers de 250 mL de capacidad.
7. Transferir las fracciones a balones de fondo redondo.
8. Concentrar cada fracción en el evaporador rotatorio.
9. Transferir cada fracción a su respectivo vial de vidrio tarado.
10. Cubrir los viales con papel aluminio, identificarlos y colocarlos en la cámara de extracción de gases, hasta que no haya solvente y su peso sea constante.
11. Registrar los pesos y el porcentaje de rendimiento.

4.4.4 Cuantificación de fenoles totales de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna a partir de la fracción diclorometánica por el método de Folin-Ciocalteu.⁽³¹⁾

4.4.4.1 Preparación de solución madre y línea de calibración con el estándar ácido gálico.

1. Pesar en balanza analítica en un vial de vidrio limpio, 2 mg de ácido gálico.
2. Agregar 10.0 mL de agua bidestilada con pipeta volumétrica de 10.0 mL (Solución madre, 0.2 mg/mL).
3. Preparar la línea de calibración a partir de la solución anterior, en orden creciente de concentraciones de ácido gálico: 6.25 µg/mL, 12.50 µg/mL, 25.00 µg/mL, 50.00 µg/mL, 75.00 µg/mL, 100.00 µg/mL (Ver Anexo N°4).

4.4.4.2 Preparación de soluciones de trabajo.

Procedimiento para preparar una sola solución de trabajo. Deben prepararse tres soluciones de trabajo por cada fracción obtenida en la cromatografía en columna (Ver Anexo N° 1).

1. Pesar dentro de un vial de vidrio, en una balanza analítica, exactamente 2.00 mg de la fracción seca que se desee analizar.
2. Adicionar con pipeta volumétrica 10.0 mL de agua bidestilada.
3. Sonicar la solución a 25 °C (potencia 100, frecuencia 37 Hz), durante 30 minutos para acelerar la disolución, esta solución de trabajo tiene una concentración de 0.2 mg/mL.

4.4.4.3 Preparación del blanco.

1. Agregar con micropipeta a una cubeta descartable para UV-Vis los siguientes reactivos:
 - 480 µL de agua bidestilada

- 40 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu 2N
- 480 μ L de solución de carbonato de sodio al 10.75% m/v

4.4.4.4 Cuantificación de fenoles totales

Procedimiento para preparar una sola cubeta UV-Vis con estándar (6.25 μ g/mL de ácido gálico), repetir el procedimiento para cada estándar y preparar para cada solución de trabajo 3 cubetas UV-Vis (Ver Anexo N° 1).

1. Agregar con micropipeta 80 μ L del estándar (6.25 μ g/mL de ácido gálico) a una cubeta UV-Vis. Si no se está preparando una cubeta para algún estándar, sustituir por 80 μ L de solución de trabajo que se desee analizar.
2. Agregar con micropipeta 400 μ L de agua bidestilada a la cubeta UV-Vis.
3. Agregar con micropipeta 40 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu 2N a la cubeta UV-Vis.
4. Agregar con micropipeta 480 μ L de una solución de carbonato de sodio al 10.75% m/v a la cubeta UV-Vis.
5. Preparar todos los estándares y las repeticiones de cada solución de trabajo (Ver Anexo N° 1).
6. Incubar todas las cubetas a temperatura ambiente y en oscuridad, durante 30 minutos.
7. Observar el color de las soluciones, a mayor coloración azul mayor cantidad de fenoles totales.
8. Leer la absorbancia de todas las cubetas en un espectrofotómetro UV-Vis a 720 nm.

Nota:

- Los datos de concentración se obtienen como μ g equivalentes de ácido gálico/mL de solución de trabajo y deben reportarse como mg equivalentes a ácido gálico/g fracción seca.⁽³⁶⁾
- Si los pesos no son exactamente los indicados, ajustar con micropipeta el volumen de solvente necesario para lograr la concentración que se indique.

4.4.5 Cuantificación de la actividad antioxidante de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna a partir de la fracción diclorometánica por el método del DPPH.⁽³¹⁾

4.4.5.1 Preparación de la línea de calibración con el estándar Trolox®

1. Pesar en balanza analítica 5.0 mg del estándar Trolox® (250.24 g/mol) dentro de un vaso de precipitados de 50 mL de capacidad, limpio y seco.
2. Añadir 40.0 mL de agua bidestilada con pipeta volumétrica (500 µM de Trolox®).
3. Preparar los estándares a partir de la solución anterior a las concentraciones de 250 µM, 100.00 µM, 50.00 µM, 25.00 µM, 12.50 µM y 6.25 µM de Trolox® (Ver Anexo N° 5).

4.4.5.2 Preparación de soluciones de trabajo

Procedimiento para preparar una sola solución de trabajo. Deben prepararse tres soluciones de trabajo por cada fracción obtenida en la cromatografía en columna (Ver Anexo N° 1).

1. Pesar dentro de un vial de vidrio, en una balanza analítica, exactamente 2.00 mg de la fracción seca que se desee analizar.
2. Adicionar con pipeta volumétrica 10.0 mL de agua bidestilada.
3. Sonicar la solución a 25 °C (potencia 100, frecuencia 37 Hz), durante 30 minutos para acelerar la disolución, esta solución de trabajo tiene una concentración de 0.2 mg/mL.

4.4.5.3 Preparación del blanco

1. Agregar con micropipeta a un tubo de microcentrífuga los siguientes reactivos:
 - 1,470.4 µL de etanol absoluto
 - 29.6 µL de metanol

2. Agregar con micropipeta 950 μL de la solución anterior (mezcla de alcoholes) a una cubeta descartable para espectrofotómetro UV-Vis.
3. Agregar con micropipeta 50 μL de agua bidestilada a la cubeta que contiene la mezcla de alcoholes.

4.4.5.4. Preparación del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).

1. Pesar en balanza analítica 5.0 mg de DPPH en un vial de vidrio limpio y seco.
2. Adicionar con pipeta volumétrica 5 mL de metanol.
3. Sonicar la solución a 25 °C (potencia 100, frecuencia 37 Hz), durante 3 minutos para acelerar la disolución del DPPH.
4. Tomar una alícuota adecuada para preparar una solución que contenga 50 μM de DPPH, diluyendo con etanol absoluto.

Nota:

- La solución al 50 μM de DPPH se prepara según la cantidad de muestras a analizar, tomando en cuenta los 7 estándares y el blanco.

4.4.5.5. Determinación de la actividad antioxidante.

Procedimiento para preparar una sola cubeta UV-Vis con estándar (6.25 μM de Trolox®), repetir el procedimiento para cada estándar y preparar para cada solución de trabajo 3 cubetas UV-Vis (Ver Anexo N° 1).

1. Agregar con micropipeta 50 μL de estándar al 6.25 μM de Trolox® en una cubeta UV-Vis. Si no se está preparando una cubeta para algún estándar, sustituir por 50 μL de la solución de trabajo que se desee analizar.
2. Agregar con micropipeta 950 μL de la solución al 50 μM de DPPH en la cubeta UV-Vis.
3. Preparar todos los estándares y las repeticiones de cada solución de trabajo (Anexo N° 1).

4. Incubar todas las cubetas a temperatura ambiente y en oscuridad, durante 30 minutos.
5. Observar el color de las soluciones, a mayor decoloración del violeta del DPPH a un color amarillo, mayor actividad antioxidante.
6. Leer las absorbancias de todas las cubetas en un espectrofotómetro UV-Vis a 515 nm.

Notas:

- La actividad antioxidante se expresa en μM equivalentes de Trolox.⁽²⁵⁾
- Si los pesos no son exactamente los indicados, ajustar con micropipeta el volumen de solvente necesario para lograr la concentración que se indique.

4.4.6. Lectura en Espectrofotómetro UV-Vis

1. Encender el Espectrofotómetro UV-Vis mínimo 30 minutos antes de utilizarlo.
2. Programar la longitud de onda según la determinación a realizar.
3. Ingresar las unidades y las concentraciones de las soluciones estándar.
4. Tomar las cubetas del lado que no estará en contacto con el haz de luz.
5. Colocar el blanco y las soluciones estándar dentro de las celdas correspondientes en el equipo, de manera que la parte transparente y lisa quede en posición para que el haz de luz la atraviese.
6. Leer la absorbancia del blanco seleccionando "Auto Zero" desde el programa.
7. Leer las absorbancias de los estándares.
8. Guardar los datos de las absorbancias del blanco y los estándares.
9. Sacar las cubetas que contienen soluciones estándares, pero no la que contiene el blanco.
10. Ingresar al equipo las cubetas de las muestras y asignarles su respectivo código en el programa.
11. Medir las absorbancias de las muestras (Folin-Ciocalteu: 720nm, DPPH: 515 nm).

4.5 PROCESAMIENTO DE DATOS.⁽²⁰⁾

La cuantificación de fenoles totales y la actividad antioxidante en las soluciones de trabajo, se tabula en una hoja de cálculo, que se conforma por promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (límite máximo de 10%) con ayuda de Microsoft Excel 2016, esto permite extrapolar los datos a 1.00 g de la fracción diclorometánica seca correspondiente, además de generar las gráficas adecuadas para representar de manera más resumida y concisa los resultados.

4.5.1 Análisis estadístico

Una vez cuantificado el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante en cada una de las fracciones, se procede a evaluar si existe diferencia estadísticamente significativa en el contenido de fenoles totales y también si el poder antioxidante varía de una a otra fracción.

De acuerdo a los resultados estadísticos se establece la relación entre los polifenoles y el poder antioxidante presentes en el kino.

Para dicho análisis se utiliza el programa Statgraphics, con el cual se realizan dos pruebas: (1) el análisis de varianza (ANOVA) que proporciona los valores F y P, y (2) la prueba de múltiples rangos, que identifica medias aritméticas estadísticamente distintas.

En el análisis de varianza (ANOVA), para poder evaluar la dispersión entre los resultados, la diferencia entre datos se determina por la prueba F, en la que, si el valor P es menor que 0.05, significa que hay diferencia estadísticamente significativa entre cada una de las fracciones obtenidas a partir de la cromatografía en columna.

Si existe esta diferencia, se utiliza el método de múltiples rangos, que permite evaluar cuáles medias aritméticas son las que proporcionan la diferencia entre dichos resultados y cuáles grupos son estadísticamente homogéneos.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Identificar la especie vegetal y recolectar el kino proveniente de *Eucalyptus citriodora*.

Se recolectó una muestra completa y representativa de la especie vegetal, dicha muestra contenía suficientes hojas para permitir observar la disposición y ramificación, además de tener flores y frutos. El lugar de recolección fue en los alrededores de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador en la sede central.

El ejemplar de la especie vegetal fue llevado al Herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador para su identificación por el profesional experto, Licda. Jenny Menjívar, quien proporcionó una constancia de identificación (Ver Anexo N° 6). Además, se obtuvieron los siguientes datos:

- Nombre común: "Eucalipto"
- Nombre científico: *Eucalyptus citriodora*
- Sinónimo: *Corymbia citriodora*
- Fecha de recolecta: 20 de enero de 2019
- Lugar de recolecta: Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador (sede central)
- Personas que recolectaron: Licda. Jenny Menjívar, Dr. Marvin J. Núñez, Lic. Ulises Castillo.
- Coordenadas de ubicación: Latitud 13°43'4.71" N; Longitud 89°12'2.41" E
- Nombre del botánico responsable de la identificación: Licda. Jenny Menjívar
- Número de voucher: J. Menjívar et. al. 5022

El kino perteneciente al árbol de "Eucalipto" identificado botánicamente, se colectó de la corteza (Ver Figura N° 44), este había sido exudado de manera natural, formado por un proceso que utiliza el árbol para su sanación por el crecimiento secundario del mismo. Se registraron los siguientes datos del kino:

- Fecha de recolecta: agosto 2018
- Lugar de recolecta: Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador (sede central).
- Persona que recolectó: Dr. Marvin J. Núñez
- Color: café
- Olor: *sui generis*
- Aspecto: sólido de apariencia cristalina, de superficie lisa y brillante.

Luego fue introducido en un recipiente de plástico no transparente y con tapa, para ser trasladado al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, donde se mantuvo en la oscuridad y a temperatura ambiente.



Figura N°44. Kino de *Eucalyptus citriodora* antes de ser recolectado, secretado debido al crecimiento secundario del árbol. *Propiedad del LIPN.*

La recolección de cualquier especie vegetal debe ir acompañada del registro de los datos que le corresponden, esto ayuda a respaldar la investigación y a mantener ubicada e identificada la especie, permitiendo la trazabilidad en estudios posteriores gracias al número de voucher asignado por el botánico profesional, dicho profesional debe estar involucrado en la recolección para asegurar que el estudio y los resultados sean verídicos al atribuir alguna propiedad a una especie vegetal en específico. Es importante preparar

adecuadamente los órganos de la especie vegetal, verificar su conservación y colocación en el herbario para disponer de un material de referencia que sirva para futuras investigaciones.

Las precauciones como la protección de la luz, disminuir el contacto con el aire y mantener a temperatura ambiente durante la recolección, traslado y almacenamiento del kino, son de suma importancia para que continúe en buen estado y se evite la degradación de los compuestos polifenólicos por estos factores.⁽⁸⁾

5.2 Preparar el extracto etanólico a partir del kino de *Eucalyptus citriodora*.

Se seleccionaron partes del kino cristalizado, que no contuvieran restos de corteza u otro material diferente (Ver Figura N° 45); luego la muestra fue colocada en un micromolino, para disminuir y homogenizar el tamaño de partícula, convirtiendo el kino en un polvo fino de color café.



Figura N°45. Apariencia del kino de *Eucalyptus citriodora* cristalizado. *Propiedad del LIPN.*

Se pesaron 10 g del polvo fino del kino, disolviéndolos con etanol al 70% en una proporción de sólido/solvente de 1:10, ultrasonizando durante 90 minutos a 25°C, con lo cual se logró la disolución completa, obteniendo una solución homogénea de color ámbar que fue colocada durante 24 horas en el refrigerador a 10°C y posteriormente, fue filtrada y transferida a una ampolla de separación de 250 mL

de capacidad para realizar la partición líquido/líquido con diclorometano; se le realizaron 3 separaciones, cada una con 40 mL de diclorometano, siendo recibidas en un balón de fondo redondo de 250 mL de capacidad, previamente tarado (Ver Figura N°46).

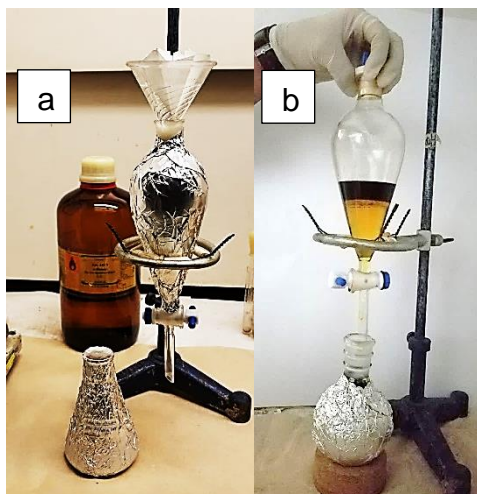


Figura N°46. (a) montaje del equipo para la obtención de la fracción diclorometánica, (b) apariencia de la fracción diclorometánica (inferior) y del extracto etanólico (superior) durante el fraccionamiento. *Propiedad del LIPN.*

La fracción diclorometánica seca se obtuvo por medio del evaporador rotatorio, que eliminó el solvente en su mayoría, la fracción se mantuvo en una cámara de extracción de gases durante 48 horas hasta lograr peso constante y poder calcular el porcentaje de rendimiento. El peso seco de la fracción diclorometánica fue de 3.1111 g, siendo el porcentaje de rendimiento de 31.11% respecto a los 10.0 gramos de kino pesados inicialmente.

Se seleccionaron solo cristales formados por el kino, evitando que el análisis fuese afectado por metabolitos secundarios provenientes de otra matriz vegetal, como la corteza, que podrían influir en las cuantificaciones en Folin-Ciocalteu o en la prueba del DPPH. El etanol es un solvente adecuado para disolver el kino y obtener los compuestos polifenólicos que fueron de interés para la investigación, ya que su polaridad es alta y posee baja viscosidad. La disminución

del tamaño de partícula permite al solvente tener mayor área de contacto con el sólido y aumentar la cantidad de masa transferida, el ultrasonicador aumenta la energía cinética de las partículas logrando un incremento de las vibraciones y de la separación entre ellas, todo lo anterior conlleva a un aumento de la rapidez de disolución.

La temperatura también aumenta la rapidez de disolución y la cantidad disuelta, pero en este caso, la disolución de metabolitos polifenólicos debe mantenerse a 25°C para evitar la degradación térmica.⁽⁵⁵⁾ La proporción 1:10 fue seleccionada para lograr una buena disolución sin saturar el solvente⁽⁴⁶⁾, ya que de suceder esto, habría sólido que no se disolvería y por ende metabolitos que no serían disueltos; dicha proporción permitió que toda la muestra de kino se disolviera por completo. Se realizaron 3 separaciones con diclorometano para garantizar la extracción de los compuestos polifenólicos afines y lograr el mayor rendimiento posible.

El porcentaje de rendimiento indica que a pesar de que no es despreciable la cantidad de metabolitos obtenidos por la separación con el solvente diclorometano, queda la mayoría del peso del kino en el extracto etanólico, esto debido a las estructuras con grupos hidroxilos que les dan a los polifenoles afinidad por solventes polares, formando fácilmente enlaces por puentes de hidrógeno.

5.3 Obtener las fracciones de la columna cromatográfica a partir de la fracción diclorometánica seca del kino del *Eucalyptus citriodora*.

A partir de la fracción diclorometánica, se tomaron 2.0 g para la elaboración de la cabeza de la cromatografía en columna, se adicionaron 10 mL de diclorometano y 2.0 g de gel de sílice para generar una mezcla homogénea que fue sometida a la evaporación del solvente mediante el evaporador rotatorio. Al obtener la mezcla pulverulenta se incorporó en la parte superior de la columna

cromatográfica dejando una capa de grosor homogéneo, que poseía un color café (Ver Figura N°47).



Figura N°47. Preparación de la columna cromatográfica. *Propiedad del LIPN.*

Las fracciones fueron colectadas en Erlenmeyers de 250 mL de capacidad y luego transferidas a balones de vidrio tarados de 250 mL de capacidad (Ver Figura N° 48), para eliminar la mayoría del solvente en el evaporador rotatorio, luego que la cantidad de solvente fuera mínima, se transfirió cada fracción a su vial de vidrio tarado correspondiente (Ver Figura N° 49), se protegieron de la luz con papel aluminio y se dejaron en una cámara de extracción de gases hasta lograr el peso constante en 9 días de monitoreo.



Figura N°48. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna en orden creciente de polaridad de izquierda a derecha. *Propiedad del LIPN.*

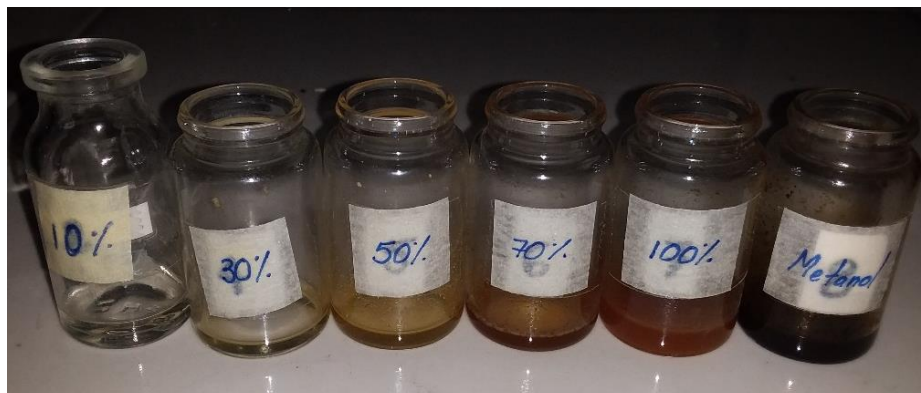


Figura N°49. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna. *Propiedad del LIPN.*

La elución con *n*-hexano:AcOEt dio como resultado 6 fracciones correspondientes a las fracciones del 10%, 30%, 50%, 70%, 100% respecto al acetato de etilo y una fracción más correspondiente a la fracción metanólica, los resultados se muestran en el Cuadro N°4 y la Figura N°50.

Cuadro N°4. Resultados del fraccionamiento por cromatografía en columna de la fracción diclorometánica.

Fracción	Polaridad	Peso seco (g)	%Rendimiento
10% AcOEt	baja	0.0289	1.45%
30% AcOEt	baja	0.0353	1.76%
50% AcOEt	intermedia	0.1220	6.10%
70% AcOEt	alta	0.3066	15.33%
100% AcOEt	alta	0.4138	20.69%
Metanol	alta	0.6033	30.17%

La fracción diclorometánica fue fraccionada una vez más, pero por cromatografía de columna, por ser adecuada para la separación de los metabolitos secundarios aprovechando su polaridad.

El gel de sílice es una fase estacionaria muy polar, por lo que los metabolitos secundarios no polares eluyen fácilmente con una fase móvil no polar, mientras que los polares necesitan una fase móvil de alta polaridad para eluir. Es decir, comenzar la elución con la mezcla compuesta por *n*-hexano:AcOEt 10%

(90%:10% respectivamente) hizo posible la separación y obtención de los metabolitos secundarios menos polares y a medida que la proporción de acetato de etilo fue aumentando hasta llegar a metanol, se incrementó la polaridad de la fase móvil permitiendo obtener metabolitos cada vez más polares.

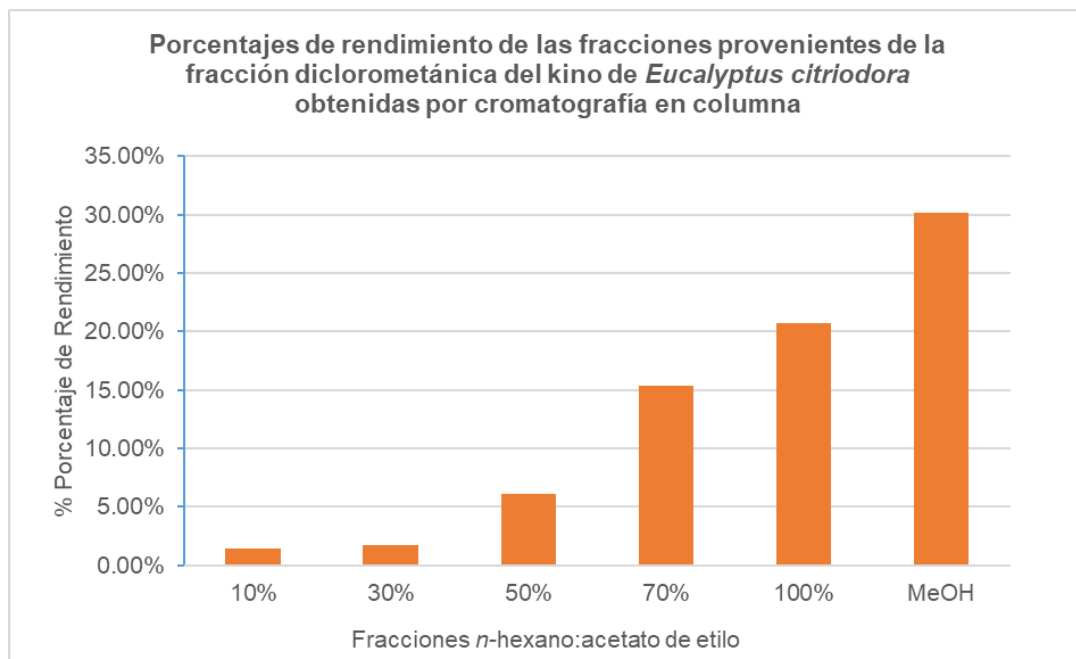


Figura N°50. Porcentajes de rendimiento de las fracciones provenientes de la fracción diclorometánica del kino de *Eucalyptus citriodora* obtenidas por cromatografía en columna.

El resultado fueron 6 fracciones con metabolitos secundarios de polaridad baja, intermedia y alta, al existir esta diferencia de polaridad, pudo identificarse que en la fracción diclorometánica existen mayor cantidad de compuestos polares, debido a que la fracción metanólica (más polar) obtuvo un porcentaje de rendimiento de 30.17% m/m en comparación a la fracción *n*-hexano:AcOEt 10% (menos polar) que obtuvo un rendimiento de 1.45% m/m.

Los resultados de rendimiento obtenidos concuerdan con la polaridad de los compuestos polifenólicos, ya que, al ser metabolitos polares, estos fueron más retenidos por el gel de sílice y necesitaron el solvente más polar para poder eluir.

5.4 Cuantificar los fenoles totales y la capacidad antioxidante de cada una de las fracciones obtenidas en la cromatografía en columna.

5.4.1 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

La curva de calibración se preparó con ácido gálico (AG) como estándar, partiendo de una solución madre de 0.20 mg AG/mL. Se prepararon las soluciones estándar a una concentración de 100.00 µg/mL, 75.00 µg/mL, 50.00 µg/mL, 25.00 µg/mL, 12.50 µg/mL y 6.25 µg/mL (Ver Anexo N°4). Para la lectura en el Espectrofotómetro UV-Vis se preparó para cada estándar 1 cubeta UV-Vis.

Cada muestra fue codificada con las iniciales del nombre científico del “Eucalipto”, seguido del porcentaje correspondiente a la fracción analizada (10%, 30%, 50%, 70%, 100%, MeOH), luego la solución de trabajo (A, B o C) y, por último, el número de repetición (1, 2 o 3), por ejemplo, EC50%A1 correspondería a la fracción *n*-hexano:AcOEt 50%, solución de trabajo A y repetición 1.

Por cada fracción obtenida en la cromatografía en columna, se prepararon 3 soluciones de trabajo y a cada una de estas le correspondieron 3 cubetas UV-Vis que contaron como repeticiones (Ver Figura N° 51 y Anexo N° 1).

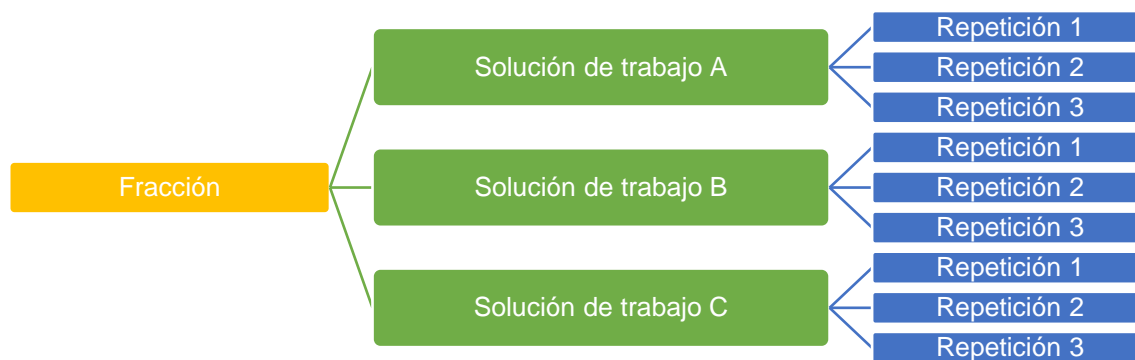


Figura N°51. Esquema de soluciones de trabajo y cubetas correspondientes a una fracción “X” obtenida en la cromatografía de columna.

Las cubetas UV-Vis al momento de hacer la lectura en el espectrofotómetro UV-Vis contenían: 400 µL de agua bidestilada, 80 µL de estándar, solución de trabajo

o agua en el caso del blanco, 40 μL del reactivo Folin-Ciocalteu 2 N y 480 μL de solución de carbonato de sodio al 10.75% m/v. El tiempo de reacción fue de 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (25°C), después de esto se midieron las absorbancias de cada cubeta en el espectrofotómetro UV-Vis, comenzando con los estándares.

Cada día que se realizó la cuantificación de fenoles totales se elaboró una curva de calibración con el mismo número de estándares a las concentraciones establecidas.

Al terminar la cuantificación de todas las fracciones, se promediaron las absorbancias de cada estándar en las diferentes curvas (Ver Tabla N°1) y se omitieron las lecturas que no respetaban la tendencia para un mismo estándar, para ello se utilizó el coeficiente de variación como parámetro, debiendo ser menor al 10% para aceptar el valor de absorbancia. El resultado fue una curva de calibración promedio de la cual se obtuvo la ecuación de la línea recta (Ver Figura N°52).

Tabla N°1. Lecturas de absorbancia, promedios, desviación estándar y coeficiente de variación de los estándares en la prueba de Folin-Ciocalteu.

Estándar ($\mu\text{g/mL}$)	Curvas de calibración						Promedio	S	CV
	1	2	3	4	5	6			
6.25	0.054	0.046	0.056	0.047	0.053	0.052	0.054	0.00	3.18%
12.50	0.106	0.115	0.100	0.093	0.161	0.102	0.106	0.01	6.29%
25.00	0.200	0.206	0.236	0.197	0.200	0.206	0.203	0.00	1.71%
50.00	0.399	0.410	0.475	0.394	0.416	0.409	0.406	0.01	2.20%
75.00	0.607	0.786	0.713	0.600	0.622	0.630	0.610	0.01	1.84%
100.00	0.798	0.785	0.933	0.782	0.793	0.819	0.795	0.01	1.84%

Los valores omitidos se muestran en color gris en la Tabla N° 1, estos se descartaron por no mantener la tendencia de las lecturas para su estándar correspondiente y consecuentemente aumentar el coeficiente de variación.

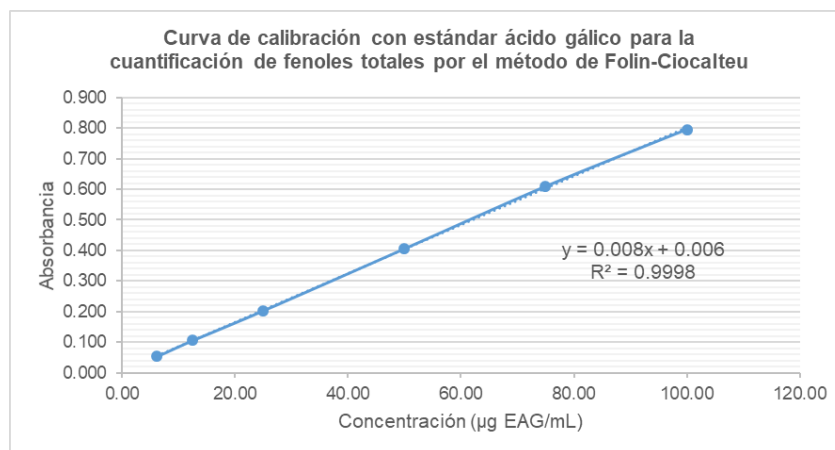


Figura N°52. Curva de calibración promedio para la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Para las repeticiones de cada solución de trabajo (Ver Figura N°51 y Anexo N°1) se realizó un proceso similar, para aceptar los resultados de absorbancia se calculó el coeficiente de variación, debiendo ser menor al 10% (Ver Anexo N° 7), a manera de ejemplo se muestran en la Tabla N° 2 los datos correspondientes a la fracción *n*-hexano:AcOEt 50%. Para realizar los cálculos de promedios, desviaciones estándar y coeficientes de variación, se utilizó el programa Microsoft Excel 2016.

Tabla N°2. Resultado del coeficiente de variación de las absorbancias de cada solución de trabajo correspondiente a la fracción *n*-hexano:AcOEt 50% en la prueba de Folin-Ciocalteu.

Fracción	ST	Repetición	A	Promedio A	S	%CV
50%	A	1	0.253	0.255	0.012	4.55%
		2	0.244			
		3	0.267			
	B	1	0.249	0.245	0.005	1.84%
		2	0.245			
		3	0.240			
	C	1	0.249	0.252	0.006	2.24%
		2	0.258			
		3	0.248			

ST: solución de trabajo, A: absorbancia, S: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

Cada absorbancia de las soluciones de trabajo fue ingresada en la ecuación de la curva promedio, despejando “x” para encontrar la concentración en μg equivalentes a ácido gálico (EAG) por mL, para luego encontrar los mg EAG en el peso seco de la fracción y por último calcular la cantidad de mg EAG en un gramo de fracción seca.

El resultado por cada fracción obtenida en la cromatografía en columna es el promedio de la concentración de las 3 soluciones de trabajo (Ver Anexo N° 8). Los resultados finales se expresan como mg EAG/g de fracción seca \pm desviación estándar (Ver Tabla N°3).

Tabla N°3. Resultados de la cuantificación de fenoles totales de cada una de las fracciones obtenidas por cromatografía de columna a partir de la fracción diclorometánica.

Fracción	Promedio mg EAG/g fs \pm S
10%	1.08 \pm 0.84
30%	61.01 \pm 5.45
50%	153.57 \pm 3.97
70%	227.92 \pm 10.58
100%	768.03 \pm 6.20
MeOH	856.03 \pm 11.19

EAG: equivalentes a ácido gálico, fs: fracción seca, S: desviación estándar.

A continuación, un ejemplo de los cálculos con la fracción *n*-hexano:AcOEt 50%, solución de trabajo A (ST A), repetición 1, cuyos detalles se muestran en color gris en la Tabla N° 7.

El cálculo de los μg EAG/mL se realiza despejando “x” de la fórmula de la curva promedio $y = 0.008x + 0.006$, la variable “y” es sustituida por la absorbancia de la cubeta correspondiente.

$$x = \frac{y - 0.006}{0.008} = \mu\text{g EAG/mL EC50\%A1} = \frac{0.253 - 0.006}{0.008} = 31.06 \mu\text{g EAG/mL}$$

Posteriormente, se calculan los mg EAG en el peso de la fracción seca (fs), en este caso la fracción *n*-hexano:AcOEt 50% pesó 122.00 mg.

$$EC50\%A1 = \frac{31.06 \mu\text{g EAG}}{\text{mL ST A}} \times \frac{1 \text{ mg EAG}}{1000 \mu\text{g EAG}} \times \frac{10.70 \text{ mL ST A}}{2.14 \text{ mg fs}} \times 122.00 \text{ mg fs}$$

$$ECMet11 = 18.95 \text{ mg EAG/fs}$$

Los resultados deben presentarse por gramo de fracción seca, por lo que se realizó el siguiente cálculo:

$$EC50\%A1 = 1 \text{ g fs} \times \frac{18.95 \text{ mg EAG}}{0.122 \text{ g fs}} = 155.31 \text{ mg EAG/g fs}$$

Los resultados de la cuantificación de cada una de las 3 repeticiones se promedian, obteniendo el valor por solución de trabajo. Los resultados de las 3 soluciones de trabajo son promediados para obtener el valor por fracción correspondiente (Ver Anexo N°8 y Figura N°53).

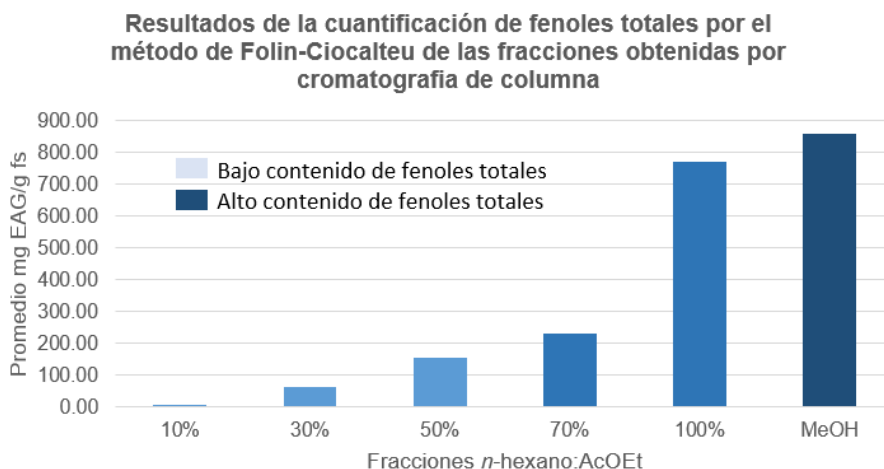


Figura N°53. Resultados de la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu de las fracciones obtenidas por cromatografía de columna a partir de la fracción diclorometánica. El color azul se intensifica a medida aumenta la cantidad de fenoles totales.

5.4.2 Cuantificación de la actividad antioxidante por el método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).

La curva de calibración se preparó con Trolox® como estándar, partiendo de una solución madre de 500.00 μM se prepararon las soluciones estándar al 250.00 μM y 100.00 μM de Trolox®. A partir de la solución al 100.00 μM se hicieron por cascada de dilución las soluciones estándar al 50.00 μM , 25.00 μM , 12.50 μM y

6.25 μM de Trolox®, la solución estándar al 0.00 μM contiene agua en lugar de estándar (Ver Anexo N°5). Para la lectura en el Espectrofotómetro UV-Vis se preparó para cada estándar 1 cubeta UV-Vis. Por cada fracción obtenida en la cromatografía en columna, se prepararon 3 soluciones de trabajo y a cada una de estas le correspondieron 3 cubetas UV-Vis que contaron como repeticiones (Ver Figura N°51 y Anexo N°1).

Las cubetas UV-Vis al momento de hacer la lectura en el espectrofotómetro UV-Vis contenían: 50 μL de estándar, solución de trabajo o agua bidestilada en el caso del estándar 0.00 μM de Trolox® y 950 μL de la solución de DPPH. El blanco contenía 50 μL de agua bidestilada y 950 μL de mezcla de alcoholes. La mezcla de alcoholes contenía 1,470.4 μL de etanol absoluto y 29.6 μL de metanol.

La codificación de muestras fue igual que en Folin-Ciocalteu, así como el tiempo de reacción de 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (25°C). Luego se midieron las absorbancias de cada cubeta en el espectrofotómetro UV-Vis, comenzando con los estándares. Cada día que se realizó la cuantificación de la actividad antioxidante se elaboró una curva de calibración con el mismo número de estándares a las concentraciones establecidas.

Tabla N°4. Lecturas de absorbancia, promedios, desviación estándar y coeficiente de variación de los estándares en la prueba del DPPH.

Estándar μM Trolox®	Curvas de calibración						Promedio	S	CV
	1	2	3	4	5	6			
0.00	0.570	0.566	0.533	0.512	0.561	0.525	0.551	0.02	3.73%
6.25	0.566	0.563	0.528	0.514	0.543	0.519	0.544	0.02	3.82%
12.50	0.561	0.552	0.522	0.511	0.542	0.517	0.539	0.02	3.52%
25.00	0.550	0.543	0.511	0.500	0.523	0.504	0.522	0.02	3.98%
50.00	0.523	0.518	0.486	0.463	0.522	0.482	0.494	0.03	5.09%
100.00	0.465	0.460	0.431	0.415	0.432	0.436	0.440	0.02	4.33%
250.00	0.299	0.282	0.254	0.239	0.253	0.278	0.273	0.02	7.19%

Al terminar la cuantificación de todas las fracciones, se promediaron las absorbancias de cada estándar en las diferentes curvas (Ver Tabla N° 4) y se

omitieron las lecturas que no respetaban la tendencia para un mismo estándar, para ello se utilizó el coeficiente de variación como parámetro, debiendo ser menor al 10% para aceptar el valor de absorbancia.

El resultado fue una curva de calibración promedio de la cual se obtuvo la ecuación de la línea recta (Ver Figura N° 54). Los valores omitidos se muestran en color gris en la Tabla N° 4, estos se descartaron por no mantener la tendencia de las lecturas para su estándar correspondiente y consecuentemente aumentar el coeficiente de variación.

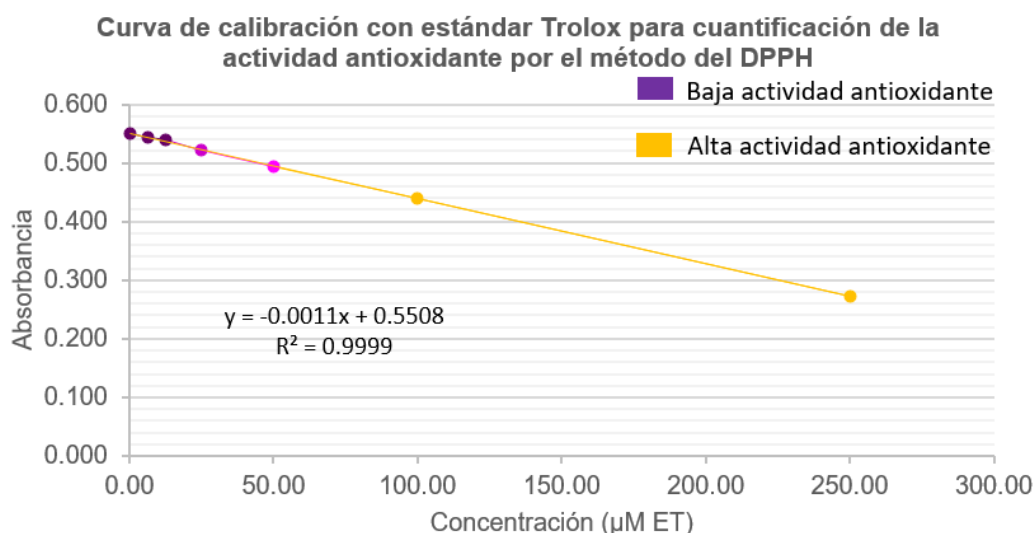


Figura N°54. Curva de calibración promedio para la cuantificación de la actividad antioxidante por el método del DPPH. Conforme la actividad antioxidante aumenta, el DPPH que inicialmente es violeta intenso, se decolora a amarillo.

Para las repeticiones de cada solución de trabajo (Ver Figura N°51 y Anexo N°1) se realizó un proceso similar, para aceptar los resultados de absorbancia se calculó el coeficiente de variación, debiendo ser menor al 10% (Ver Anexo N°9), a manera de ejemplo se muestran en la Tabla N° 5 los datos correspondientes a la fracción *n*-hexano:AcOEt 50%. Para realizar los cálculos de promedios, desviaciones estándar y coeficientes de variación, se utilizó el programa Microsoft Excel 2016.

Tabla N°5. Resultado del coeficiente de variación de las absorbancias de cada solución de trabajo correspondiente a la fracción *n*-hexano:AcOEt 50% en la prueba del DPPH.

Fracción	ST	Cubeta	A	Promedio A	S	%CV
50%	A	1	0.465	0.466	0.002	0.50%
		2	0.469			
		3	0.465			
	B	1	0.466	0.465	0.001	0.25%
		2	0.464			
		3	0.466			
	C	1	0.467	0.466	0.001	0.22%
		2	0.466			
		3	0.465			

Cada absorbancia de las soluciones de trabajo fue ingresada en la ecuación de la curva promedio, despejando "x" para encontrar la concentración en μM equivalentes a Trolox (ET); para luego encontrar los mmoles ET en el peso seco de la fracción y por último calcular la cantidad de mmoles ET en un gramo de fracción seca.

El resultado por cada fracción obtenida en la cromatografía de columna es el promedio de la concentración de las 3 soluciones de trabajo (Ver Anexo N°10). Los resultados finales se expresan como mmoles ET/g de fracción seca \pm desviación estándar (Ver Tabla N°6).

Tabla N°6. Resultados de cuantificación de la actividad antioxidante de cada una de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna a partir de la fracción diclorometánica.

Fracción	Promedio mmoles ET/g fs \pm S
10%	0.00 \pm 0.00
30%	0.00 \pm 0.00
50%	0.38 \pm 0.00
70%	1.23 \pm 0.04
100%	1.90 \pm 0.15
MeOH	2.48 \pm 0.12

ET: equivalentes a Trolox, fs: fracción seca, S: desviación estándar.

A continuación, un ejemplo de los cálculos con la fracción *n*-hexano:AcOEt 50%, solución de trabajo A (ST A), repetición 1, cuyos detalles se muestran en color gris en la Tabla N°8.

El cálculo de los $\mu\text{M ET}$ se realiza despejando “x” de la fórmula de la curva promedio $y = -0.0011x + 0.5508$, la variable “y” es sustituida por la absorbancia de la cubeta correspondiente.

$$x = \frac{y - 0.5508}{-0.0011} = \mu\text{M ET} \quad \text{EC50\%A1} = \frac{0.465 - 0.5508}{-0.0011} = 77.23 \mu\text{M ET}$$

Posteriormente, se calculan los mmoles ET en el peso de la fracción seca (fs), en este caso la fracción *n*-hexano:AcOEt 50% pesó 122.00 mg.

$$\text{EC50\%A1} = \frac{77.23 \mu\text{moles ET}}{\text{L ST A}} \times \frac{1 \text{ mmol ET}}{1000 \mu\text{moles ET}} = 0.07723 \text{ mmoles ET/L ST A}$$

$$\text{EC50\%A1} = \frac{0.07723 \text{ mmoles ET}}{\text{L ST A}} \times \frac{1 \text{ L ST A}}{1000 \text{ mL ST A}} = 77.23 \times 10^{-6} \text{ mmoles ET/mL ST A}$$

$$\text{EC50\%A1} = \frac{77.23 \times 10^{-6} \text{ mmoles ET}}{\text{mL ST A}} \times \frac{10.60 \text{ mL ST A}}{2.12 \text{ mg fs}} \times 122.00 \text{ mg fs}$$

$$\text{ECMet11} = 0.05 \text{ mmoles ET/fs}$$

Los resultados deben presentarse por gramo de fracción seca, por lo que se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{EC50\%A1} = 1 \text{ g fs} \times \frac{0.05 \text{ mmoles ET}}{0.122 \text{ g fs}} = 0.39 \text{ mmoles ET/g fracción}$$

Los resultados de la cuantificación de cada una de las 3 repeticiones se promedian, obteniendo el valor por solución de trabajo. Los resultados de las 3 soluciones de trabajo son promediados para obtener el valor por fracción correspondiente (Ver Figura N°55).

Para ambos métodos, Folin-Ciocalteu y DPPH, se elaboró una curva de calibración por análisis realizado, debido a que, a pesar de ser los mismos estándares a las mismas concentraciones establecidas, presentaron variaciones en cuanto a absorbancia de un análisis a otro.

La mayoría de estas lecturas se encontraban cercanas pero fue necesario eliminar valores que eran extremadamente diferentes, al realizar la media para cada uno de los estándares se obtuvo la curva promedio que dio el valor aproximado de la lectura correspondiente a cada estándar.

Las variaciones pueden deberse a diferentes factores, entre los cuales están el porcentaje de error de la cristalería, equipos, reactivos, analista y las condiciones ambientales, pero en especial, la solubilización del estándar.

Los compuestos polifenólicos son polares por lo que se esperaba que estuvieran en mayor cantidad a medida aumentaba la polaridad de las fracciones, esto fue comprobado en su cuantificación por medio del método de Folin-Ciocalteu, siendo la fracción metanólica la que contenía la mayor cantidad de fenoles totales con un resultado de 856.03 mg EAG/g de fracción seca, seguida de la fracción al 100% de acetato de etilo con 768.03 mg EAG/g de fracción seca; en comparación con la fracción del 10% de acetato de etilo (fracción menos polar), que apenas contenía una cantidad perceptible de fenoles totales, con 1.08 mg EAG/g de fracción seca.

La actividad antioxidante mayor fue la presentada por la fracción metanólica con un resultado de 2.48 mmoles ET/g de fracción seca, en comparación a las fracciones del 10% y 30% de acetato de etilo que no presentaron actividad antioxidante. Con estos resultados se puede afirmar que los polifenoles son, en su mayoría, los responsables de la actividad antioxidante, ya que las fracciones con mayor cantidad de fenoles totales también son las de mayor actividad antioxidante.

Tabla N°7. Resultados de la fracción *n*-hexano:AcOEt 50% en la cuantificación de fenoles totales.

Fracción	Peso Mx. (mg)	V ST. (mL)	A	C (µg EAG/mL)	EAG en fs (mg)	EAG (mg EAG/g fs)	Promedio/ST. (mg EAG/g fs)	Promedio (mg EAG/g fs)
50%	2.14	10.70	0.253	31.06	18.95	155.31	156.36	153.57
			0.244	29.93	18.26	149.65		
			0.267	32.82	20.02	164.11		
	2.13	10.65	0.249	30.56	18.64	152.80	149.97	
			0.245	29.99	18.30	149.97		
			0.240	29.43	17.95	147.14		
	2.14	10.68	0.249	30.50	18.60	152.48	154.37	
			0.258	31.69	19.33	158.45		
			0.248	30.43	18.56	152.17		

Tabla N°8. Resultados de la fracción *n*-hexano:AcOEt 50% en la cuantificación de la actividad antioxidante.

Fracción	Peso Mx. (mg)	V ST. (mL)	A	C (µM ET)	ET en fs (mmoles ET)	ET (mmoles ET/g fs)	Promedio/ST. (mmoles ET/g fs)	Promedio (mmoles ET/g fs)
50%	2.12	10.60	0.465	77.23	0.05	0.39	0.38	0.38
			0.469	73.63	0.04	0.37		
			0.465	77.23	0.05	0.39		
	2.40	12.00	0.466	76.33	0.05	0.38	0.38	
			0.464	78.13	0.05	0.39		
			0.466	76.33	0.05	0.38		
	2.26	11.30	0.467	75.43	0.05	0.38	0.38	
			0.466	76.78	0.05	0.38		
			0.465	77.23	0.05	0.39		

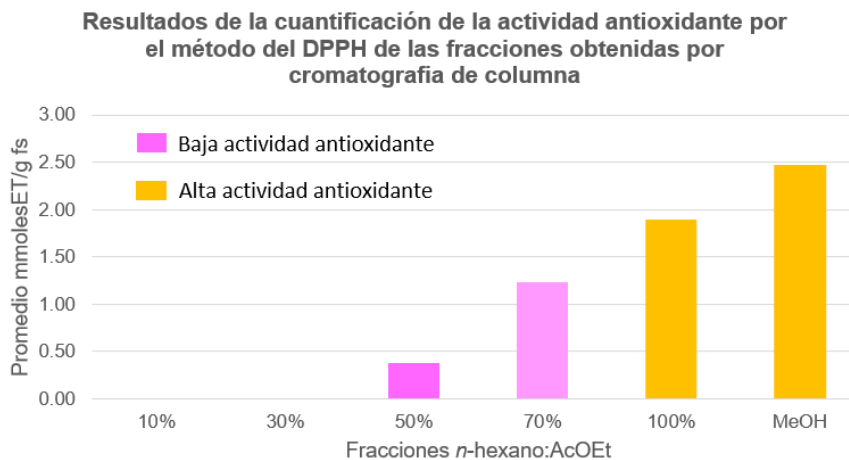


Figura N°55. Resultados de la cuantificación de la actividad antioxidante por el método del DPPH de las fracciones obtenidas por cromatografía de columna a partir de la fracción diclorometánica. El color violeta se decolora a amarillo a medida aumenta la actividad antioxidante.

Sin embargo, las fracciones del 10% y el 30% presentaron una muy pequeña cantidad de fenoles totales (en comparación a la fracción metanólica) mas no tuvo actividad antioxidante, esto puede deberse a que el medio generado en la reacción de Folin-Ciocalteu es básico, aproximadamente pH 10, lo cual favorece la formación del fenolato y la transferencia del protón para formar el complejo de Mo(V) de color azul mientras que en la prueba del DPPH esta condición drástica no se posee, añadido a lo anterior, el reactivo de Folin-Ciocalteu no solo reacciona con compuestos fenólicos sino también con cualquier sustancia reductora, tal como azúcares reductores; por lo que en la prueba de Folin-Ciocalteu se mide la capacidad reductora total de la muestra^(23; 37), siendo esta la razón principal de la diferencia entre los resultados de Folin-Ciocalteu y DPPH.

5.5 Determinar si existe diferencia estadística entre los resultados de las diferentes fracciones en la cuantificación de fenoles totales y la actividad antioxidante.

Se realizó la comparación entre las 6 fracciones obtenidas por cromatografía en columna a partir de la fracción diclorometánica, para poder establecer un criterio sobre cuál fracción es más conveniente que otra en cuanto a la cantidad de

fenoles totales y la actividad antioxidante, se realizó ANOVA de un solo factor con un nivel de confianza del 95.0%, los resultados se muestran en la Tabla N°9 y Tabla N°10.

Tabla N°9. ANOVA simple para fenoles totales en las 6 fracciones obtenidas por cromatografía en columna.

Fuente de las variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.06818E6	5	413637	7835.96	0.0000
Intra grupos	633.444	12	52.787		
Total	2.06882E6	17			

Tabla N°10. ANOVA simple para la actividad antioxidante en las 6 fracciones obtenidas por cromatografía en columna.

Fuente de las variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	16.2881	5	3.25762	517.54	0.0000
Intra grupos	0.0755333	12	0.00629444		
Total	16.3636	17			

Al aplicar la prueba de múltiples rangos se observó que existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que no comparten una misma columna de X's (Ver Tabla N°11 y N°12).

Tabla N°11. Prueba de múltiples rangos para fenoles totales en las 6 fracciones obtenidas por cromatografía en columna.

Fracción	Soluciones de trabajo analizadas	Promedio (mg EAG/g fs)	Grupos Homogéneos					
<i>n</i> -hexano:AcOEt 10%	3	1.08	X					
<i>n</i> -hexano:AcOEt 30%	3	61.01		X				
<i>n</i> -hexano:AcOEt 50%	3	153.57			X			
<i>n</i> -hexano:AcOEt 70%	3	227.92				X		
<i>n</i> -hexano:AcOEt 100%	3	768.03					X	
Metanol	3	856.03						X

Tabla N°12. Prueba de múltiples rangos para la actividad antioxidante en las 6 fracciones obtenidas por cromatografía en columna.

Fracción	Soluciones de trabajo analizadas	Promedio (mmoles ET/g fs)	Grupos Homogéneos				
<i>n</i> -hexano:AcOEt 10%	3	0.00	X				
<i>n</i> -hexano:AcOEt 30%	3	0.00	X				
<i>n</i> -hexano:AcOEt 50%	3	0.38		X			
<i>n</i> -hexano:AcOEt 70%	3	1.23			X		
<i>n</i> -hexano:AcOEt 100%	3	1.90				X	
Metanol	3	2.48					X

El análisis de varianza de un factor compara los valores medios de las 6 fracciones obtenidas y mediante la prueba F en la tabla de ANOVA, determina la existencia de diferencias significativas entre ellas y posteriormente la prueba de múltiples rangos identifica cuales medias son las significativamente diferentes.

La tabla ANOVA descompone la varianza de los resultados de las fracciones en dos componentes: entre grupos (diferentes fracciones) y dentro de grupos (datos de una sola fracción).

Un grupo homogéneo se refiere a aquella fracción en la que sus 3 soluciones de trabajo obtuvieron resultados homogéneos entre sí. En la prueba de Folin-Ciocalteu 6 grupos resultaron ser homogéneos; en el caso de la prueba del DPPH, las fracciones *n*-hexano:AcOEt 10% y 30% conforman un solo grupo homogéneo debido a que sus resultados en cada una de sus 3 soluciones de trabajo, fueron 0.00 mmoles ET/g de fracción seca, siendo así, que solamente existen 5 grupos homogéneos.

Ya que el valor P de la prueba F es menor a 0.05, existe diferencia estadísticamente significativa entre la media de las fracciones en ambas pruebas, con un nivel de confianza del 95.0% exceptuando las fracciones *n*-hexano:AcOEt 10% y 30% en la prueba del DPPH, que no poseen diferencia significativa entre ellas por compartir una misma columna de X's.

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. La protección de la muestra de kino desde su recolección hasta su almacenamiento y uso, es importante debido a que la cantidad de componentes antioxidantes se ve afectada por el contacto con el aire, la luz y la temperatura.
2. La proporción 1:10 utilizando etanol como solvente, es adecuada para la disolución del kino de *Eucalyptus citriodora*. El etanol disuelve por completo el kino, los polifenoles quedan distribuidos y disponibles para la interacción con el diclorometano, para que este pueda separar los metabolitos secundarios afines a él.
3. El uso del evaporador rotatorio es el método más adecuado para llevar a sequedad la fracción diclorometánica. Al disminuir la presión permite que el diclorometano se evapore rápido a una temperatura menor a 40°C impidiendo la degradación térmica de metabolitos secundarios y consecuente disminución de fenoles totales y la actividad antioxidante.
4. La fracción diclorometánica obtenida por partición líquido/líquido tiene un porcentaje de rendimiento 31.11% m/m respecto a los 10 gramos iniciales, un porcentaje muy bueno y nada despreciable.
5. La fracción de mayor porcentaje de rendimiento es la metanólica con un 30.17% m/m y la de menor rendimiento es la fracción *n*-hexano:AcOEt 10% con 1.45% m/m, en consecuencia a la afinidad por solventes polares de los polifenoles.
6. La fracción metanólica fue la de mayor cantidad de fenoles totales y mayor actividad antioxidante, mientras que, la fracción *n*-hexano:AcOEt 10% contiene la menor cantidad de fenoles totales y la menor actividad antioxidante.

7. Los fenoles totales y la actividad antioxidante están directamente relacionados en el kino de *Eucalyptus citriodora*, ya que a medida aumentan los polifenoles, así también, la actividad antioxidante.
8. El alto contenido de fenoles totales y la elevada actividad antioxidante del kino de *Eucalyptus citriodora*, indican que es una materia prima prometedora para ser incorporada a un fitofármaco o fitocosmético, que busque la prevención o reducción del estrés oxidativo y todas sus consecuencias, como el envejecimiento acelerado, enfermedades cardiovasculares, renales, diabetes, entre otras.
9. Todas las fracciones poseen diferencia estadísticamente significativa entre ellas, exceptuando las fracciones *n*-hexano:AcOEt 10% y 30% en la prueba del DPPH, ya que no poseen actividad antioxidante perceptible por este método.
10. El exudado del *Eucalyptus citriodora* corresponde al tipo kino, en base a la gran cantidad de fenoles totales en Folin-Ciocalteu, que corrobora los espectros de Resonancia Magnética Nuclear, donde la mayoría de compuestos presentes eran polifenoles, volviéndolos los responsables de la elevada actividad antioxidante demostrada en el método del DPPH.
11. No se encontraron datos de cuantificación de fenoles totales o de la actividad antioxidante en las fracciones estudiadas, por lo que, la investigación es la primera en determinarlos.
12. La prueba de Folin-Ciocalteu reacciona principalmente con polifenoles, pero también con otras sustancias reductoras, razón probable de que las fracciones correspondientes a las mezclas *n*-hexano:acetato de etilo 10% y 30% presenten resultados en Folin-Ciocalteu pero no presenten actividad antioxidante en la prueba del DPPH.

CAPÍTULO VII
RECOMENDACIONES

VII. RECOMENDACIONES

1. Mantener las condiciones de oscuridad y temperatura ambiente, debido a la inestabilidad de los reactivos utilizados y de los polifenoles, que en solución se vuelven más vulnerables al ataque del oxígeno, la temperatura y la luz.
2. Utilizar papel aluminio para cubrir por completo la cristalería a utilizar, desde que se toma el polvo del kino hasta la finalización en la determinación de los fenoles totales y la capacidad antioxidante.
3. Verificar que el reactivo de Folin-Ciocalteu tenga un color amarillo, si es color verdoso o azul, descartar. En el caso del DPPH, debe ser un polvo morado, la solución de este debe ser preparada al momento de realizar el experimento ya que es el reactivo más sensible a la degradación.
4. Usar equipo de bioseguridad para la parte experimental de este trabajo, los solventes son tóxicos y volátiles, trabajar en cámara de extracción de gases.
5. Retomar los resultados de esta investigación como referencia, para en caso sea posible, someter a elucidación estructural la fracción metanólica.
6. Realizar la determinación de fenoles totales y la actividad antioxidante del extracto acuoso y etanólico del kino de *Eucalyptus citriodora*, por ser solventes adecuados para la formulación de fitofármacos o fitocosméticos.
7. Realizar los ensayos toxicológicos agudo o sub-agudo del extracto acuoso y etanólico del kino de *Eucalyptus citriodora*, por ser los solventes más adecuados para la incorporación en un fitofármaco o fitocosmético.
8. Formular un fitomedicamento o fitocosmético, que incluya como materia prima el kino del *Eucalyptus citriodora*, con vía de administración tópica, en primera instancia, mientras no se tengan los ensayos toxicológicos agudo o sub-agudo del extracto acuoso y del etanólico del kino.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adalakun, O. E., Kudanga, T., Parker, A., Green, I. R., Le Roes-Hill, M., & Burton, S. G. (2012). Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74(1–2), 29–35. Doi:10.1016/j.molcatb.2011.08.010
2. Alas Galdamez, M. D. C., & Pinto Flores, J. A. (2007). *Determinación de la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas de la cromatografía de columna (n-hexano: AcOEt 10%, 30% y 50%) procedentes del extracto diclorometánico de la goma-resina de Eucalyptus citriodora (Eucalipto)*. Universidad de El Salvador.
3. Alsayari, A., Muhsinah, A. Bin, Hassan, M. Z., Ahsan, M. J., Alshehri, J. A., & Begum, N. (2019). Aurone: A biologically attractive scaffold as anticancer agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 166, 417–431. Doi:10.1016/j.ejmech.2019.01.078
4. Arul, D., & Subramanian, P. (2013). Inhibitory effect of naringenin (citrus flavonone) on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 434(2), 203–209. Doi:10.1016/j.bbrc.2013.03.039
5. Bartnik, M., & Facey, P. C. (2017). Glycosides. In S. Badal & R. Delgoda (Eds.), *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy* (pp. 101–161). Elsevier Inc. Doi:10.1016/B978-0-12-802104-0.00008-1
6. Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Antioxidants. In *Medical Biochemistry* (pp. 205–214). Elsevier. Doi:10.1038/224926b0
7. Castillo Olvera, G., Zavala Cuevas, D., & Carrillo Inungaray, M. L. (n.d.-g). Análisis fitoquímico: una herramienta para develar el potencial biológico y

farmacológico de las plantas. Disponible en:
<http://www.eumed.net/rev/tlatemoani/24/analisis-fitoquimico.html>

8. Chaaban, H., Ioannou, I., Paris, C., Charbonnel, C., & Ghoul, M. (2017). The photostability of flavanones, flavonols and flavones and evolution of their antioxidant activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 336, 131–139. Doi:10.1016/j.jphotochem.2016.12.027
9. Coronado H., M., Vega, S., Gutiérrez T., L. R., Vázquez F., M., & Radilla V., C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 206–212. Doi:10.4067/S0717-75182015000200014
10. Duh, P.-D., Chen, Z.-T., Lee, S.-W., Lin, T.-P., Wang, Y.-T., Yen, W.-J., ... Chu, H.-L. (2012). Antiproliferative Activity and Apoptosis Induction of Eucalyptus Citriodora Resin and Its Major Bioactive Compound in Melanoma B16F10 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 7866–7872. Doi:10.1021/jf301068z
11. EcuRed. (2019). Fitocosmética. Disponible en: <https://www.ecured.cu/Fitocosmética>
12. Elías Molina, R. E., & Suárez Palacios, J. Y. (2010). *Etnofarmacopéa del Municipio de La Laguna, Departamento de Chalatenango, El Salvador*. Universidad de El Salvador.
13. EUPATI. (2015). Fitofármacos. Disponible en: <https://www.eupati.eu/es/tipos-de-medicamentos/fitofarmacos/>
14. Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F. J., & Mantecón, A. R. (2004). Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2(2), 191–202. Doi:10.5424/sjar/2004022-73

15. García Martínez, E., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, A. (2015). *Determinación de Polifenoles Totales por el Método de Folin-Ciocalteu*. Valencia. Retrieved from [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia Martínez et al.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1)
16. Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R., & Palazón, J. (2013). Phenolic Acids. In K. G. Ramawat & J.-M. Mérillon (Eds.), *Natural Products* (pp. 1951–1973). Berlin, Heidelberg: Springer. Doi:10.1007/978-3-642-22144-6_64
17. González Ayala, J. C. (1994). *Botánica Medicinal Popular, Etnobotánica Medicinal de El Salvador*. (W. G. Berendsohn, Ed.) (Vol. 2). Antiguo Cuscatlán: CUSCATLANIA.
18. González Martínez, J., Sandoval Escobar, C., & Zavala Arias, M. (1997). *Resultados de 10 años de investigación silvicultural del proyecto madeleña en Honduras*. (L. A. Ugalde Arias, Ed.) (1st ed.). Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Retrieved from [https://books.google.com.sv/books?id=les1GdyGCUMC&pg=PA69&dq=descripcion+botanica+eucalyptus+citriodora&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj e8abkrabgAhXJUt8KHWXvDkMQ6AEIJzAA#v=onepage&q=descripcion botanica eucalyptus citriodora&f=false](https://books.google.com.sv/books?id=les1GdyGCUMC&pg=PA69&dq=descripcion+botanica+eucalyptus+citriodora&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj e8abkrabgAhXJUt8KHWXvDkMQ6AEIJzAA#v=onepage&q=descripcion%20botanica%20eucalyptus%20citriodora&f=false)
19. González, N., Elissetche, J., Pereira, M., & Fernández, K. (2017). Extraction of polyphenols from *Eucalyptus nitens* and *Eucalyptus globulus*: Experimental kinetics, modeling and evaluation of their antioxidant and antifungal activities. *Industrial Crops and Products*, 109, 737–745. Doi:10.1016/j.indcrop.2017.09.038
20. Gupta, M. P., Subprograma de Química Fina y Farmacéutica, C., & Secretaría Ejecutiva Permanente del Convenio Andrés Bello, S. (1995). *270 plantas medicinales iberoamericanas*. Colombia: Santafé de Bogotá.

21. Guzmán Díaz, I. M., & Henríquez Ardón, J. A. (2007). *Determinación de la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas de la cromatografía de columna (n-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro y metanol puro) procedentes del extracto diclorometánico de la goma-resina de Eucalyptus citriodora*. Universidad de El Salvador.
22. Hassan, G. S., Georgey, H. H., George, R. F., & Mohamed, E. R. (2018). Aurones and furoaurones: Biological activities and synthesis. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 56(2), 121–127. Doi:10.1016/j.bfopcu.2018.06.002
23. Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. Doi:10.1021/jf030723c
24. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA). (n.d.-x). ¿Qué es el Trolox? Disponible en: http://www.portalantioxidantes.com/?qa_faqs=¿que-es-el-trolox
25. Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422. Doi:10.1007/s13197-011-0251-1
26. Laddha, A. P., & Kulkarni, Y. A. (2019). Tannins and Vascular Complications of Diabetes: An update. *Phytomedicine*, 56, 229–245. Doi:10.1016/j.phymed.2018.10.026
27. Lambert, J. B., Wu, Y., Kozminski, M. A., & Santiago-Blay, J. A. (2007). Characterization of Eucalyptus and Chemically Related Exudates by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Australian Journal of Chemistry*, 60(11), 862–870. Doi:10.1071/CH07163

28. Lambert, J. B., Wu, Y., & Santiago-Blay, J. A. (2005). Taxonomic and Chemical Relationships Revealed by Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Plant Exudates. *Journal of Natural Products*, 68(5), 635–648. Doi:10.1021/np050005f
29. Liu, J., Meng, C., Yan, Y., Shan, Y., Kan, J., & Jin, C. (2016). Structure, physical property and antioxidant activity of catechin grafted Tremella fuciformis polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 719–724. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.11.027
30. Locher, C., & Currie, L. (2010). Revisiting kinos-An Australian perspective. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(2), 259–267. Doi:10.1016/j.jep.2010.01.028
31. Magoni, C., Bruni, I., Guzzetti, L., Regonesi, M. E., Sangiovanni, E., Dell'Agli, M., & Labra, M. (2015). Coffee pulp waste as a source of antioxidant phytocomplexes. *Expo Milano Nutrire Il Pianeta Energia per La Vita*.
32. Mahapatra, D. K., Bharti, S. K., Asati, V., & Singh, S. K. (2019). Perspectives of medicinally privileged chalcone based metal coordination compounds for biomedical applications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 174, 142–158. Doi:10.1016/j.ejmech.2019.04.032
33. Martínez Guerrero, R. E., & Quinteros Pérez, M. T. (2003). *Comprobación de la actividad antimicótica in vitro de una tintura elaborada con oleorresina de eucalipto (Eucalyptus citriodora)*. Universidad de El Salvador.
34. Méndez Rivas, M. C., & Ramírez Mendoza, J. L. (2006). *Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto diclorometánico de la goma-resina de Eucalyptus citriodora (eucalipto)*. Universidad de El Salvador.

35. Mesa Vanegas, A. M., Gaviria, C. A., Cardona, F., Sáez Vega, J. A., Blair Trujillo, S., & Rojano, B. A. (2010). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(2), 13–26. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962010000200003
36. Miranda, I., Lima, L., Quilhó, T., Knapic, S., & Pereira, H. (2016). The bark of *Eucalyptus sideroxylon* as a source of phenolic extracts with anti-oxidant properties. *Industrial Crops and Products*, 82, 7. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.003>
37. Muñoz Bernal, Ó. A., Torres Aguirre, G. A., Núñez Gastélum, J. A., De La Rosa, L. A., Rodrigo García, J., Ayala Zavala, J. F., & Álvarez Parrilla, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 20(2), 23–28. Doi:10.1016/j.recqb.2017.04.003
38. Muraleedharan, K. M., & Avery, M. A. (2007). Advances in the Discovery of New Antimalarials. In J. B. Taylor & D. J. Triggle (Eds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry II* (2nd ed., Vol. 7, pp. 765–814). Mississippi: Elsevier Ltd. Doi:10.1016/b0-08-045044-x/00227-3
39. Najarro Mendoza, C. M., & Ramírez Henríquez, D. J. (2005). *Determinación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la oleorresina del Eucalyptus citriodora (eucalipto)*. Universidad de El Salvador.
40. National Cancer Institute. (n.d.-an). Definición de antimicrobiano. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/antimicrobiano>

41. National Cancer Institute.(n.d.-ao).Definición de antioxidante.Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/antioxidante>
42. National Cancer Institute. (n.d.-ap). Definición de fitoquímico. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/fitoquimico>
43. Nobakht, M., Trueman, S. J., Wallace, H. M., Brooks, P. R., Streeter, K. J., & Katouli, M. (2017). Antibacterial Properties of Flavonoids from Kino of the Eucalypt Tree, *Corymbia torelliana*. *Plants*, 6(39), 1–15. Doi:10.3390/plants6030039
44. Oliveira, K. G. de. (2016). *Estabilidade de Compostos Fenólicos em Sorgo Durante o Armazenamento*. Universidad Federal de São João del-Rei, São João del-Rei. Retrieved from <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/168419/1/Estabilidade-deoxiantocianidinas.pdf>
45. Peñarrieta, J. M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Phenolic Compounds in Food. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68–81. Doi:10.1021/bk-1992-0506.ch001
46. Pérez, P. del R. (2005). *Vademécum de Fitoterapia*. Quintana de Rueda. Retrieved from https://www.academia.edu/7127103/Vademécum_de_Fitoterapia
47. Robards, K. (2013). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1000(1–2), 657–691. Doi:10.1007/978-3-642-33965-3_2
48. Schofield, P., Mbugua, D. M., & Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1–2), 21–40. Doi:[https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0)

49. Sebestyén, Z., Jakab, E., Badea, E., Barta-Rajnai, E., Şendrea, C., & Czégény, Z. (2019). Thermal degradation study of vegetable tannins and vegetable tanned leathers. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 138(August), 178–187. Doi:10.1016/j.jaap.2018.12.022
50. Shen, K., Chen, Z., & Duh, P. (2012). Cytotoxic Effect of Eucalyptus citriodora Resin on Human Hepatoma HepG2 Cells. *The American Journal of Chinese Medicine*, 40(2), 399–413. Doi:10.1142/S0192415X12500310
51. Sinopoli, A., Calogero, G., & Bartolotta, A. (2019). Computational aspects of anthocyanidins and anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 297, 1–12. Doi:10.1016/j.foodchem.2019.05.172
52. Soler Cantero, A. (2009). *Estudio de la Capacidad Antioxidante y la Biodisponibilidad de los Compuestos Fenólicos del Aceite de Oliva. Primeras Etapas en el Desarrollo de un Aceite de Oliva Funcional*. Universidad de Lleida.
53. Tan, H., Man, C., Xie, Y., Yan, J., Chu, J., & Huang, J. (2019). A Crucial Role of GA-Regulated Flavonol Biosynthesis in Root Growth of Arabidopsis. *Molecular Plant*, 12(4), 521–537. Doi:10.1016/j.molp.2018.12.021
54. Trejo Márquez, A., & Pascual Bustamante, S. (2009). *Evaluación de Capacidad Antioxidante y Determinación de Fenoles Totales para Frutos*. México: UNAM. Retrieved from <http://www.actiweb.es/postcosecha/archivo9.pdf>
55. Ullauri, P. G. (2010). Transporte de masa en extracción fase sólido-líquido. *ReCiTeIA*, 10, 1–13. Retrieved from <https://books.google.com.sv/books?id=4WbJxIh62ekC&pg=PA8&dq=factores+que+influyen+en+la+extraccion+sólido+líquido&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi-376OnovIAhUywVkkKHUq>

-AwUQ6AEINzAC#v=onepage&q=factores que influyen en la extraccion solido liquido&f=false

56. Universidad EIA. (n.d.-bd). Eucalipto (*Corymbia citriodora*). Disponible en: <https://catalogofloravalleaburra.eia.edu.co/species/75>
57. Vaca Sánchez, M. S., González Rodríguez, A., Maldonado López, Y., Fernandes, G. W., & Cuevas Reyes, P. (2016). Importancia de los taninos en especies del género *Quercus* como metabolitos secundarios asociados a defensa contra insectos herbívoros. *Biológicas*, 18(1), 10–20. Retrieved from <https://www.biologicas.umich.mx/index.php?journal=biologicas&page=article&op=view&path%5B%5D=247>
58. Valenzuela Bustamante, P. D. (2015). *Evaluación de la Actividad Antioxidante y Determinación del Contenido de Fenoles Totales y Flavonoides de Hojas de Diferentes Genotipos de Ugni Molinae Turcz.* Universidad de Chile.
59. Viada Pupo, E., Gómez Robles, L., & Campaña Marrero, I. R. (2017). Estrés oxidativo. *Correo Científico Médico de Holguín*, 21(1), 171–186. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812017000100014
60. Zhang, L., Li, Y., Liang, Y., Liang, K., Zhang, F., Xu, T., ... Lu, B. (2019). Determination of phenolic acid profiles by HPLC-MS in vegetables commonly consumed in China. *Food Chemistry*, 276, 538–546. Doi:10.1016/j.foodchem.2018.10.074
61. Zhong, Y., & Shahidi, F. (2015). Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. In F. Shahidi (Ed.), *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* (1st ed., pp. 287–333). Woodhead Publishing. Doi:10.1016/B978-1-78242-089-7.00012-9

GLOSARIO

Antimicrobiano: Sustancia que destruye microorganismos, tales como las bacterias o el moho, o les impide crecer y causar enfermedad.⁽⁴⁰⁾

Antioxidante: Sustancia que protege las células de los daños que causan los radicales libres (moléculas inestables elaboradas por el proceso de oxidación durante el metabolismo normal). Los radicales libres pueden ser en parte responsables del cáncer, la cardiopatía, el derrame cerebral y otras enfermedades del envejecimiento. Entre los antioxidantes están el betacaroteno, el licopeno, las vitaminas A, C y E, y otras sustancias naturales y fabricadas.⁽⁴¹⁾

Análisis fitoquímico preliminar: obtención de extractos de plantas con solventes adecuados, a los cuales se les realizan reacciones de coloración o precipitación, los resultados se reportan como (+) o (-) para el metabolito que se trate de identificar la presencia.⁽⁷⁾

Fitoquímico: Sustancia que se encuentra en las plantas. Algunos fitoquímicos puede reducir el riesgo de contraer cáncer.⁽⁴²⁾

Fitofármacos: se extraen de las plantas (o de partes de estas) que se consideran que presentan características curativas. También se denominan remedios o fármacos herbales, así como fármacos botánicos.⁽¹³⁾

Fitocosmética: Es el uso de los principios activos de las plantas para cuidado y estética de la piel y el cabello. El uso de unas u otras plantas viene determinado por su actividad fisiológica, que varía de unas plantas a otras, de modo que encontramos plantas para casi todas las necesidades estéticas.⁽¹¹⁾

ANEXOS

ANEXO N°1

ESQUEMA GENERAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FENOLES
TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

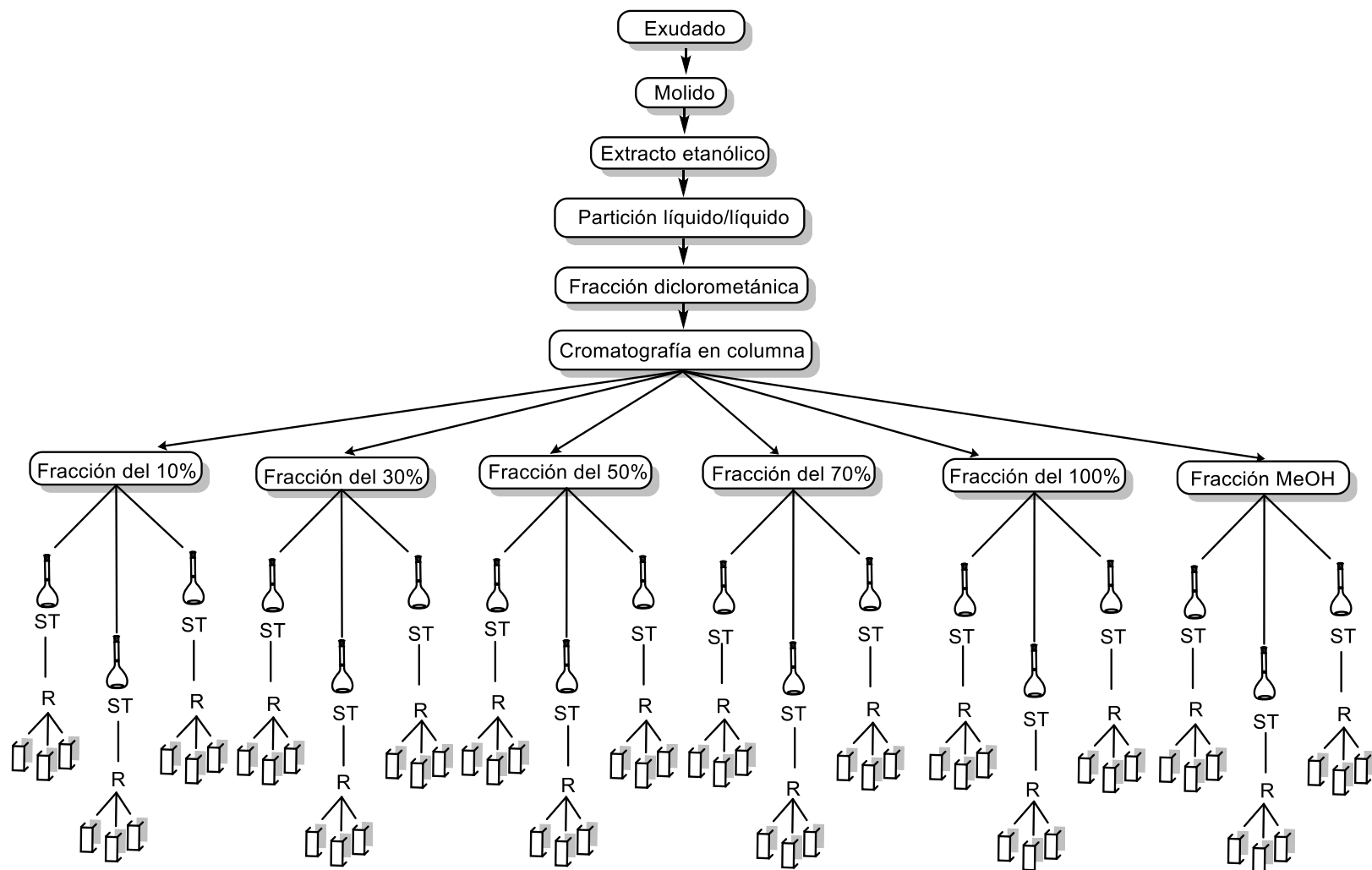


Figura N°56. Esquema general para realizar la cuantificación de fenoles totales y la actividad antioxidante. ST: Solución de trabajo, R: repeticiones.

ANEXO N°2

DESCRIPCIÓN DE REACTIVOS, CRISTALERIA, MATERIAL Y EQUIPO
NECESARIO EN LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES Y
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

- Reactivos:
 - 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)
 - Acetato de etilo
 - Ácido gálico pureza 97.5-102.5%, Sigma-Aldrich.
 - Agua bidestilada
 - Carbonato de sodio grado ACS, 99.95-100.05%, Sigma-Aldrich.
 - Diclorometano
 - Etanol 70°
 - Folin-Ciocalteu 2 N Sigma-Aldrich.
 - Gel de sílice
 - Metanol
 - *n*-hexano
 - Trolox pureza 97%
- Cristalería:
 - Agitadores de vidrio
 - Ampolla de separación capacidad de 250 mL
 - Balones capacidad de 250 mL
 - Columna cromatográfica
 - Embudos
 - Frascos Erlenmeyer capacidad 250 mL
 - Mortero y pistilo
 - Pipeta volumétrica capacidad 10.0 mL
 - Vasos de precipitados capacidad de 10 mL
 - Vasos de precipitados capacidad de 250 mL
 - Viales
 - Material:
 - Cubetas descartables para UV-Vis
 - Guantes descartables
 - Lana de vidrio

- Microespátulas
- Micropinzas
- Micropipeta capacidad 100-1000 μL
- Micropipeta capacidad 30-300 μL
- Papel absorbente
- Papel aluminio
- Papel filtro Whatman 91
- Papel PARAFILM
- Pinza clip
- Pinza de extensión
- Pinza de sostén
- Pissetas
- Puntas descartables para micropipetas capacidad de 0.5 mL y 1 mL
- Soporte metálico
- Tubos de microcentrífuga
- Equipo:
 - Balanza analítica OHAUS EXPLORER (5 dígitos)
 - Baño ultrasonido VWR (Modelo 97043-988)
 - Compresor de aire
 - Congelador
 - Espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis
 - Evaporador rotatorio
 - Micromolino Scienceware Bel-Art

ANEXO N°3

EQUIPOS UTILIZADOS EN EL PROCESO EXPERIMENTAL



(a)



(b)



(c)

Figura N°57. (a) Micromolino Scienceware Bel-Art, (b) Balanza analítica OHAUS EXPLORER, (c) Espectrofotómetro Genesis 10S UV-Vis.

ANEXO N°4

CÁLCULOS PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ESTÁNDAR
DE ÁCIDO GÁLICO PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN EN FOLIN-
CIOCALTEU.

Se parte de una solución madre de concentración de ácido gálico de 200 µg/mL. Las soluciones se preparan a las concentraciones de ácido gálico de 100.00 µg/mL, 75.00 µg/mL, 50.00 µg/mL, 25.00 µg/mL, 12.50 µg/mL, 6.25 µg/mL.

El volumen a preparar de cada estándar será de 1.0 mL, a excepción de los estándares al 12.5 µg/mL y 6.25 µg/mL, que por conveniencia de uso de micropipetas se preparan 0.8 mL. Para calcular el volumen de solución madre a utilizar para preparar cada solución estándar, se utiliza la siguiente fórmula:

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

Donde:

V_1 = Volumen de solución madre de ácido gálico a utilizar.

C_1 = Concentración de la solución madre de ácido gálico.

V_2 = Volumen de solución estándar a preparar.

C_2 = Concentración de solución estándar a preparar.

Ejemplo: cálculo para preparar la solución estándar de 100.00 µg/mL.

$$V_1 = \frac{(100\mu\text{g/mL})(1\text{ mL})}{200\ \mu\text{g/mL}} \quad V_1 = 0.5\ \text{mL} \quad V_1 = 500\ \mu\text{L de solución madre}$$

Dando como resultado los siguientes datos:

Tabla N°13. Datos para la preparación de la curva de calibración con ácido gálico.

Alícuota de solución madre (µL)	Alícuota de agua bidestilada (µL)	Volumen total (µL)	Concentración de ácido gálico (µg/mL)
500	500	1,000	100.00
375	625	1,000	75.00
250	750	1,000	50.00
125	875	1,000	25.00
50	750	800	12.50
25	775	800	6.25

ANEXO N°5

**CÁLCULOS PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ESTÁNDAR
DE TROLOX® PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN EN LA
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.**

Se parte de una solución madre 500 µM de Trolox®. Los estándares se preparan a las concentraciones de 250.00 µM, 100.00 µM, 50.00 µM, 25.00 µM, 12.50 µM, 6.25 µM. El volumen a preparar de cada estándar será de 1,000 µL y solamente los estándares al 250.00 µM y 100.00 µM provienen directamente de la solución madre. Para preparar los estándares se utiliza la siguiente fórmula:

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

Donde:

V_1 = Volumen de solución madre de Trolox® a utilizar

C_1 = Concentración de la solución madre de Trolox®

V_2 = Volumen de solución estándar a preparar

C_2 = Concentración de solución estándar a preparar

Ejemplo: cálculo para preparar la solución estándar de 100.00 µM Trolox®.

$$V_1 = \frac{(100\mu\text{M Trolox})(1000 \mu\text{L})}{500 \mu\text{M Trolox}} \quad V_1 = 200 \mu\text{L de solución madre}$$

Dando como resultado los siguientes datos:

Tabla N°14. Datos para la preparación de la curva de calibración con Trolox®.

Alícuota de solución madre (µL)	Alícuota de solución de concentración próxima superior (µL)*	Alícuota de agua bidestilada (µL)	Volumen total (µL)	Concentración µM Trolox®
500	---	500	1,000	250.00
200	---	800	1,000	100.00
---	500	500	1,000	50.00
---	500	500	1,000	25.00
---	500	500	1,000	12.50
---	500	500	1,000	6.25

*A partir del estándar de 100 µM Trolox® se preparan los demás estándares por cascada de dilución.

ANEXO N°6

CONSTANCIA DE IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL *Eucalyptus*
citriodora.



MINISTERIO
DE CULTURA

Dr. Marvin José Núñez, PhD.
Coordinador del laboratorio de Investigación en Productos Naturales
Facultad de Química y Farmacia
Presente

Por este medio hago constar que la muestra recolectada en la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, Municipio de San Salvador. Depto. San Salvador, en fecha 20 de enero de 2019, por Jenny Menjívar (MHES) Marvin J. Núñez, & Ulises Castillo (FQF-UES), con características Árbol de 15-20mt. Hojas Color verde y olor característico. Con dicha información y al examinar la muestra se determina que pertenece a la especie *Corymbia citriodora* (Hook.) K. D. Hill & L. A. S. Johnson (*Eucalyptus citriodora*) de la familia *Myrtaceae*, la cuál será depositada en la colección nacional del herbario MHES del Museo de Historia Natural de El Salvador, bajo el número de Voucher J. Menjívar *et al* 5022.

Para los usos que estime conveniente se extiende la presente constancia de identificación de muestra botánica a los 14 días de octubre del año 2019.

F. 
Licda. Jenny Menjívar
Curadora Herbario MHES



Coordinadora Colecciones de Historia Natural MUHNES.

ANEXO N°7

RESULTADO DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LAS
ABSORBANCIAS EN LA PRUEBA DE FOLIN-CIOCALTEU.

Tabla N°15. Resultado del coeficiente de variación de las absorbancias de cada solución de trabajo en la prueba de Folin-Ciocalteu.

Fracción	ST	Código	Absorbancia	Promedio Absorbancias	S	%CV
10%	A	EC10A1	0.007	0.006	0.001	9.12%
		EC10A2	0.006			
		EC10A3	0.006			
	B	EC10B1	0.008	0.008	0.001	7.53%
		EC10B2	0.007			
		EC10B3	0.008			
	C	EC10C1	0.009	0.009	0.000	0.00%
		EC10C2	0.009			
		EC10C3	0.009			
30%	A	EC30A1	0.114	0.112	0.004	3.62%
		EC30A2	0.107			
		EC30A3	0.114			
	B	EC30B1	0.093	0.094	0.003	3.41%
		EC30B2	0.092			
		EC30B3	0.098			
	C	EC30C1	0.111	0.103	0.008	7.54%
		EC30C2	0.104			
		EC30C3	0.095			
50%	A	EC50A1	0.253	0.255	0.012	4.55%
		EC50A2	0.244			
		EC50A3	0.267			
	B	EC50B1	0.249	0.245	0.005	1.84%
		EC50B2	0.245			
		EC50B3	0.240			
	C	EC50C1	0.249	0.252	0.006	2.24%
		EC50C2	0.258			
		EC50C3	0.248			
70%	A	EC70A1	0.389	0.385	0.004	1.05%
		EC70A2	0.381			
		EC70A3	0.386			
	B	EC70B1	0.350	0.352	0.003	0.82%
		EC70B2	0.355			
		EC70B3	0.350			

ST: Solución de Trabajo, A: Absorbancia, S: Desviación estándar, CV: Coeficiente de Variación

Tabla N°15. Continuación.

Fracción	ST	Código	Absorbancia	Promedio Absorbancias	S	%CV
70%	C	EC70C1	0.385	0.369	0.016	4.41%
		EC70C2	0.368			
		EC70C3	0.353			
100%	A	EC100A1	0.450	0.450	0.002	0.34%
		EC100A2	0.449			
		EC100A3	0.452			
	B	EC100B1	0.422	0.423	0.001	0.14%
		EC100B2	0.423			
		EC100B3	0.423			
	C	EC100C1	0.450	0.437	0.013	3.04%
		EC100C2	0.437			
		EC100C3	0.423			
Metanol	A	ECMEtA1	0.478	0.476	0.002	0.44%
		ECMEtA2	0.477			
		ECMEtA3	0.474			
	B	ECMEtB1	0.478	0.475	0.003	0.63%
		ECMEtB2	0.475			
		ECMEtB3	0.472			
	C	ECMEtC1	0.478	0.476	0.002	0.42%
		ECMEtC2	0.476			
		ECMEtC3	0.474			

ST: Solución de Trabajo, A: Absorbancia, S: Desviación estándar, CV: Coeficiente de Variación

ANEXO N°8

RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES EN
LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR CROMATOGRFÍA EN
COLUMNA A PARTIR DE LA FRACCIÓN DICLOROMETÁNICA DEL
KINO DE *Eucalyptus citriodora*.

Tabla N° 16. Resultados de la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu en las fracciones obtenidas por cromatografía en columna a partir de la fracción diclorometánica del kino de *E. citriodora*.

Fracción	Peso (mg)	Vd. (mL)	A	µg EAG/mL	mg EAG en la fracción	mg EAG/g fracción	Promedios mg EAG/g fracción	Promedio mg EAG/g fracción
10%	2.11	10.55	0.007	0.13	0.02	0.66	0.24	1.08
			0.006	0.01	0.00	0.03		
			0.006	0.01	0.00	0.03		
	2.15	10.75	0.008	0.26	0.04	1.29	1.08	
			0.007	0.13	0.02	0.66		
			0.008	0.26	0.04	1.29		
	2.13	10.65	0.009	0.38	0.06	1.92	1.92	
			0.009	0.38	0.06	1.92		
			0.009	0.38	0.06	1.92		
30%	2.11	10.55	0.114	13.59	2.40	67.93	66.46	61.01
			0.107	12.71	2.24	63.53		
			0.114	13.59	2.40	67.93		
	2.05	10.25	0.093	10.94	1.93	54.72	55.56	
			0.092	10.82	1.91	54.10		
			0.098	11.57	2.04	57.87		
	2.08	10.40	0.111	13.15	2.32	65.73	61.01	
			0.104	12.27	2.16	61.33		
			0.095	11.20	1.98	55.98		

Vd.: Volumen de disolución, A: Absorbancia, EAG; Equivalentes a Ácido Gálico

Tabla N°16. Continuación.

Fracción	Peso (mg)	Vd. (mL)	A	µg EAG/mL	mg EAG en la fracción	mg EAG/g fracción	Promedios mg EAG/g fracción	Promedio mg EAG/g fracción
50%	2.14	10.70	0.253	31.06	18.95	155.31	156.36	153.57
			0.244	29.93	18.26	149.65		
			0.267	32.82	20.02	164.11		
	2.13	10.65	0.249	30.56	18.64	152.80	149.97	
			0.245	29.99	18.30	149.97		
			0.240	29.43	17.95	147.14		
	2.14	10.68	0.249	30.50	18.60	152.48	154.37	
			0.258	31.69	19.33	158.45		
			0.248	30.43	18.56	152.17		
70%	2.38	11.90	0.389	48.16	73.83	240.81	238.50	227.92
			0.381	47.16	72.29	235.78		
			0.386	47.78	73.25	238.92		
	2.07	10.35	0.350	43.26	66.32	216.29	217.34	
			0.355	43.89	67.28	219.44		
			0.350	43.26	66.32	216.29		
	2.23	11.13	0.385	47.66	73.06	238.30	227.92	
			0.368	45.52	69.78	227.61		
			0.353	43.57	66.80	217.86		

Vd.: Volumen de disolución, A: Absorbancia, EAG; Equivalentes a Ácido Gálico.

Tabla N°16. Continuación.

Fracción	Peso (mg)	Vd. (mL)	A	µg EAG/mL	mg EAG en la fracción	mg EAG/g fracción	Promedios mg EAG/g fracción	Promedio mg EAG/g fracción
100%	2.20	30.00	0.450	55.83	315.04	761.34	761.91	768.03
			0.449	55.71	314.33	759.63		
			0.452	56.08	316.46	764.77		
	2.03	30.00	0.422	52.31	319.90	773.07	774.31	
			0.423	52.44	320.67	774.93		
			0.423	52.44	320.67	774.93		
	2.12	30.00	0.450	55.77	327.34	791.05	767.86	
			0.437	54.20	318.11	768.76		
			0.423	52.44	307.78	743.79		
Metanol	2.10	30.00	0.478	59.35	511.53	847.89	844.90	856.03
			0.477	59.23	510.45	846.09		
			0.474	58.85	507.20	840.71		
	2.04	30.00	0.478	59.35	526.58	872.83	867.28	
			0.475	58.98	523.23	867.28		
			0.472	58.60	519.88	861.73		
	2.07	30.00	0.478	59.29	518.40	859.27	855.93	
			0.476	59.10	516.75	856.53		
			0.474	58.79	514.00	851.98		

Vd.: Volumen de disolución, A: Absorbancia, EAG; Equivalentes a Ácido Gálico.

ANEXO N°9

RESULTADOS DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LAS
ABSORBANCIAS EN LA PRUEBA DEL DPPH.

Tabla N°17. Resultados del coeficiente de variación de las absorbancias de cada solución de trabajo en la prueba del DPPH.

Fracción	ST	Código	Absorbancia	Promedio Absorbancias	S	%CV
10%	A	EC10A1	0.594	0.593	0.002	0.35%
		EC10A2	0.595			
		EC10A3	0.591			
	B	EC10B1	0.594	0.593	0.002	0.35%
		EC10B2	0.595			
		EC10B3	0.591			
	C	EC10C1	0.595	0.593	0.001	0.18%
		EC10C2	0.593			
		EC10C3	0.593			
30%	A	EC30A1	0.591	0.589	0.002	0.26%
		EC30A2	0.589			
		EC30A3	0.588			
	B	EC30B1	0.593	0.594	0.004	0.61%
		EC30B2	0.591			
		EC30B3	0.598			
	C	EC30C1	0.590	0.592	0.002	0.42%
		EC30C2	0.591			
		EC30C3	0.595			
50%	A	EC50A1	0.465	0.466	0.002	0.50%
		EC50A2	0.469			
		EC50A3	0.465			
	B	EC50B1	0.466	0.465	0.001	0.25%
		EC50B2	0.464			
		EC50B3	0.466			
	C	EC50C1	0.467	0.466	0.001	0.22%
		EC50C2	0.466			
		EC50C3	0.465			
70%	A	EC70A1	0.272	0.267	0.005	1.87%
		EC70A2	0.267			
		EC70A3	0.262			
	B	EC70B1	0.287	0.287	0.002	0.70%
		EC70B2	0.285			
		EC70B3	0.289			

ST: Solución de Trabajo, A: Absorbancia, S: Desviación estándar, CV: Coeficiente de Variación

Tabla N°17. Continuación

Fracción	ST	Código	Absorbancia	Promedio Absorbancias	S	%CV
70%	C	EC70C1	0.270	0.277	0.009	3.25%
		EC70C2	0.275			
		EC70C3	0.287			
100%	A	EC100A1	0.403	0.404	0.003	0.80%
		EC100A2	0.408			
		EC100A3	0.402			
	B	EC100B1	0.388	0.388	0.004	0.91%
		EC100B2	0.391			
		EC100B3	0.384			
	C	EC100C1	0.406	0.403	0.007	1.71%
		EC100C2	0.395			
		EC100C3	0.408			
Metanol	A	ECMEtA1	0.349	0.339	0.009	2.65%
		ECMEtA2	0.333			
		ECMEtA3	0.334			
	B	ECMEtB1	0.349	0.356	0.006	1.71%
		ECMEtB2	0.361			
		ECMEtB3	0.357			
	C	ECMEtC1	0.349	0.350	0.002	0.60%
		ECMEtC2	0.348			
		ECMEtC3	0.352			

ST: Solución de Trabajo, A: Absorbancia, S: Desviación estándar, CV: Coeficiente de Variación

ANEXO N°10

RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR
CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA A PARTIR DE LA FRACCIÓN
DICLOROMETÁNICA DEL KINO DE *Eucalyptus citriodora*.

Tabla N°18. Resultados de la cuantificación de la actividad antioxidante por el método del DPPH en las fracciones obtenidas por cromatografía en columna a partir de la fracción diclorometánica del kino de *E. citriodora*.

Fracción	Peso (mg)	Vd. (mL)	A	μM ET	mmoles ET en la fracción	mmoles ET/g fracción	Promedios mmoles ET/g fracción	Promedio mmoles ET/g fracción
10	1.99	9.95	0.594	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			0.595	0.00	0.00	0.00		
			0.591	0.00	0.00	0.00		
	2.02	10.10	0.594	0.00	0.00	0.00	0.00	
			0.595	0.00	0.00	0.00		
			0.591	0.00	0.00	0.00		
	2.01	10.03	0.595	0.00	0.00	0.00	0.00	
			0.593	0.00	0.00	0.00		
			0.593	0.00	0.00	0.00		
30	2.06	10.30	0.591	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			0.589	0.00	0.00	0.00		
			0.588	0.00	0.00	0.00		
	1.99	9.95	0.593	0.00	0.00	0.00	0.00	
			0.591	0.00	0.00	0.00		
			0.598	0.00	0.00	0.00		
	2.03	10.13	0.590	0.00	0.00	0.00	0.00	
			0.591	0.00	0.00	0.00		
			0.595	0.00	0.00	0.00		

Vd.: Volumen de disolución, A: Absorbancia, ET: Equivalentes a Trolox.

Tabla N°18. Continuación.

50	2.12	10.60	0.465	77.23	0.05	0.39	0.38	0.38
			0.469	73.63	0.04	0.37		
			0.465	77.23	0.05	0.39		
	2.40	12.00	0.466	76.33	0.05	0.38	0.38	
			0.464	78.13	0.05	0.39		
			0.466	76.33	0.05	0.38		
	2.26	11.30	0.467	75.43	0.05	0.38	0.38	
			0.466	76.78	0.05	0.38		
			0.465	77.23	0.05	0.39		
70	2.45	12.25	0.272	250.91	0.38	1.25	1.28	1.23
			0.267	255.41	0.39	1.28		
			0.262	259.91	0.40	1.30		
	2.23	11.15	0.287	237.41	0.36	1.19	1.19	
			0.285	239.21	0.37	1.20		
			0.289	235.61	0.36	1.18		
	2.34	11.70	0.270	253.16	0.39	1.27	1.23	
			0.275	248.66	0.38	1.24		
			0.287	237.41	0.36	1.19		
100	2.21	30.00	0.403	133.03	0.75	1.81	1.79	1.90
			0.408	128.53	0.72	1.74		
			0.402	133.93	0.75	1.82		

Vd.: Volumen de disolución, A: Absorbancia, ET: Equivalentes a Trolox.

Tabla N°18. Continuación.

100%	2.13	30.00	0.388	146.52	0.85	2.06	2.07	
			0.391	143.82	0.84	2.03		
			0.384	150.12	0.87	2.11		
	2.17	30.00	0.406	130.78	0.75	1.81	1.84	
			0.395	140.22	0.80	1.94		
			0.408	128.53	0.74	1.78		
Metanol	2.20	30.00	0.349	181.62	1.49	2.48	2.60	
			0.333	196.02	1.61	2.67		
			0.334	195.12	1.61	2.66		
	2.22	30.00	0.349	181.32	1.48	2.45	2.37	
			0.361	170.52	1.39	2.30		
			0.357	174.42	1.42	2.36		
	2.21	30.00	0.349	181.62	1.49	2.47	2.46	
			0.348	182.52	1.49	2.48		
			0.352	178.92	1.47	2.43		

Vd.: Volumen de disolución, A: Absorbancia, ET: Equivalentes a Trolox