

Información Importante

La Universidad Santo Tomás, informa que EILEEN XIOMARA GUERRA CARPINTERO ha autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan **finalidad académica**, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, la Universidad Santo Tomás informa que “los derechos morales sobre documento son propiedad de los autores, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.”

**Bibliotecas Bucaramanga
Universidad Santo Tomás**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE E INHIBICIÓN DE LA
ACETILCOLINESTERASA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS OBTENIDOS DE
CÁSCARAS DE NARANJA**

EILEEN XIOMARA GUERRA CARPINTERO

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISIÓN DE INGENIERIAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2015**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE E INHIBICIÓN DE LA
ACETILCOLINESTERASA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS OBTENIDOS DE
CÁSCARAS DE NARANJA**

EILEEN XIOMARA GUERRA CARPINTERO

Trabajo de grado para optar el título de Químico Ambiental

Directora del proyecto

MARTHA CERVANTES DIAZ, Qca., M. Sc.

Codirectora del proyecto

SILVIA JULIANA VARGAS, Qca. Ambiental.

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISIÓN DE INGENIERIAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2015**

DEDICATORIA

A Dios por permitirme realizar y culminar uno más de los logros que me ayudan a crecer como profesional.

A mis padres y hermanos por darme el apoyo moral que necesité durante este proceso.

A la profesora Martha Cervantes y a Silvia Vargas por guiarme y estar siempre de mi mano.

A mis familiares, compañeros y amigos que participaron directa o indirectamente en la realización de este proyecto.

A mi hijo Matías por ser el pilar fundamental de mi vida, quien me alienta espiritualmente a escalar día a día.

Eileen Xiomara Guerra Carpintero

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente al Grupo de Investigaciones Ambientales para el Desarrollo Sostenible GIADS por acogerme y brindarme los conocimientos necesarios para desarrollar exitosamente este proyecto.

A la Universidad Santo Tomás y a la Facultad de Química Ambiental por la formación profesional que me brindó.

Infinitas gracias a la profesora Martha Cervantes por su dedicación, entrega, por su compromiso y responsabilidad para que este proyecto culminara de la mejor forma, por brindarme su cariño y la confianza requerida en todo momento.

A Silvia Vargas mil gracias por estar ahí resolviendo todas y cada una de mis dudas con esa amabilidad que la caracteriza, por brindarme su amistad y su apoyo.

De igual forma agradezco a la Doctora Leonor Vargas por su asesoría y acompañamiento en la realización del ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa y la actividad antioxidante.

Al profesor Amner Muñoz por su asesoría en los análisis del ensayo sobre la actividad antioxidante.

A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron con el desarrollo de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	16
1.1.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
1.2.JUSTIFICACIÓN.....	18
1.3.OBJETIVOS.....	19
1.3.1.OBJETIVO GENERAL	19
1.3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2. MARCO REFERENCIAL	20
2.1. MARCO TEÓRICO.....	20
2.1.1.Generalidades de los frutos cítricos	20
2.1.2.Compuestos flavonoides.....	22
2.1.3.Métodos de obtención de compuestos flavonoides	25
2.1.4.Propiedades biológicas de los compuestos tipo flavonoide: actividad antioxidante y actividad inhibitoria <i>in vitro</i> de la enzima acetilcolinesterasa.....	25
2.2. MARCO DE ANTECEDENTES	33
3. DISEÑO METODOLÓGICO	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
5. CONCLUSIONES	74
6. DIVULGACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	76
BIBLIOGRAFÍA	77
ANEXOS	83

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Compuestos flavonoides más importantes presentes en algunas plantas de consumo humano.	24
Cuadro 2. Inhibidores de acetilcolinesterasa aprobados por la FDA para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas	31
Cuadro 3. Condiciones de extracción para cada método empleado	40
Cuadro 4. Compuestos de referencia para la actividad antioxidante	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción de cítricos en Colombia año 2010	21
Figura 2. Fruto de la Naranja. Familia Rutaceae Género <i>Citrus</i>	22
Figura 3. Estructura de los flavonoides.	22
Figura 4. Estructura del ácido gálico (AG).....	27
Figura 5. Estructura de la quercetina	28
Figura 6. Reacción de un antioxidante tipo fenol con ABTS ⁺	28
Figura 7. Reacción inhibición de la acetilcolinesterasa	29
Figura 8. Metodología	35
Figura 9. Preparación del material vegetal.....	36
Figura 10. Preparación de la muestra para la determinación del porcentaje de humedad relativa	38
Figura 11. Equipo de rotoevaporación disponible en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales de la Universidad Santo Tomás – Bucaramanga.....	42
Figura 12. Equipo espectrofotómetro UV- Vis disponible en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales de la Universidad Santo Tomás	44
Figura 13. Placa de microdiluciones de 96 pocillos y equipo lector de microplacas disponible en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales de la Universidad Santo Tomás	45
Figura 14. Diseño metodológico en placa de 96 pocillos en la determinación de la actividad antioxidante	48
Figura 15. Diseño metodológico en placa de 96 pocillos en la determinación <i>in vitro</i> en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.....	50
Figura 16. Porcentaje de rendimiento de los extractos	53
Figura 17. Curva de calibración del ácido gálico	55
Figura 18. Curva de calibración para la quercetina	58
Figura 19. Relación del contenido de flavonoides totales sobre los polifenoles totales para cada método de extracción	60
Figura 21. Curvas de la actividad antioxidante para los compuestos de referencia	62
Figura 22. Curvas de la actividad antioxidante para los extractos etanólicos de la cáscara de naranja	62
Figura 23. Comparación de los valores TAC de los diferentes métodos de extracción y los compuestos de referencia.....	65
Figura 24. Compuestos de referencia para AChE.....	67
Figura 26. Curvas de inhibición de la enzima AChE de los compuestos de referencia.	68

Figura 27. Curvas de inhibición de la enzima AChE de los extractos etanólicos de las cáscaras de naranja	68
Figura 28. Comparación de los valores de IC ₅₀ de la actividad inhibitoria de la enzima AChE para los extractos etanólicos de la cáscara de naranja y los compuestos de referencia.....	71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Humedad relativa de las cáscaras.....	51
Tabla 2. Resultados del análisis bromatológico de las cáscaras de naranja	52
Tabla 3. Rendimientos promedios de la extracción para cada método.....	53
Tabla 4. Absorbancia de la curva de calibración del ácido gálico (AG) para polifenoles totales.....	55
Tabla 5. Promedio del resultado de la cuantificación de polifenoles totales.....	56
Tabla 6. Absorbancia de la curva de calibración de quercetina para flavonoides totales	57
Tabla 7. Promedio del resultado en la cuantificación de flavonoides totales.....	58
Tabla 8. Promedio de la actividad antioxidante para los extractos etanólicos y los compuestos de referencia	64
Tabla 9. Relación de la cantidad de polifenoles y flavonoides totales presentes en la actividad antioxidante	66
Tabla 10. Valores promedio de la IC ₅₀ de la actividad inhibitoria de la enzima AChE de los compuestos de referencia y los extractos etanólicos de la cáscara de naranja.....	70
Tabla 11. Relación de la cantidad de polifenoles y flavonoides totales presentes en la inhibición de la AChE	72

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Informe ensayo bromatológico realizado en el CICTA.....	83
Anexo B. Rendimientos de la extracción de las muestras en estado fresco y seco respectivamente	85
Anexo C. Absorbancias de la curva de calibración del ácido gálico (AG) para polifenoles totales.....	86
Anexo D. Ecuaciones para la determinación de la cantidad de polifenoles y flavonoides totales.....	87
Anexo E. Absorbancias de la curva de calibración de quercetina para flavonoides totales	88
Anexo F. Datos y curva del Trolox	89
Anexo G. Curvas antioxidante para los patrones de referencia BHT, BHA, Vit E, naringina y naringenina	90
Anexo H. Curvas antioxidante para muestras en estado fresco para método <i>Soxhlet</i>	93
Anexo I. Curvas antioxidante para muestras en estado seco para método <i>Soxhlet</i>	95
Anexo J. Curvas antioxidante para muestras en estado fresco para EAU	97
Anexo K. Curvas antioxidante para muestras en estado seco para EAU	99
Anexo L. Curvas antioxidante para muestras en estado fresco para EAM.....	101
Anexo M. Curvas antioxidante para muestras en estado seco para EAM.....	103
Anexo N. Curvas de inhibición de la enzima AChE de los compuestos de referencia galantamina, naringina y naringenina.....	105
Anexo O. Curvas de inhibición de la AChE para muestras en estado fresco por método <i>Soxhlet</i>	107
Anexo P. Curvas de inhibición de la AChE para muestras en estado seco por método <i>Soxhlet</i>	108
Anexo Q. Curvas de inhibición de la AChE para muestras en estado fresco por EAU	109
Anexo R. Curvas de inhibición de la AChE para muestras en estado seco por EAU	110
Anexo S. Curvas de inhibición de la AChE para muestras en estado fresco por EAM.....	111
Anexo T. Curvas de inhibición de la AChE para muestras en estado seco por EAM	112

Anexo U. Evidencia de la participación en el XIX Simposio Nacional de Química Orgánica.....	113
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µL	Microlitros
ABTS	Ácido 2,2'-bis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico)
AcChE	Acetilcolinesterasa
AG	Ácido gálico
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CICTA	Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Alimentos
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAM	Extracción asistida por microondas
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
ERO	Especies reactivas de oxígeno
g	Gramos
IC50	Concentración inhibitoria media o cincuenta
L	Litros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
TAA	Actividad antioxidante total
TEAC	Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox
UIS	Universidad Industrial de Santander
UV- Vis	Ultravioleta visible
Vit E	Vitamina E

GLOSARIO

ANTIOXIDANTE: molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. ¹

DISPOSICIÓN FINAL: acción de depositar o confinar permanentemente residuos en distintos sitios. ²

INHIBICIÓN: proceso de reducción de la actividad de las enzimas. ³

LIXIVIADO: líquido que se segrega durante el proceso en el cual los residuos sólidos en un ambiente anaerobio inician su proceso de descomposición. ⁴

METABOLITOS SECUNDARIOS: compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no se encuentran directamente relacionados con el crecimiento o reproducción de este. ⁵

MATERIAL RECICLABLE: material que después de cumplir con su propósito original, poseen propiedades físicas con las cuales pueden ser reutilizados para generar nuevos productos. ⁶

RECICLAJE: actividad en la cual los residuos son separados, recogidos, clasificados y procesados para incorporarlos nuevamente a un ciclo. ⁶

RELLENO SANITARIO: técnica para la disposición y el confinamiento de los residuos sólidos sin causar daños al ambiente y a la salud. ²

RESIDUOS ORGÁNICOS: es un conjunto de desechos, entre los que encontramos material orgánico, producido no solo por las personas, sino también por el ganado y otros seres vivos. ⁶

RESUMEN

Colombia es un gran país productor de cítricos a nivel mundial, aunque su comercio en fresco es menor en comparación a su producción, revelando un gran consumo interno. Debido a esto, se genera gran cantidad de residuos que pueden ser aprovechados, ya que poseen metabolitos secundarios, como los flavonoides que son compuestos que tienen variedad de propiedades biológicas como, antiinflamatorias, anticancerígenas, antioxidantes, antivirales, antibacteriales, entre otras.

El objetivo principal de este trabajo fue la obtención de compuestos de valor agregado tipo flavonoides, a partir de las cáscaras de naranja. Estas cáscaras fueron sometidas a métodos de extracción etanólica sólido- líquido tipo *Soxhlet*, extracción asistida por ultrasonido y extracción asistida por microondas. Las cáscaras de naranja se trabajaron en estado fresco y seco.

Obtenidos los extractos se evaluó la actividad antioxidante por medio del contenido de polifenoles totales, flavonoides totales y medición del catión radical ABTS⁺, se analizó la actividad inhibitoria *in vitro* de la enzima acetilcolinesterasa de los extractos.

La extracción con *Soxhlet*, tuvo mayor rendimiento, en las muestras en estado fresco, el promedio fue de 8,9% y las cáscaras secas con un valor promedio de 28,4%. Las muestras en estado seco, mostraron resultados altos en la medición de polifenoles y flavonoides totales con valores de 56,9 mg AG/ g extracto seco y 1,25 mg quercetina/ g extracto seco respectivamente. En la actividad antioxidante, los extractos obtenidos por microondas, para las muestras en estado fresco fueron los más eficientes con un valor promedio de Actividad Antioxidante Total (TAA) de 150,1 mmol de Trolox/ Kg muestra. En cuanto la inhibición de la acetilcolinesterasa la extracción asistida por microondas con muestras en estado seco, arrojaron una concentración inhibitoria media de 34,1 µg/ mL

PALABRAS CLAVES: flavonoides, antioxidante, inhibición, acetilcolinesterasa, cáscara, naranja.

ABSTRACT

Colombia is a major producer of citrus worldwide, while fresh trade is less compared to its production, revealing a large domestic consumption. Because of this, large amounts of waste that can be exploited, since they have secondary metabolites such as flavonoids that are compounds having variety of biological properties as, anti-inflammatory, anticancer, antioxidant, antiviral, antibacterial, among other.

The main objective of this work was the preparation of compounds of value added flavonoids type, from orange peels. These shells were subjected to ethanolic extraction methods *Soxhlet* solid-liquid, ultrasound assisted extraction and microwave assisted extraction. Orange peels were worked in a cool dry state.

Extracts obtained antioxidant activity through total polyphenol content, measurement of total flavonoids and radical cation ABTS⁺ was assessed, the *In vitro* inhibitory activity of the enzyme acetylcholinesterase extracts was analyzed.

Soxhlet extraction, had better performance in the samples fresh, the average was 8.9% and the dried shells with an average of 28.4%. The dry samples showed good results in the measurement of total flavonoids and polyphenols with values of 56,9 mg GA / g dry extract and 1,25 mg quercetin / g dry extract respectively. In the antioxidant activity, the extracts obtained by microwaves, for fresh samples were more efficient with an average value of the Total Antioxidant Activity (TAA) of 150.1 mmol of trolox / kg sample. As inhibition of acetylcholinesterase by microwaves for dry samples, they threw an average inhibitory concentration of 34.1 µg/ mL

KEYWORDS: flavonoids, antioxidant, inhibition, acetylcholinesterase, peel, orange.

INTRODUCCIÓN

Durante muchos años en Colombia la inadecuada disposición de los residuos sólidos orgánicos se ha venido reflejando en el impacto ambiental ocasionado en las fuentes de agua, en las emisiones de gases de efecto invernadero y en la inutilización del suelo debido al proceso de lixiviación de los mismos. El relleno sanitario “El Carrasco” ubicado en la parte suroccidental de Bucaramanga, recibe aproximadamente 929,13 toneladas/día de residuos sólidos, provenientes del área metropolitana de esta ciudad y otros municipios aledaños, donde el 64 % proceden de residuos orgánicos con propiedades de biotransformación.^{2,7,8} Una forma diferente de reciclar estos residuos y mitigar la contaminación, es por medio del aprovechamiento de éstos, como frutas y vegetales, para la obtención de compuestos de valor agregado, tipo flavonoide.

Dentro de estos residuos se encuentra la naranja, una fruta muy común en los hogares, ya que hace parte de la dieta diaria de la mayoría de las personas por su alto contenido de vitamina C, y por sus propiedades biológicas demostradas, tales como: antimicrobianas, antioxidante, anticancerígena, antiinflamatorias, entre otras. En este sentido se han implementado investigaciones en las diferentes técnicas de extracción como la extracción con solventes y fluido súper crítico para la recuperación de metabolitos secundarios tipo polifenoles, flavonoides, los cuales poseen grandes propiedades benéficas para la salud.^{9, 10}

El objetivo de este trabajo, fue obtener compuestos de valor agregado tipo flavonoides a partir de cáscaras de naranja en estado fresco y seco, empleando diferentes métodos de extracción con solvente y evaluar la actividad antioxidante mediante la determinación del contenido de polifenoles y flavonoides totales y el ensayo del catión radical ABTS⁺. De igual manera, se realizaron ensayos analíticos para establecer la actividad inhibitoria *in vitro* de los extractos etanólicos de la cáscara de la naranja frente a la enzima acetilcolinesterasa.

1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE E INHIBICIÓN DE LA ACETILCOLINESTERASA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS OBTENIDOS DE CÁSCARAS DE NARANJA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La importancia del aprovechamiento de los residuos orgánicos ha llevado a que muchos países a nivel mundial, entre ellos Colombia, diseñen e implementen nuevas políticas con tendencia a la gestión integral de los residuos sólidos, como lo son el compostaje, reciclaje, alimentación animal entre otros. Los residuos orgánicos depositados en el relleno sanitario “El Carrasco” cuentan en su gran mayoría con propiedades de biotransformación que pueden ser en un futuro aplicadas en industrias como la cosmética, farmacéutica y alimentaria principalmente.^{2, 11} Por este motivo es importante el estudio de residuos de frutas cítricas, de los cuales se pueden obtener metabolitos secundarios como los polifenoles y los flavonoides, con los que se lograría la reducción de algunas afecciones de salud en las personas, así como también, aprovechados en las diferentes industrias que elaboran productos para el consumo humano, cosméticos y alimentos entre otros, ya que tienen un amplio espectro de propiedades biológicas.^{12, 13}

Durante mucho tiempo se han empleado los antioxidantes sintéticos para evitar el deterioro oxidativo, no obstante estas sustancias están cada vez más restringidas por sus efectos secundarios sobre la salud como la carcinogénesis y la hepatotoxicidad.^{14, 15} Dada esta situación, se ha impulsado la búsqueda de antioxidantes más seguros de origen natural y de ahí la importancia de desarrollar nuevos métodos para la evaluación de las propiedades antioxidantes de los cítricos.¹⁶

Otra aplicación de estos metabolitos secundarios, es lograr que estos inhiban la acción de la enzima acetilcolinesterasa, logrando de esta forma la disminución en la actividad de la enzima, para que de esta forma se aumente la concentración de acetilcolina, el cual es un compuesto neurotransmisor responsable de la transmisión sináptica de las neuronas, el aumento en la sinapsis produce una mejoría en los procesos cognitivos y los estímulos musculares, con lo que se logra un alivio en la calidad de vida de pacientes con enfermedades neurodegenerativas.^{11, 17}

La naranja, posee metabolitos secundarios, los cuales pueden ser aprovechados por sus propiedades de biotransformación. En Colombia es una de las frutas cítricas más comercializadas y por ende sus residuos son relativamente altos. Por este motivo se realizó este trabajo de grado, con el fin de proponer el aprovechamiento

de los residuos de la cáscara de la naranja como fuente de polifenoles y flavonoides como antioxidantes naturales e inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Las frutas cítricas son de una gran importancia económica, ya que crecen en la mayoría de los países, debido a su resistencia climática. En Colombia, la naranja es cultivada en 36943 hectáreas (ha) anualmente, debido a que es un producto demandable y apetecido en la industria alimentaria por sus múltiples usos y transformaciones, dentro de las que encontramos, zumos, pulpa, alimentos para animales, aromatizantes naturales, entre otros, y por ende la generación de sus residuos es alto.^{18, 19} Es así, que la cáscara de naranja, representa una oportunidad para la obtención de extractos que pueden ser ampliamente utilizados en industrias como la cosmética, alimenticia, farmacéutica, entre otras,¹⁷ Estos extractos son combinaciones de compuestos secundarios de las plantas, entre los que se tiene por ejemplo terpenos, compuesto polifenólicos y flavonoides principalmente.²⁰

En las cáscaras de naranja se encuentra presentes compuestos terpénicos, carotenoides, polifenoles y flavonoides, debido a esta variedad de compuestos bioactivos se han realizado investigaciones para caracterizarlos y conocer sus posibles actividades biológicas.²⁰ Múltiples estudios que se han realizado en las frutas cítricas han dado a conocer que por medio de los diferentes métodos de extracción de compuestos bioactivos que se han venido desarrollando se logran altos rendimientos de estos compuestos para la inclusión de los mismos en varios campos.

Investigaciones como las realizadas por Rosa Tundis y colaboradores (2012)²¹ determinaron la actividad antioxidante y la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa del jugo de tres especies cítricas tales como *C. aurantifolia*, *C. aurantium* y *C. bergamia*, los cuales son datos positivos en cuanto a las actividades que se estaban estudiando ya que se obtuvieron valores de 19,6 µg/ mL para la Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox y para la inhibición de la acetilcolinesterasa un valor de IC₅₀ 139,3 µg/mL.

Este trabajo de grado se planteó el estudio de las actividades biológicas antioxidante e inhibición *in vitro* de la enzima acetilcolinesterasa, de extractos etanólicos obtenidos de las cáscaras de naranja, con el fin de dar una alternativa de aprovechamiento de estos residuos para la obtención de compuestos de valor agregado con potencial uso en las industrias de alimentos, cosméticos, farmacéuticas, entre otras.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener los extractos etanólicos de los residuos de la cáscara de naranja empleando diferentes métodos de extracción y evaluar su posible actividad antioxidante e inhibición enzimática *in vitro* de la acetilcolinesterasa.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los extractos etanólicos de las cáscaras de naranja en estado fresco y seco empleando métodos como *Soxhlet*, extracción con solvente asistida por ultrasonido y extracción asistida por microondas.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos etanólicos obtenidos de las cáscaras de naranja por medio del contenido de polifenoles y flavonoides totales y la evaluación de la reactividad hacia el catión ABTS⁺.
- Determinar la actividad inhibitoria *in vitro* de los extractos etanólicos de cáscara de naranja sobre la enzima acetilcolinesterasa mediante metodología descrita por Ellman²².

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. MARCO TEÓRICO

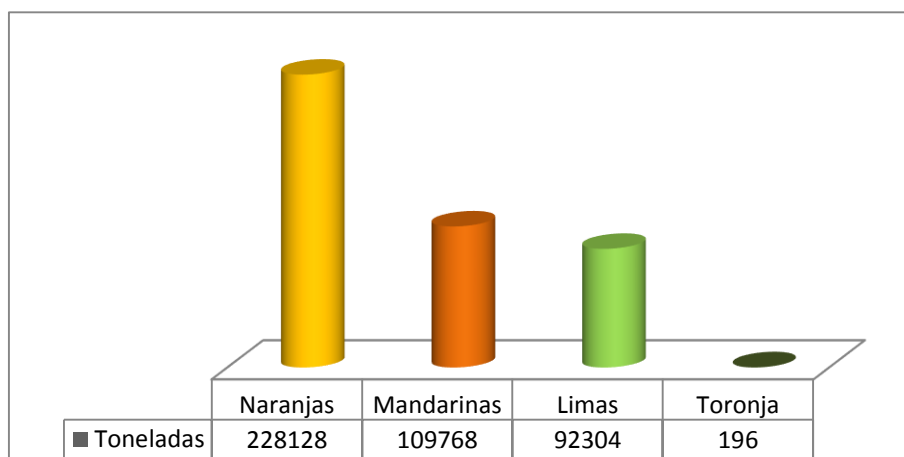
2.1.1. Generalidades de los frutos cítricos

Los cítricos son cultivos adaptables a diversas condiciones climáticas, lo que facilita su cultivo en cualquier país, principalmente se dan en regiones tropicales y subtropicales. Es uno de los cultivos permanentes con mayor producción en el mundo, se estima que esta es cercana a las 100 millones de toneladas cultivadas en el año. Los cultivos permanentes son aquellos que se siembran una vez y de los cuáles se pueden obtener varias cosechas.^{19, 23, 24}

Los cítricos pertenecen a la familia *Rutaceae*; del género *Citrus*. Las especies más cultivadas de frutas cítricas son: *Citrus aurantifolia* (lima ácida), *Citrus latifolia* (lima tahití), *Citrus grandis* (pummelo), *Citrus limon* (limón verdadero), *Citrus paradisi* (toronja o pomelo), *Citrus reticulata* (mandarina), *Citrus aurantium* (naranja amarga) y *Citrus sinensis* (naranja dulce).²³

Los frutos cítricos poseen propiedades medicinales entre las que se encuentran anticancerígena, antialérgicas, antiviral, antimicrobiana, antioxidante, entre otras; el creciente interés en sus propiedades biológicas se debe a que contienen compuestos de valor agregado como vitaminas, terpenos, flavonoides, saponinas, carotenoides, cumarinas, entre otros compuestos bioactivos que los vuelven atractivos en el estudio de opciones naturales que proporcionen procedimientos con bajos niveles tóxicos.²⁵ En la Figura 1 se relaciona la producción de cítricos en Colombia por toneladas cultivadas para el año 2010.

Figura 1. Producción de cítricos en Colombia año 2010²⁶



En Colombia la distribución de cultivos cítricos de acuerdo con la especie es la siguiente: la naranja aportando el 53%, frente a la mandarina que representa el 25%, limas 21% y toronja con un 1% aproximadamente. ²⁴

La naranja es una de las frutas cítricas más cultivadas a nivel mundial, incluye aproximadamente 1700 especies que pueden crecer en óptimas condiciones en climas cálidos y templados. ^{18, 23} En la Figura 2 se puede observar la estructura interna del fruto de la naranja, la pulpa de la cual se obtiene el jugo, el albedo o pectina y el flavedo que corresponde a la cáscara.

La naranja es una fruta cítrica que se le atribuyen diferentes propiedades biológicas, las cuales se derivan de los diferentes tipos de componentes presentes en ellos, los compuestos tipo flavonoides como la hesperidina, naringina y narirutina presentes en el jugo y la cáscara de la naranja poseen actividades biológicas como antioxidante, antimicótico, antibacteriano, antitumoral, anticancerígeno, antimutagénico. ^{27- 32}

Figura 2. Fruto de la Naranja. Familia Rutaceae Género *Citrus*



FUENTE: Autora

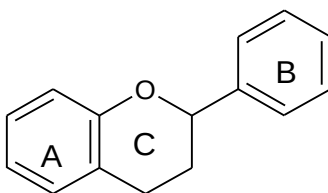
La naranja es utilizada principalmente para la producción de jugos, pulpas y zumos a nivel industrial y, consumo fresco, entre otros. Los principales países productores de naranja son: Brasil, Estados Unidos y China respectivamente.¹⁹ En Colombia para el año 2012 fueron producidas 514941 toneladas³³ de esta fruta cítrica.

2.1.2. Compuestos flavonoides

Los compuestos flavonoides son metabolitos secundarios presentes en la mayoría de las frutas, granos, verduras, y plantas en general, los cuales comprenden más de 9000 compuestos, dentro de las funciones de estos compuestos se encuentra relacionados el crecimiento de las plantas, su desarrollo y protección contra los rayos UV. Nuestro organismo no produce estos compuestos, por lo que deben obtenerse por medio de la alimentación.^{5,33,34}

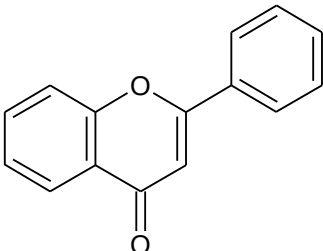
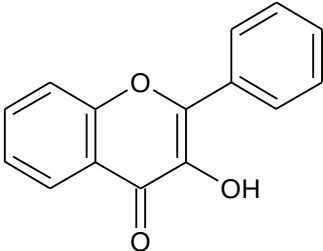
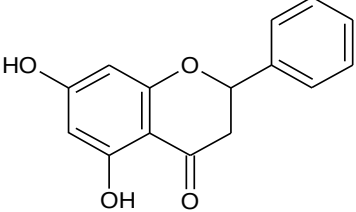
La estructura de los flavonoides presenta dos anillos fenilos, combinados por un anillo pirano (C), los cuales absorben los rayos ultravioleta proporcionando un espectro UV característico, que permite la identificación y cuantificación de los compuestos de interés. En la Figura 3 se presenta la estructura base de los flavonoides y se identifican cada uno de los anillos con las respectivas letras A y B.^{35, 36}

Figura 3. Estructura de los flavonoides.³⁵



Estudios *in vitro* e *in vivo* han reportado que los compuestos tipo flavonoides poseen actividades biológicas como antitrombótica, anticancerígena, antiterosclerótico, antioxidante, vasodilatador, entre otras.³⁷ Un resumen de los compuestos flavonoides más importantes y sus bioactividades se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Compuestos flavonoides más importantes presentes en algunas plantas de consumo humano.

Nombre	Estructura	Ejemplo de flavonoide	Fuente de obtención	Ejemplos de propiedades biológicas	Referencia
Flavona		Apigenina Rutina Luteolina	Vino rojo, pimienta roja.	Antioxidante Antiaterosclerótico Antitrombotico	38- 40
Flavonol		Quercetina Kaempferol	Brócoli, tomate, zanahoria, mora, té.	Antihipertensivo Vasodilatador Antiaterosclerótico	38- 40
Flavanona		Naringenina Hesperidina Narirutina Naringina	Naranja, limones, toronja, limas.	Antioxidante Antitumoral Antiviral Antiinflamatorio	27,38, 40

FUENTE: Autora

2.1.3. Métodos de obtención de compuestos flavonoides

Existen varios métodos de extracción de los compuestos flavonoides que ayudan a la identificación y al estudio de estos. En los más comunes tenemos los siguientes:

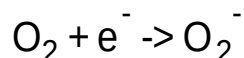
- **Extracción asistida con ultrasonido:** El material vegetal inmerso en el solvente es puesto a sonicación, la cual provoca la degradación de las paredes celulares, lo que permite la difusión del compuesto de interés en el solvente. Su principal ventaja son los cortos períodos de extracción los cuales varían entre 5 y 10 minutos. De igual forma en algunos casos no es necesario calentar la muestra, lo que disminuye el riesgo en la descomposición de la misma.^{27,38 41}
- **Extracción asistida con microondas:** Las ondas emitidas calientan el solvente en el que está inmerso el material vegetal y este calentamiento permite el rompimiento en las células de las plantas, liberando los compuestos de interés desde el interior de la planta al exterior (al disolvente). Tiempos cortos de extracción de entre 5 a 20 minutos es una de las ventajas de este método.⁴²⁻⁴³
- **Extracción Soxhlet:** Este método es utilizado para extraer compuestos de interés por medio de reflujo continuo arrastrando los analitos con el disolvente. Su ventaja primordial es que al encontrarse mayor tiempo en contacto con la muestra la cantidad de compuesto en el disolvente es mayor.⁵

2.1.4. Propiedades biológicas de los compuestos tipo flavonoide: actividad antioxidante y actividad inhibitoria *in vitro* de la enzima acetilcolinesterasa

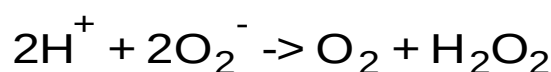
En la última década se han presentado con mayor frecuencia enfermedades producidas por estrés oxidativo tales como cáncer, enfermedades renales, cardiovasculares, Alzheimer, Parkinson, enfermedades cerebrales, que en la mayoría de las ocasiones se asocian al envejecimiento celular provocado por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas en el transporte electrónico mitocondrial en la reducción del O₂ para formar H₂O.^{16, 44}

Las ROS incluyen iones de oxígeno, peróxidos y a los radicales libres, los cuales son especies químicas reactivas con uno o dos electrones desapareados, esta inestabilidad libera energía a través de reacciones con moléculas próximas.^{45,46}

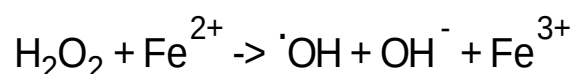
Uno de los ejemplos más conocidos es el radical superóxido O_2^- , es una de las principales ROS que se forma en el proceso electrónico mitocondrial.^{47,48}



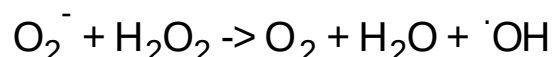
El radical superóxido reacciona con el O_2 en un sistema acuoso consigo mismo para formar O_2 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2):



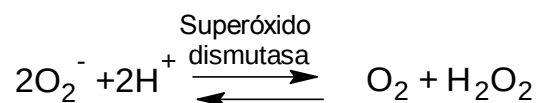
El radical hidroxilo $\cdot OH$ es uno de los oxidantes más potentes biológicamente, este se puede formar de la reacción con el H_2O_2 en presencia de metales de transición como el Fe^{2+}



De igual forma se puede formar el radical hidroxilo por la reacción del radical superóxido con el H_2O_2



Los antioxidantes son compuestos que inhiben la reacción de las moléculas con presencia de radicales libres, actuando como mecanismo de defensa para atacar las ROS. Las células de nuestro organismo evitan el daño oxidativo principalmente por medio de la enzima superóxido dismutasa, esta neutraliza en primera instancia los radicales superóxido catalizándola y produciendo peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.⁴⁷



El consumo de compuestos antioxidante por medio de la dieta, como por ejemplo las vitaminas C y E, y los compuestos tipo flavonoide benefician en la reducción del estrés oxidativo, ya que evitan la peroxidación lipídica de las membranas celulares.⁴⁹

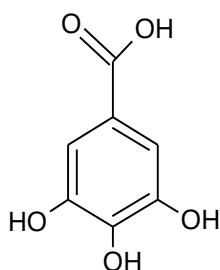
Actualmente la industria alimenticia emplea los compuestos sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT) y el butilhidroxianisol (BHA) como antioxidantes, con el fin de evitar el deterioro oxidativo de algunos de los productos alimenticios. Dentro de la estructura química de estos compuestos se encuentran presentes grupos fenólicos, a los cuales se les atribuye la actividad antioxidante ya que neutralizan los radicales libres generados por ROS.^{48, 49}

Sin embargo, se ha reportado que el BHT y BHA promueven la carcinogénesis en las células, lo que representa una problemática en la salud, lo cual ha motivado la búsqueda de compuestos antioxidantes naturales que minimicen el aumento de este tipo de afecciones.^{11, 50}

Existen varios métodos para determinar la capacidad antioxidante total de los compuestos, algunos de estos miden la captación de los radicales libres o la presencia de polifenoles y flavonoides totales contenidos en las muestras, aplicando los métodos colorimétricos de Folin- Ciocalteu y cloruro de aluminio respectivamente.

El método colorimétrico de Folin- Ciocalteu, aprovecha la capacidad de los fenoles con agentes oxidantes, ya que el reactivo Folin- Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, cuando estos reaccionan con un compuesto fenólico, forma complejos coloreados, debido a la transferencia electrónica a pH básico, se reducen estos complejos en óxidos, los cuales se aprecian con un color azul intenso, lo que indica la presencia de estos metabolitos secundarios debido a los grupos hidroxilos que estos presentan. Este método muestra su máximo de absorbancia a 765 nm. Los resultados en la determinación de esta actividad son presentados como equivalentes de ácido gálico (AG)/gramos de extracto (ver Figura 4).^{51, 52}

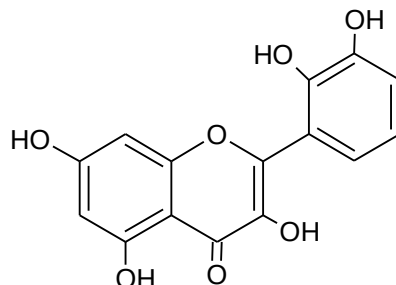
Figura 4. Estructura del ácido gálico (AG)



La determinación colorimétrica cuantitativa para los flavonoides totales, se basa en la relación entre el cloruro de aluminio y los compuestos flavonoides presentes en las muestras, creando un complejo coloreado tras la hidrólisis ácida de los glúcidos. Este método presenta su máximo de absorbancia a 415nm. Los resultados

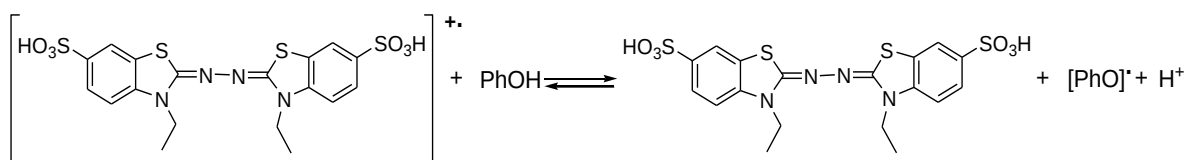
espectrofotométricos se presentan como equivalentes de quercetina /gramos de extracto (ver Figura 5).⁵³

Figura 5. Estructura de la quercetina



El método más utilizado para medir la captación de los radicales libres es el del catión radical ABTS^{•+} 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), el cual dona un electrón al estar en contacto con un antioxidante, pierde su color e indica la reducción del radical, su absorbancia puede ser medida en cualquiera de sus tres máximos de absorbancia, los cuales son 645 nm, 734 nm y 815 nm, es uno de los más comunes ya que este proporciona cortos tiempos de espera para conocer los resultados obtenidos.^{17, 46, 54} En la Figura 6 se muestra una reacción entre un antioxidante fenol y el catión- radical ABTS^{•+}.

Figura 6. Reacción de un antioxidante tipo fenol con ABTS^{•+}.^{54,55}



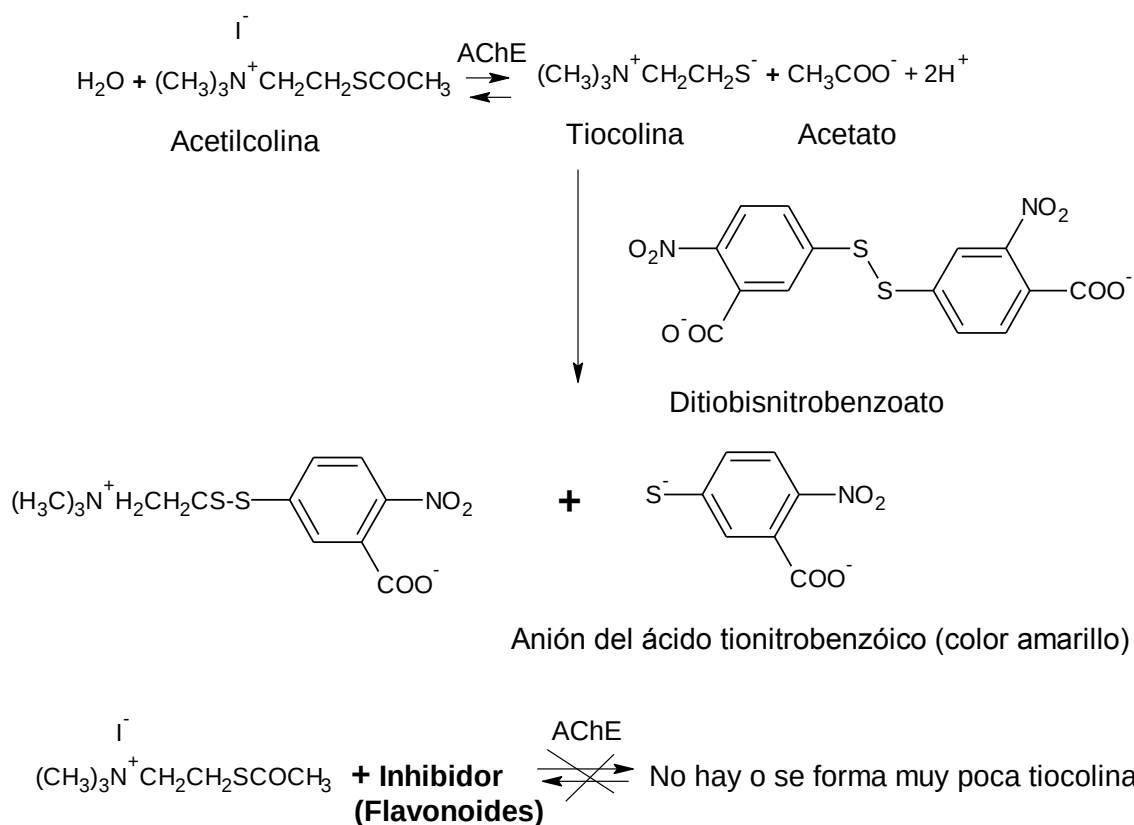
En el estudio de la actividad antioxidante de compuestos promisorios se han desarrollado otras metodologías para medir la actividad antioxidante por medio de la captación de los radicales libres, como por ejemplo: DPPH (1,1-difenil-2-picrilohidracilo),^{44, 46, 50} MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolio),⁵⁶ FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)^{50, 57}, DMPD (N,N-dimetilfenilendiamina)⁵⁰.

El estrés oxidativo causado principalmente por las especies reactivas de oxígeno se encuentra relacionado directamente con las enfermedades neurodegenerativas, se atribuye al aumento en la enzima acetilcolinesterasa (AChE), la cual se clasifica dentro del grupo de enzimas tipo colinesterasas, esta participa en la terminación de la sinapsis del efecto neurotransmisor de la acetilcolina (ACh) que se lleva a cabo en el sistema nervioso central SNC. La AChE hidroliza la ACh en acetato y colina.^{8, 58, 59}

La actividad antioxidante y la inhibición de la enzima AChE se encuentran relacionadas entre sí, ya que el daño celular causado por los radicales libres y el aumento de la enzima acetilcolinesterasa se asocian con el incremento en la probabilidad de generar enfermedades a nivel neuronal, por ende la importancia de indagar en antioxidantes e inhibidores provenientes de productos naturales que sean útiles como neuroprotectores.⁶⁰

La inhibición de la enzima AChE se logra manteniendo los niveles estables de ACh, ya que si no se logra la inhibición de esta enzima, puede presentarse en el organismo un incremento de las enfermedades cognitivas tales como Parkinson, Alzheimer, demencia, enfermedades cerebro vasculares, entre otras.⁴⁴ En la Figura 7 se representa las reacciones de inhibición de la acetilcolinesterasa del ensayo propuesto por Ellman²².

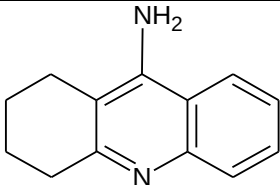
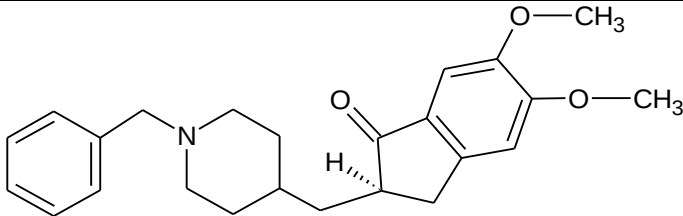
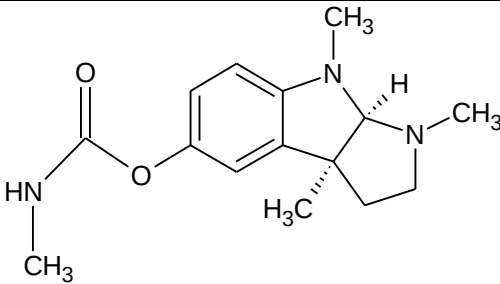
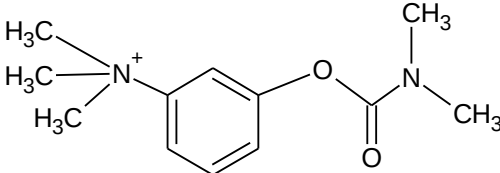
Figura 7. Reacción inhibición de la acetilcolinesterasa²²

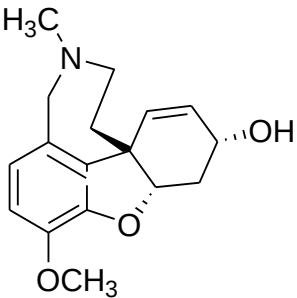
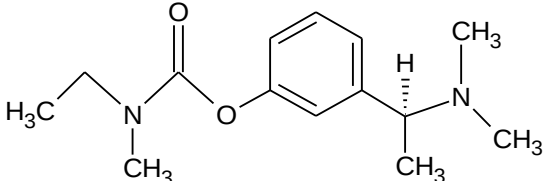


Experimentalmente la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa se determina con el aumento de color amarillo causado por tiocolina producto de la hidrólisis en la acetilcolina, la reacción del ion ditiobisnitrobenzoato forma el anión del ácido tiobisnitrobenzónico, al que se le atribuye el color amarillo en la reacción.²²

Algunos de los compuestos sintéticos inhibidores de la AChE, aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) se relacionan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Inhibidores de acetilcolinesterasa aprobados por la FDA para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas^{60, 61}

Compuesto	Estructura	Patología	Efectos secundarios
Tacrina		Enfermedad del Alzheimer	Lesión hepatocelular
Donepezilo		Enfermedad del Alzheimer	Aumento en la secreción ácido gástrica
Fisostigmina		Ataxias hereditarias Glaucoma Enfermedad del Alzheimer	Convulsiones, bradicardia, hypersalivación
Neostigmina		Miastenia grave	Crisis colinérgica, inquietud, agitación, convulsiones, puede producir muerte por paro cardíaco o respiratorio

Galantamina		Enfermedad del Alzheimer Demencia vascular Autismo Esquizofrenia Síndrome anticolinérgico	Nauseas, cefaleas, depresión, pérdida de peso, bradicardia, incontinencia
Rivastigmina		Enfermedad del Alzheimer	Cefalea, depresión, agitación, pánico.

2.2. MARCO DE ANTECEDENTES

Los extractos naturales de varios géneros de cítricos han sido estudiados para determinar sus posibles actividades biológicas, como por ejemplo la actividad antioxidante e inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. A continuación se presentan algunas de las muchas investigaciones que se han presentado con el paso del tiempo en la investigación de productos naturales.

Kelly H. y colaboradores (2002) estudiaron los compuestos flavonoides presentes en alimentos relacionando su estructura química con la actividad antioxidante. Determinaron el valor TEAC para naringina y naringenina presentes en la cáscara de la naranja con valores de 0,24 y 1,53 respectivamente⁶².

Lourdes M. y colaboradores, en el 2007 evaluaron los compuestos flavonoides presentes en frutas cítricas tales como *C paradisi*, *C aurantium*, *C sinensis*, *C reticulata*, determinando el contenido de rutina (326,59 mg / 100 g), naringina (338,36 mg / 100 g), quercetina (96,35 mg / 100 g) y la naringenina (2,35 mg / 100 g). También establecieron la concentración de polifenoles totales presentes en los extractos de las cáscaras de estas frutas mediante el método de Folin Ciocalteu con un valor de 3524 mg de ácido gálico/100g de extracto. ⁶³

Thitima, K. (2009) estudiaron los extractos de los residuos de la Lima obtenidos de muestras secas tratadas entre los 60 y 120 °C, comparando los resultados de polifenoles y su actividad antioxidante. Los mejores resultados se reportaron para las muestras tratadas a los 60°C. El contenido de polifenoles totales fue de 0,811 g ácido gálico/ 100g , en cuanto la determinación de la actividad actioxidante medida por el método DPPH fue de 93,9%. ⁶⁴

Khizar, H. y sus colaboradores en el 2010, estudiaron la cáscara de la mandarina y reportaron que el empleo de altos valores de potencia en la extracción asistida con radiación de microondas favorece de manera directa la obtención de compuestos fenólicos responsables de la actividad antioxidante .⁶⁵

Hegazy, A., e Ibrahim, M. (2012) investigaron el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de la cáscara de naranja empleando diferentes disolventes tales como metanol, etanol, acetona, diclorometano, hexano y acetato de etilo. Los extractos obtenidos con etanol mostraron los mejores rendimientos, seguidos de los extractos metanólicos. ⁶⁶

En el 2012, Tundis, R. y colaboradores determinaron la actividad antioxidante por medio del método ABTS y la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, del aceite esencial de las cáscaras de tres especies cítricas: *C aurantifolia*, *C aurantium*, *C bergamia*. La *C aurantifolia* presentó los mejores valores de actividad antioxidante (TEAC de 19,6 µg/mL) y la inhibición de la acetilcolinesterasa mostró un valor de IC₅₀ 139,3 µg/mL. Se atribuyó este comportamiento a los terpenos presentes en las muestras. ²¹

En el 2012, Rudge de Moraes, H y colaboradores determinaron el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante de las pulpas y las cáscaras de cuatro especies de cítricos como *C sinensis*, *C latifolia*, *C limettoides* y *C reticulata*. Los valores más altos para la actividad antioxidante se encontró para los extractos obtenidos de la pulpa de la *C reticulata*, relacionado con una alta concentración de compuestos polifenoles. ⁶⁷

Moulehi I. (2012) reportó la presencia de hesperidina, naringina, neohesperidina y ácido gálico en la composición química de los extractos obtenidos de los cítricos *C aurantium* y *C reticulata*. En cuanto a la actividad antioxidante de estas especies la *C aurantium* presentó un valor de 188,67 µg/mL frente a un valor de 210 µg/mL presentes en *C reticulata*. ⁶⁸

Asikin Y. y colaboradores en el año 2012, determinaron el contenido de polifenoles totales presentes en los extractos de la cáscara de *Citrus depressa* Hayata, obteniéndose un valor de 225,4 mg ácido gálico/100g (2,254 mg ácido gálico/ g). ⁶⁹

Luengo y colaboradores en el 2013 aplicaron pulsaciones eléctricas a cáscaras de naranja para la extracción de compuestos fenólicos totales. En la determinación del contenido de estos se empleó la metodología de Folin Ciocalteu obteniendo un valor de 34,80 mg ácido gálico/ 100g muestra fresca (0,348 mg ácido gálico/ g). ⁷⁰

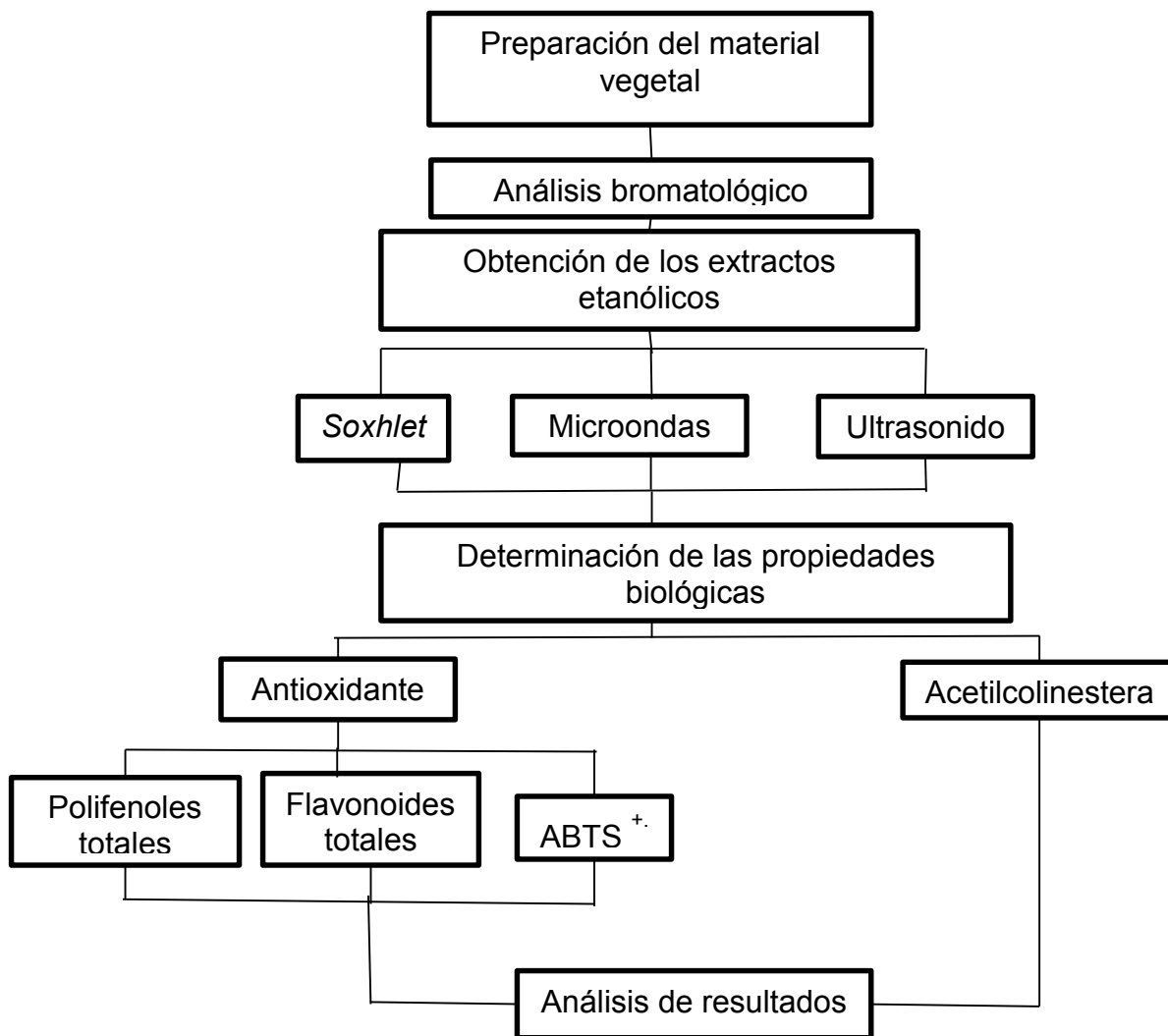
3. DISEÑO METODOLÓGICO

Este proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales de la facultad de Química Ambiental de la Universidad Santo Tomás, Seccional Bucaramanga, *Campus* Floridablanca.

3.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología experimental desarrollada en el presente trabajo se presenta a continuación. En la Figura 8, se resume la metodología propuesta en este proyecto.

Figura 8. Metodología



FUENTE: Autora

3.1.1. Obtención y tratamiento del material vegetal

Equipos e instrumentos: Los equipos que se utilizaron fueron: balanza analítica (Pioneer TM Ohaus), licuadora de 16 velocidades (Oster), desecador (Scienceware), horno (Gemmy 888).

Para el desarrollo de este trabajo, se emplearon los residuos de la cáscara de naranja recolectadas en una frutería ubicada en la ciudad de Bucaramanga, Santander.

La selección del material vegetal se realizó considerando que las cáscaras no se encontraran con signos de descomposición o que estuvieran afectadas por la presencia de hongos o algún otro organismo vivo.

Para la preparación de las muestras frescas, se les retiraron los residuos de fruta que tenían y pectina presentes en la cáscara, posteriormente, se cortaron en trozos pequeños y se procedió a realizar la extracción para cada uno de los métodos propuestos para la obtención de los extractos etanólicos. En la Figura 9, se ilustra el tratamiento de la cáscara de naranja.

Figura 9. Preparación del material vegetal



FUENTE: Autora

En el caso de la muestra seca, el material vegetal fue secado a 60°C en un horno hasta peso constante de las muestras (aproximadamente por 24 horas). Posteriormente la muestra se trituró en una licuadora (Oster de 16 velocidades), con el fin de aumentar el área de contacto del material vegetal al momento de la

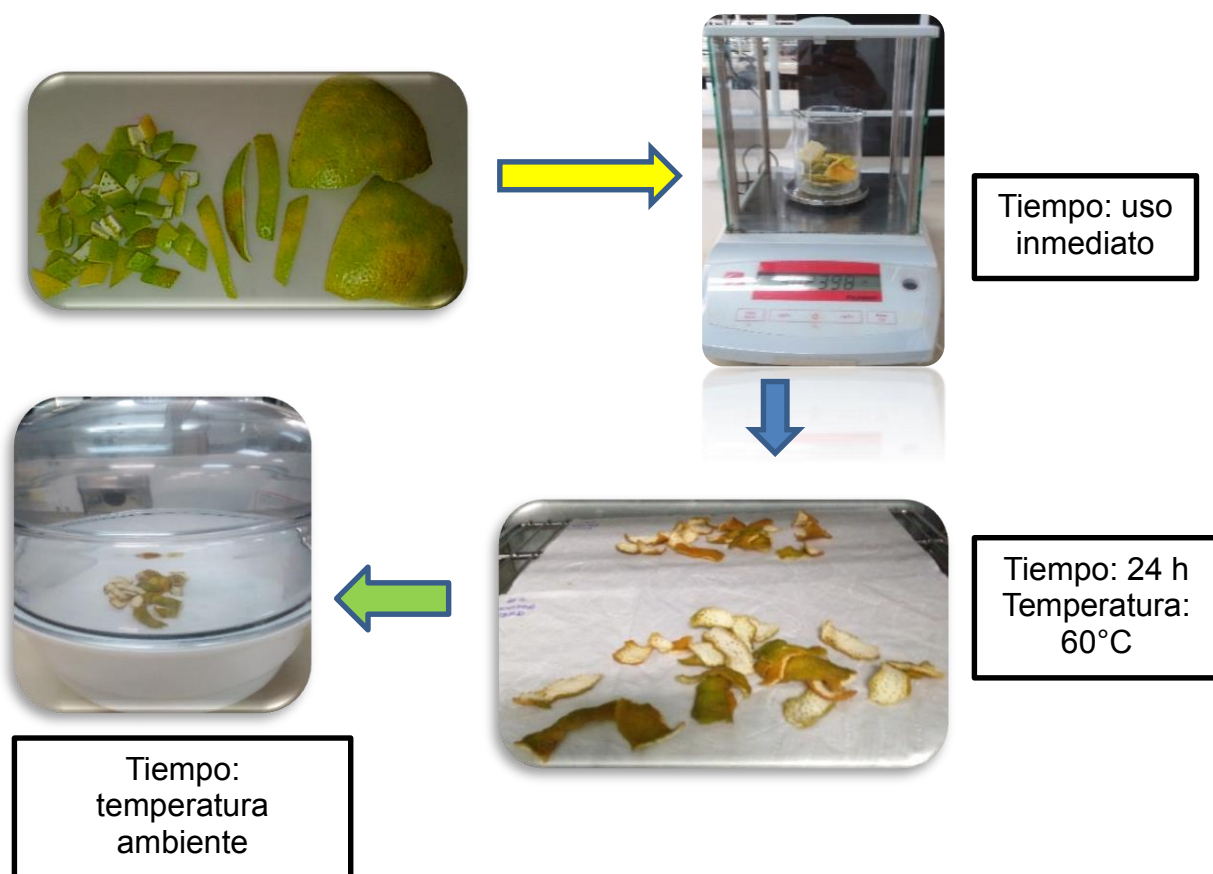
extracción. Las muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas, teniendo precaución de sellarlas con la mínima cantidad de aire.

3.1.2. Determinación del porcentaje de humedad relativa del material vegetal

Equipos e instrumentos: balanza analítica (Pioneer TM Ohaus), horno (Gemmy 888), licuadora de 16 velocidades (Oster), desecador (*Scienceware*).

Para la determinación del porcentaje de humedad relativa de las cáscaras de naranja se empleó el método gravimétrico (diferencia de pesos). Se pesó el material vegetal en estado fresco con la ayuda de una balanza analítica (Pioneer TM *Ohaus*), luego el material vegetal fue secado en un horno a una temperatura de 60°C hasta peso constante. Una vez completado el proceso de secado, el material se dejó enfriar a temperatura ambiente en un recipiente desecador (*Scienceware*) y nuevamente pesado. El proceso se realizó por triplicado. En la Figura 10, se ilustra el proceso que se siguió.

Figura 10. Preparación de la muestra para la determinación del porcentaje de humedad relativa



FUENTE: Autora

La determinación del porcentaje (%) de humedad relativa en el material vegetal se da por método gravimétrico, teniendo en cuenta para los cálculos la Ecuación 1:

$$\text{Ecuación 1 } \% H.R = \frac{\text{peso de la muestra húmeda} - \text{peso de la muestra seca}}{\text{peso de la muestra húmeda}} * 100$$

Nota: H.R: humedad relativa

3.1.3. Análisis Bromatológico de las cáscaras de naranja

Debido a que en el presente estudio se empleó como material vegetal, los residuos las cáscaras de diferentes especies de frutos de naranja, se realizó el análisis bromatológico para establecer la composición nutricional de los mismos.

Los parámetros evaluados en este ensayo fueron: cenizas, humedad, grasa, fibra, proteínas, carbohidratos totales y valor calórico, para las muestras en estado fresco.

Este análisis se llevó a cabo bajo la modalidad de prestación de servicios en el Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) de la Universidad Industrial de Santander (UIS).

3.1.4. Obtención de los extractos

Equipos e instrumentos: equipo *Soxhlet* 250 mL con 4 puestos acoplado a una manta de calentamiento (E&Q), equipo de ultrasonido (Ultrasonik TM 57K), equipo de destilación 2000 mL acoplado a horno microondas (LG) 2 condensadores (en rosario y espiral) y trampa Dean Stark, rotoevaporador acoplado a una bomba de vacío (IKA- RV10 control).

Disolventes y reactivos: etanol comercial al 96% de Arquilab.

Para la obtención de los extractos a partir de los residuos de las cáscaras de naranja, en estado fresco y seco, se emplearon tres métodos de extracción, los cuales fueron: extracción sólido- líquido por *Soxhlet*, extracción sólido- líquido asistida por ultrasonido (EAU) y la extracción sólido- líquido asistida por microondas (EAM). En todos los casos se empleó etanol comercial al 96%, como solvente de extracción. Se obtuvieron triplicados para cada uno de los métodos de extracción evaluados.

La diferencia principal entre los tres métodos, son sus tiempos de extracción.

En el Cuadro 3, se presentan las condiciones experimentales empleadas para la obtención de los extractos.

Cuadro 3. Condiciones de extracción para cada método empleado

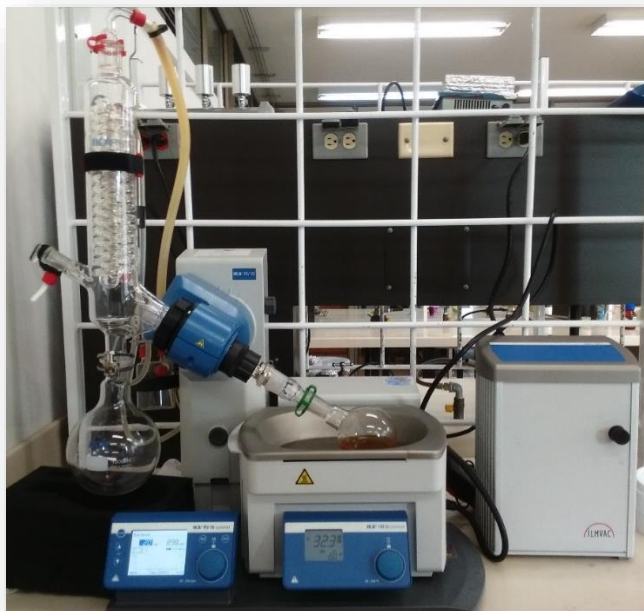
Método	Condiciones	Equipo
Extracción sólido-líquido con equipo <i>Soxhlet</i>	Temperatura: 70 °C Tiempo de extracción: 12 horas Calentamiento: si Cantidad de muestra: 30 g	
Extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido (EAU)	Temperatura: 70 °C Tiempo de extracción: 2 horas Calentamiento: si Cantidad de muestra: 30 g	

Extracción sólido-líquido asistida por microondas (EAM)	Potencia: 700 W Tiempo de extracción: 9 minutos Calentamiento: si Cantidad de muestra: 100 g	
---	---	---

FUENTE: Autora

Una vez obtenido los extractos fueron filtrados por gravedad y se concentraron empleando un equipo rotoevaporador acoplado a una bomba de vacío (IKA- RV10 control) como se presenta en la Figura 11. Los desechos de los extractos fueron descartados según la clasificación de residuos del Laboratorio de Investigaciones Ambientales.

Figura 11. Equipo de rotoevaporación disponible en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales de la Universidad Santo Tomás – Bucaramanga.



FUENTE: Autora

Para cada uno de los métodos de obtención en los extractos etanólicos se determinó el rendimiento de la extracción con la Ecuación 2:

$$\text{Ecuación 2} \quad \%Rendimiento = \frac{\text{Peso del extracto seco}}{\text{Peso de la muestra}} * 100$$

3.1.5. Determinación del contenido de polifenoles totales

Equipos e instrumentos: espectrofotómetro UV- Vis (Agilent 8453).

Disolventes y reactivos: ácido gálico (Carlo Erba), etanol analítico (Merck), Reactivo de Folin- Ciocalteu (Panreac), carbonato de sodio (Merck).

En la determinación de polifenoles totales se siguió el protocolo descrito por Özcan en el 2006,⁶³ el cual se presenta a continuación:

Preparación del patrón de ácido gálico: se preparó un patrón de ácido gálico a una concentración de 5000 ppm. Se refrigeró la solución hasta el momento de uso,

teniendo en cuenta que su duración no excediera un período de dos semanas desde el momento de preparación. Seguido a esto se preparó el carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 10% (P/V).

Preparación de la curva de calibración y los extractos etanólicos: En tubos de ensayos fueron agregados 20 μL del extracto etanólico de la cáscara de naranja, seguido a esto se adiciono una alícuota de 6,5 mL de agua desionizada y 500 μL del reactivo Folin- Ciocalteu (Panreac). Fue homogenizada la mezcla, seguido a esto se dejó reposar a temperatura ambiente por un periodo de 8 minutos, posteriormente se adicionaron 3 mL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 10% (P/V) y se llevaron los tubos de ensayo en baño de agua a 40°C por un tiempo de 30 minutos (con agitación manual). Transcurrido este tiempo fueron leídas las absorbancias del blanco de los reactivos y los extractos etanólicos a una longitud de onda de 765 nm (máximo de absorbancia en la determinación de los compuestos polifenólicos) por medio del espectrofotómetro UV- Vis (Agilent 8453), (Figura 12). Se usaron soluciones de ácido gálico (Carlo Erba) entre 50 y 500 mg/L (ppm), para la construcción de la curva de calibración. Los resultados se expresan como mg ácido gálico/ g extracto seco (gramo de extracto seco es el obtenido después de la rotoevaporación del disolvente).

Este procedimiento se efectuó con cada una de las muestras de estudio por sextuplicado, los valores presentados corresponden a la media $\pm$ desviación estándar.

Nota: la alícuota fue tomada de la dilución que se hizo del extracto a 1 mL, y esta fue llevada a un volumen final de 10 mL.

3.1.6. Determinación del contenido de flavonoides totales:

Equipos e instrumentos: espectrofotómetro UV- Vis (Agilent 8453).

Disolventes y reactivos: quercetina (MP biomedical), etanol analítico (Merck), acetato de potasio (Panreac), cloruro de aluminio (Merck).

En la determinación de flavonoides totales se siguió el protocolo descrito por Chang y colaboradores en el 2002,⁷¹ el cual se detallará a continuación:

Preparación del patrón de quercetina: se preparó un patrón de quercetina a una concentración de 1000 ppm, fue refrigerada hasta su uso. Seguido a esto se prepararon las soluciones de cloruro de aluminio (AlCl_3) (Merck) al 10% (P/V) y acetato de potasio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$) 1M (Merck).

Preparación de la curva de calibración y los extractos etanólicos: fueron adicionados en tubos de ensayo 500 µL de cada uno de los extractos etanólicos, se adicionaron seguido a esto 1,5 mL de etanol al 95%, posteriormente se añadieron 100 µL de cloruro de aluminio (AlCl_3) 10% y 100 µL de acetato de potasio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$) 1M, se agito la mezcla con ayuda de vortex y seguido a esto se agregaron 2,8 mL de agua desionizada. Fueron conservados los tubos de ensayo por un tiempo de 30 minutos. Terminado este tiempo se leyeron las absorbancias del blanco de reactivos y los extractos etanólicos a una longitud de onda de 415 nm (máximo de absorbancia para la determinación de compuestos flavonoides) por medio del espectrofotómetro UV- Vis (Agilent 8453, Figura 12). Se usaron soluciones de quercetina (MP Biomedicals) entre 20 y 100 mg/L (ppm), para la construcción de la curva de calibración. Los resultados se expresan como mg quercetina/ g extracto seco (gramo de extracto seco es el obtenido después de la rotoevaporación del disolvente).

Este procedimiento se efectuó con cada una de las muestras de estudio por sextuplicado, los valores presentados corresponden a la media $\pm$ desviación estándar.

Nota: la alícuota fue tomada de la dilución que se hizo del extracto a 1 mL, y esta fue llevada a un volumen final de 5 mL.

Figura 12. Equipo espectrofotómetro UV- Vis disponible en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales de la Universidad Santo Tomás

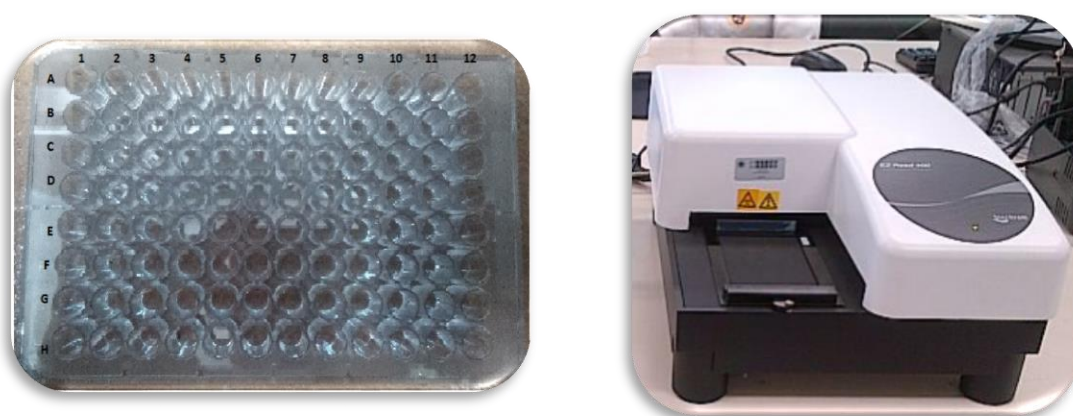


FUENTE: Autora

3.2. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

Se evaluó la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de la cáscara de naranja por medio del método de catión radical $ABTS^{+}$, como también la inhibición *in vitro* frente a la enzima acetilcolinesterasa. Estos ensayos se realizaron en placas de microdilución de 96 pozos y leídas en un lector de microplacas (EZ read 400- Biochrom), como se ilustran en la Figura 13.

Figura 13. Placa de microdiluciones de 96 pocillos y equipo lector de microplacas disponible en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales de la Universidad Santo Tomás



FUENTE: Autora

3.2.1. Determinación de la actividad antioxidante por medio del método de catión radical $ABTS^{+}$:

Equipos e instrumentos: lector de microplacas (EZ read 400- Biochrom).

Disolventes y reactivos: persulfato de potasio (Alfa Aesar), Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Sigma Aldrich), Butilhidroxitolueno (BHT) (Merck), Butilhidroxianisol (BHA) (Sigma Aldrich), α - tocoferol (Vitamina E) (Sigma Aldrich), Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Sigma Aldrich)

Las pruebas de la actividad antioxidante se realizaron de acuerdo con el método descrito por Re y colaboradores en 1999,⁵⁵ con las modificaciones propuestas por Muñoz y colaboradores en el 2010⁷² y adaptadas a las condiciones del laboratorio, la metodología será detallada a continuación:

Para la preparación del catión radical $ABTS^{+}$, se pesaron 3,3 mg de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) (Alfa aesar) y entre 13- 14 mg de ABTS, fueron disueltos en un

balón aforado de 5 mL con agua destilada. La solución se dejó reaccionar durante 16 horas a la temperatura ambiente del laboratorio (15- 22°C), y en ausencia de luz. Fue tomada una alícuota del catión radical ABTS⁺, fue diluida en etanol hasta obtener una absorbancia cercana a 0,750 nm.

Fue preparado el patrón de Trolox a una concentración de 1×10^{-3} M. De los compuestos de referencia como BHA, BHT, Vitamina E, naringina, naringenina (Cuadro 4) y los extractos etanólicos, se tomaron concentraciones entre 160 a 5000 ppm, las cuales se diluyeron de forma seriada en microplacas de 96 pocillos, fueron sembradas alícuotas de 20 µL, seguido a esto se adicionaron 200 µL del catión ABTS⁺. Las mediciones de las absorbancias se realizaron en un lector de microplaca a una longitud de onda de 734 nm (máximo de absorbancia en la cuantificación del catión radical ABTS⁺), leyéndose 30 minutos después de la mezcla inicial. La respuesta- concentración de las sustancias, como porcentaje de la absorbancia del catión radical ABTS⁺ sin inhibir se calculó de acuerdo con la Ecuación 3:

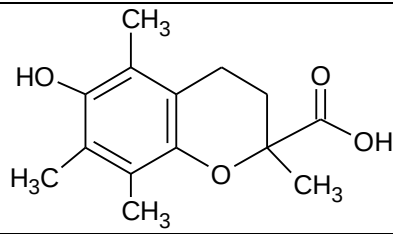
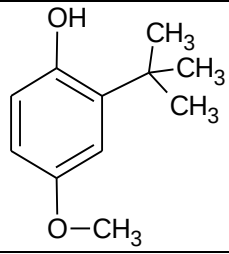
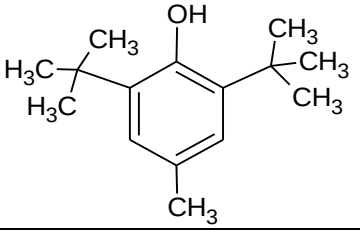
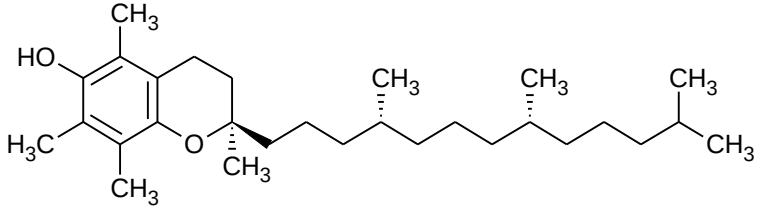
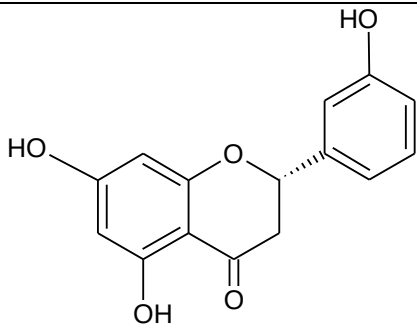
$$\text{Ecuación 3} \quad \%InhA_{734}: \left(\frac{\text{Promedio AB} - \text{AM min 30}}{\text{Promedio AB}} \right) * 100$$

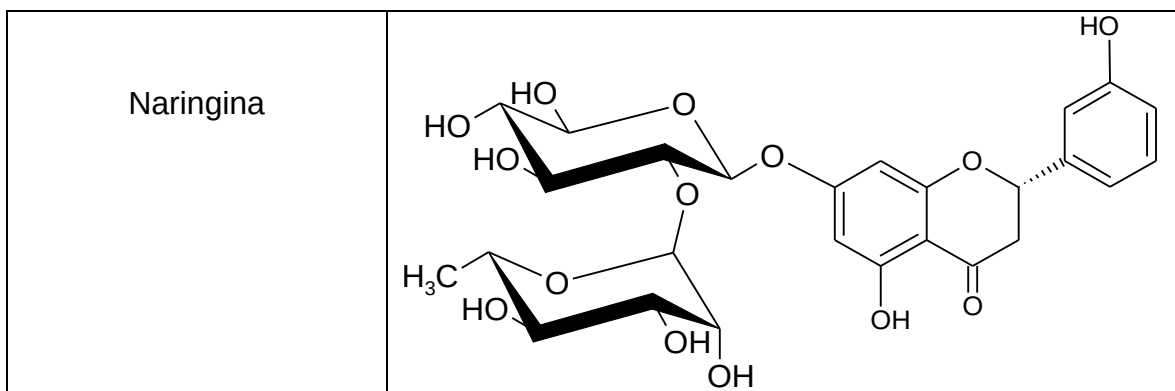
Donde:

AB: Absorbancia del blanco

AM: Absorbancia de la muestra

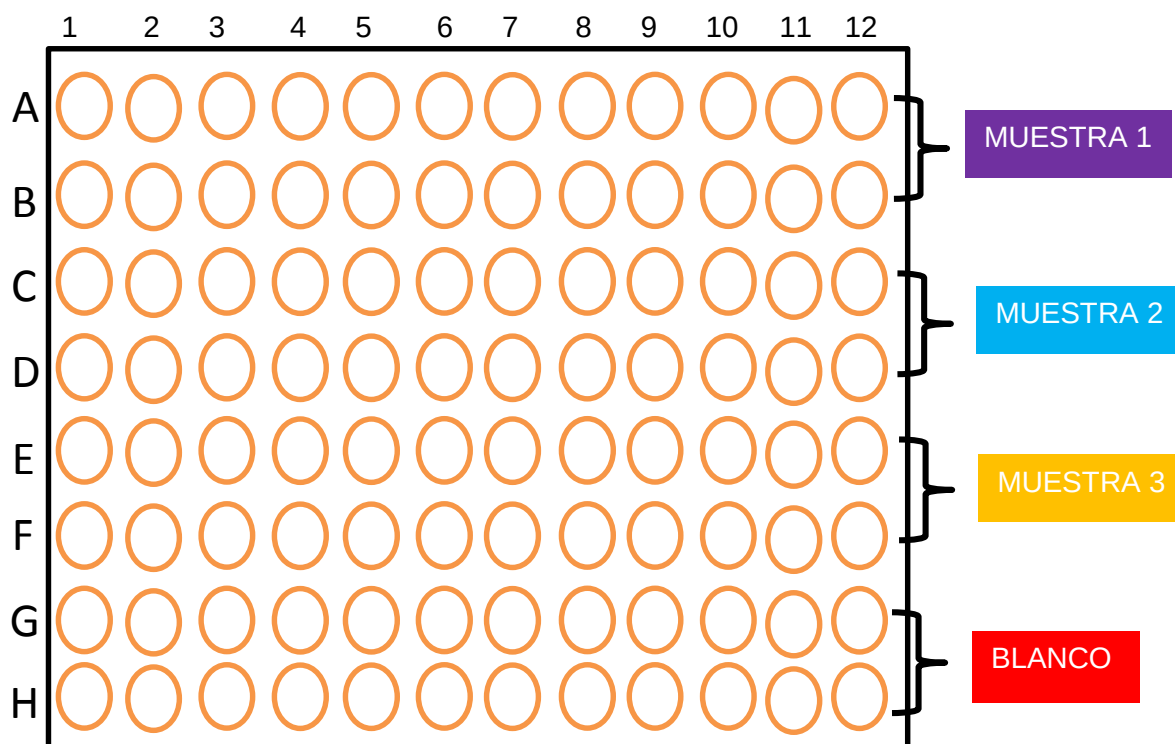
Cuadro 4. Compuestos de referencia para la actividad antioxidante

Compuesto	Estructura
Trolox	
Butilhidroxianisol (BHA)	
Butilhidroxitolueno (BHT)	
α -tocoferol (Vitamina E)	
Naringenina	



En la Figura 14, se representa el diseño de una microplaca que se empleó en la determinación de la actividad antioxidante de los compuestos de referencia y los extractos etanólicos de la cáscara de naranja.

Figura 14. Diseño metodológico en placa de 96 pocillos en la determinación de la actividad antioxidante



FUENTE: Autora

3.2.2. Ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa

Equipos e instrumentos: lector de microplacas (EZ read 400- Biochrom).

Disolventes y reactivos: enzima acetilcolinesterasa extraída del órgano eléctrico del pez *Electrophorus electricus* (Sigma Aldrich), galantamina (Alfa Aesar), yoduro de acetiltiocolina (Sigma Aldrich), dimetilsulfoxido (DMSO) (Merck), Hidrógeno fosfato de potasio (K_2HPO_4) (Panreac), Hidrógeno fosfato de sodio (NaH_2PO_4) (Alfa Aesar), Cloruro de sodio (NaCl) (J.T. Baker), Tween 20 (Sigma Aldrich).

Se siguió la metodología descrita por Ellman y colaboradores en el año 1961.²²

El ensayo fue realizado en microplacas de 96 pocillos con un volumen final de 200 μ L. Se colocaron 50 μ L de una solución del compuesto de referencia galantamina, Vitamina E, naringina y naringenina (concentraciones de 1×10^{-3}) y los extractos a probar (en concentraciones de 1000 μ g/mL (ppm), disuelto en buffer fosfato salino de pH 7,5, y 50 μ L de la enzima acetilcolinesterasa (0,25 U/mL). La placa se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos y se adicionaron 100 μ L de la solución sustrato con pH 7,5 [Na_2HPO_4 0,04 M, ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoico 0,2 mM, yoduro de acetiltiocolina 0,24 mM]. A los cinco minutos de la iniciada en la reacción se leyó la absorbancia, a 412 nm (máximo de absorbancia en la cuantificación de la inhibición de la AChE), en un lector de microplacas (EZ read 400- Biochrom). Los ensayos se realizaron por triplicado. El porcentaje de inhibición fue calculado con la Ecuación 4:

$$\text{Ecuación 4 } \% \text{ Inhibición } A_{412} = 100 - \left(\frac{AM - AB}{Prom AC - AB} \right) * 100$$

Donde:

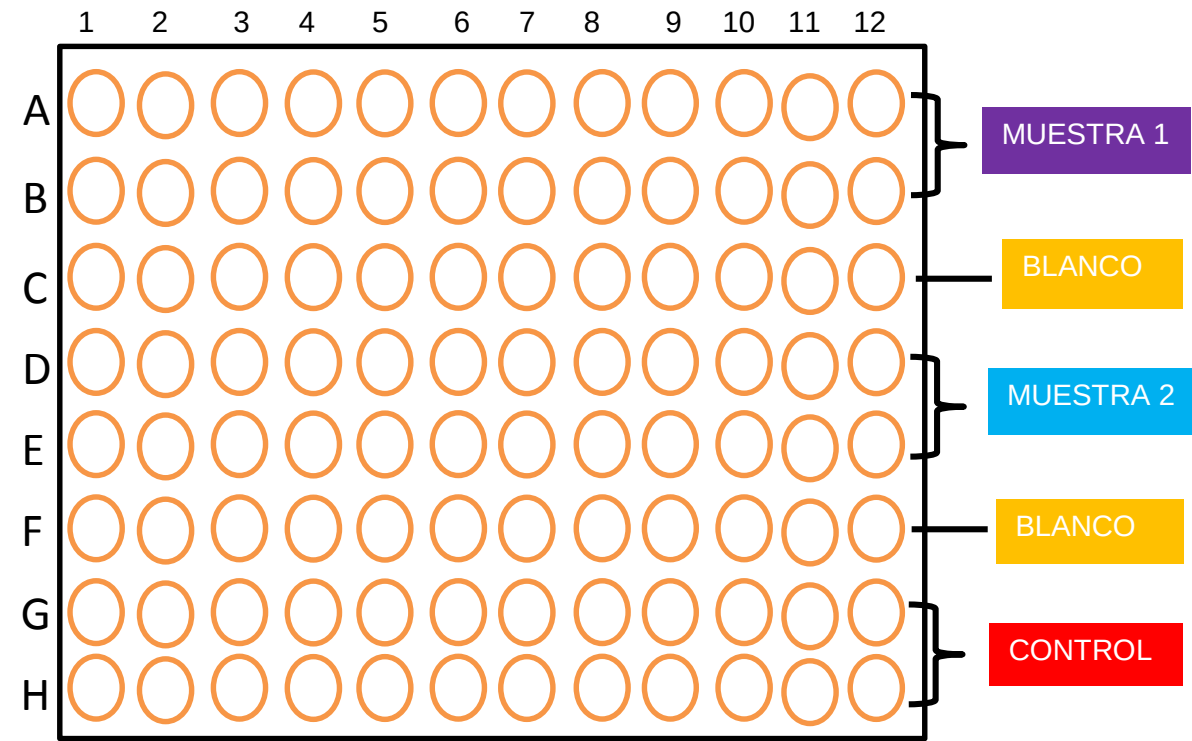
AB: Absorbancia del blanco

AM: Absorbancia de la muestra

AC: Absorbancia del control

En la Figura 15 se representa el diseño en una microplaca a seguir en la determinación *in vitro* de la inhibición de la enzima AChE de los compuestos de referencia y los extractos etanólicos de la cáscara de naranja.

Figura 15. Diseño metodológico en placa de 96 pocillos en la determinación *in vitro* en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa



FUENTE: Autora

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el desarrollo de este numeral se presentan los resultados obtenidos en este trabajo de grado con sus respectivos análisis.

4.1. Determinación del porcentaje de humedad relativa del material vegetal

Al finalizar la adecuación del material vegetal se procedió a la determinación del porcentaje de humedad presente en las muestras, fueron tomadas tres muestras representativas independientes, antes de realizar las extracciones por los diferentes métodos, los resultados del procedimiento experimental para determinar la humedad relativa de las cáscaras de naranja se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Humedad relativa de las cáscaras

# Muestra	Peso de la muestra húmeda (g)	Peso de la muestra seco (g)	% Humedad de la muestra	Desviación estándar ($\pm$)
1	30,2396	8,8102	70,9	0,06
2	30,2213	8,8099	70,8	
3	30,2390	8,8101	70,9	

Es importante determinar la humedad en las muestras, ya que la humedad presente en las cáscaras de naranja fue del 71%, esto hace que la penetración del disolvente con la muestra sea difícil, lo que no ocurre con las muestras en estado seco, ya que estas al no tener humedad y al estar trituradas en trozos más pequeños que las muestras frescas, tienen mayor contacto con el disolvente generando mayor arrastre de los compuestos de interés hacia el disolvente. Existen reportes en la literatura sobre la influencia del estado de la muestra con el rendimiento en los procesos de extracción. ^{73, 74}

La humedad en las muestras fue determinada en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales de la Universidad Santo Tomás.

4.2. Caracterización del material vegetal

Fue realizado un análisis bromatológico en el laboratorio de alimentos CICTA de la UIS, con el fin de caracterizar el valor nutricional presente en las cáscaras de naranja en estado fresco, ya que las muestras a analizar son residuos de la cáscara

de naranja y no son especies específicas de esta fruta cítrica. Los resultados obtenidos se presentan la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados del análisis bromatológico de las cáscaras de naranja

Parámetro	Unidad	Resultado
Humedad	g/100 g mtra	75,5
Ceniza	g/100 g mtra	1,2
Grasa	g/100 g mtra	0,2
Proteína	g/100 g mtra	1,4
Fibra	g/100 g mtra	3,8
Carbohidratos totales	g/100 g mtra	21,7
Valor calórico	Kcal/100 g mtra	94,4

Nota: mtra: muestra

Inicialmente la caracterización realizada a las cáscaras de naranja determina que el agua, relacionada directamente con la humedad relativa, es el componente mayoritario en la muestra, seguido de carbohidratos totales, fibra, proteína, ceniza y grasa.

Al comparar los datos suministrados por el CICTA, sobre la humedad en las cáscaras de naranja, con los hallados en el Laboratorio de Investigaciones de la USTA, estos difieren entre sí con un error del 7%, ya que, al tratarse de residuos no se puede tener la certeza sobre la composición de las muestras y debido a que la muestra analizada fue independiente de las muestras utilizadas en el proceso de determinación de la humedad realizado en la USTA. En el Anexo A se encuentra el informe completo sobre este estudio con los métodos empleados para la realización de este análisis.

Comparando las metodologías se puede decir que el procedimiento realizado en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales de la Universidad Santo Tomás fue adecuado comparándolo con el CICTA el cual es un procedimiento certificado.

4.3. Obtención de los extractos etanólicos de la cáscara de naranja

Los extractos etanólicos de la cáscara de naranja fueron realizados utilizando como disolvente etanol comercial, se realizaron por medio de tres diferentes métodos tales como extracción sólido- líquido por medio de equipo *Soxhlet*, extracción sólido- líquido asistida por ultrasonido (EAU) y extracción sólido- líquido asistida con microondas (EAM), siguiendo las condiciones descritas en el numeral 3.1.4.

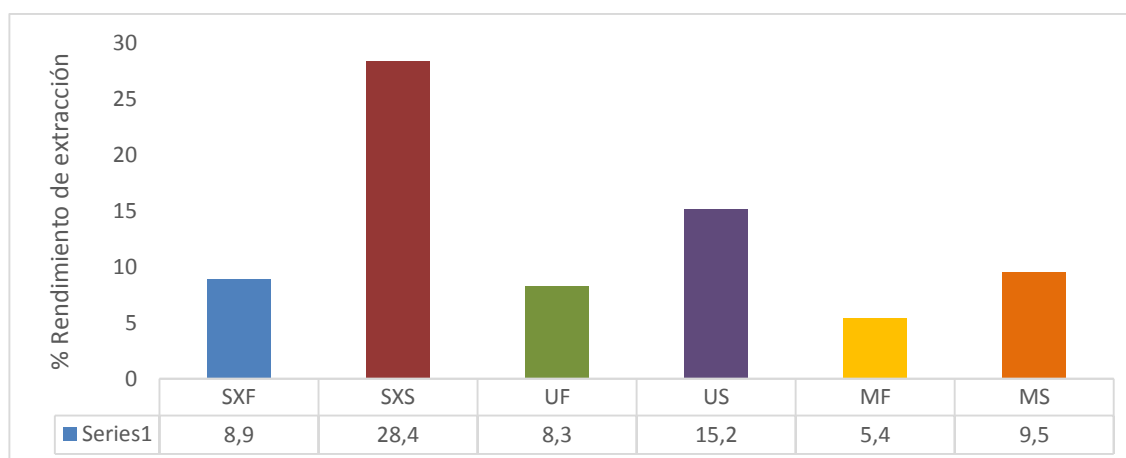
En la Tabla 3 y la Figura 16 se relaciona el promedio de los porcentajes de rendimiento para las muestras en estado fresco y seco de los tres métodos de extracción.

Tabla 3. Rendimientos promedios de la extracción para cada método

Muestra	Peso promedio de la muestra	Peso promedio del extracto	% de rendimiento
SXF	30,0610	2,6703	8,9
SXS	30,0077	8,5319	28,4
UF	30,0762	2,5047	8,3
US	30,0478	4,5672	15,2
MF	100,0383	5,4199	5,4
MS	100,0559	9,4843	9,5

Nota: SXF: *Soxhlet* con muestra en estado fresco, SXS: *Soxhlet* con muestra en estado seco, UF: ultrasonido con muestra en estado fresco, US: ultrasonido con muestra en estado seco, MF: microondas con muestra en estado fresco, MS: microondas con muestra en estado seco.

Figura 16. Porcentaje de rendimiento de los extractos



Nota: SXF: *Soxhlet* con muestra en estado fresco, SXS: *Soxhlet* con muestra en estado seco, UF: ultrasonido con muestra en estado fresco, US: ultrasonido con muestra en estado seco, MF: microondas con muestra en estado fresco, MS: microondas con muestra en estado seco.

En el Anexo B se relacionan los rendimientos de las extracciones de las muestras en estado fresco y seco.

Con los datos obtenidos se observa que el mejor rendimiento en estado fresco para la extracción etanólica sólido- líquido de las cáscaras de naranja fue para el método *Soxhlet* con un promedio del rendimiento de 8,9%, seguido de EAU con un rendimiento del 8,3%, seguida de la EAM con un 5,4%.

Los extractos etanólicos obtenidos a partir del material en estado seco, fueron los que arrojaron mejores rendimientos en la extracción, siendo la extracción por *Soxhlet* la mejor de ellas con un porcentaje de rendimiento de 28,4% seguida de la EAU con 15,2% y EAM con 9,5%. Esto se debe a que las muestras en estado seco no tenían presencia de agua y las muestras se encontraban cortadas en finos trozos, lo cual aumentó el contacto de la muestra con el disolvente.

La extracción etanólica por medio del método *Soxhlet* obtuvo los mejores rendimientos en ambas extracciones, tanto en las muestras fresca y para las muestras en estado seco. El último lugar, sin decir que fue el peor, es para EAM. Estos rendimientos pueden ser atribuidos al tiempo de contacto que permanecieron las muestras con el disolvente.

Al comparar los métodos de extracción en cuanto al tiempo que duro la muestra con el disolvente, podemos decir que la extracción con microondas obtuvo un buen rendimiento atribuyendo que la extracción solo tardo 9 minutos, comparándolo con los métodos como ultrasonido y extracción con *Soxhlet* los cuales fueron de 2 y 12 horas respectivamente.

4.4. Determinación del contenido de polifenoles y flavonoides totales

La determinación del contenido de polifenoles y flavonoides totales es una medida indirecta para establecer la actividad antioxidante de los extractos etanólicos obtenidos de las cáscaras en estado fresco y seco empleando tres métodos de extracción.

4.4.1. Polifenoles totales

La cuantificación de los polifenoles totales se determinó mediante el método de Folin- Ciocalteu, empleando curvas de calibración con ácido gálico, como patrón de referencia, de acuerdo con la metodología presentada en el numeral 3.1.5. En la Tabla 4 se presentan los valores de las absorbancias de los patrones de ácido gálico, obtenidas a 765nm. En el Anexo C se muestran las absorbancias obtenidas para cada una de las concentraciones de la curva de calibración.

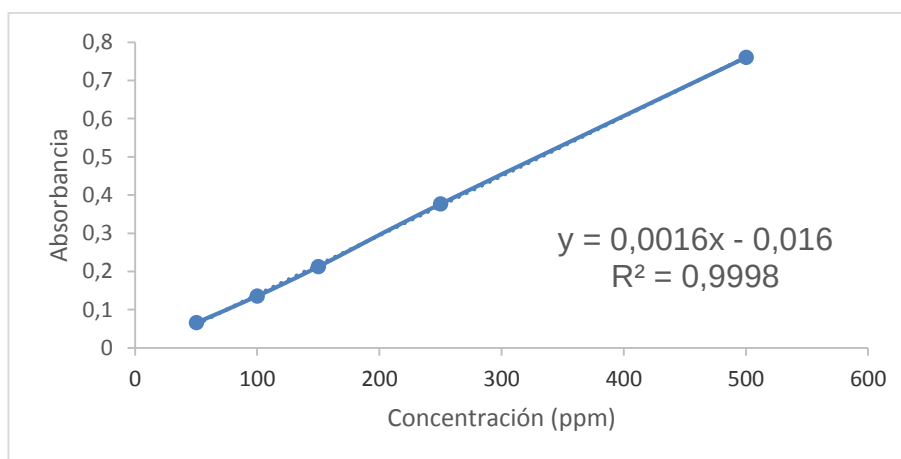
Tabla 4. Absorbancia de la curva de calibración del ácido gálico (AG) para polifenoles totales

Patrones AG (mg/L)	Absorbancia 765nm*	Desviación estándar (±)
50	0,0658	0,00100
100	0,1358	0,00030
150	0,2126	0,0080
250	0,3768	0,0076
500	0,7600	0,00133

Nota: *Cada valor representa la media de 6 repeticiones

En la Figura 17, se presenta la curva de calibración del ácido gálico para la determinación de polifenoles totales, con una correlación lineal de $R^2 = 0.9989$

Figura 17. Curva de calibración del ácido gálico



En la Tabla 5, se presentan los resultados promedios obtenidos en la determinación de polifenoles totales. En el **Anexo D**, se presentan las ecuaciones utilizadas para la determinación de la cantidad de polifenoles totales.

Tabla 5. Promedio del resultado de la cuantificación de polifenoles totales

Extracto	Abs 765nm*	Concentración ppm (a*)	Peso extracto seco (g)	PT(mg AG/g extracto seco)
SXF	0,6822± 0,0702	436,4	0,045	13,0
SXS	0,6621± 0,0151	423,8	0,046	39,2
UF	0,5361± 0,0382	345,1	0,042	10,4
US	0,5356± 0,0105	344,7	0,042	18,5
MF	0,6273± 0,0107	402,0	0,045	24,0
MS	0,7219± 0,1066	461,2	0,039	56,9

Nota: *Cada valor representa la media de 6 repeticiones $\pm$ la desviación estándar. Abs: absorbancia. a*: concentración determinada con la ecuación de la recta y la absorbancia de las muestras PT: polifenoles totales. AG: ácido gálico. SXF: *Soxhlet* con muestra en estado fresco, SXS: *Soxhlet* con muestra en estado seco, UF: ultrasonido con muestra en estado fresco, US: ultrasonido con muestra en estado seco, MF: microondas con muestra en estado fresco, MS: microondas con muestra en estado seco.

El contenido de polifenoles para los extractos etanólicos de la cáscara de naranja es alto, comparándolos con valores reportados en la literatura⁶⁸, lo que indica que estos extractos podrían tener una gran capacidad para la captación de radicales libres, lo que motiva a realizar diferentes estudios que ayuden en la obtención de compuestos bioactivos que puedan ser aplicados en diferentes industrias como la farmacéutica, cosmética, de alimentos, entre muchas más.

Con los datos obtenidos mediante la cuantificación del contenido de polifenoles en los extractos, la mayor cantidad de compuestos polifenoles se encuentran presentes en los extractos obtenidos por el método de extracción asistida por microondas, utilizando el material vegetal seco, con un valor de 56,9 mg AG/ g extracto seco.

El método de extracción que mejor cuantificación de compuestos polifenólicos obtuvo, utilizando las muestras en estado fresco, fue la extracción asistida con microondas, seguida de la extracción asistida con *equipo Soxhlet* y la extracción asistida con ultrasonido, con valores de 24,0- 13,0 y 10,4 mg AG/ g extracto seco respectivamente.

Los valores obtenidos para polifenoles totales (PT) varían entre 10,4 y 56,9 mg AG/g extracto, esto comparado con lo reportado en la literatura por Lourdes y

colaboradores en el año 2007 es superior ya que estos reportaron datos de 35,24 mg AG/g de extracto⁶³. Esto probablemente se deba a que en este trabajo de grado se realizaron las muestras con residuos de la cáscara de naranja, los cuales pueden tener mayor cantidad de metabolitos secundarios debido a la mezcla de las especies en los residuos, que mejoran la cuantificación de los polifenoles al compararlos con la literatura donde se utilizó naranja amarga (una sola especie).

4.4.2. Flavonoides totales

Para la determinación del contenido de flavonoides totales presentes en los extractos etanólicos de cáscaras de naranja, se empleó el método colorimétrico con AlCl_3 , empleando curvas de calibración de quercetina como patrón de referencia, de acuerdo con la metodología planteada en el numeral 3.1.6. En la Tabla 6, se presentan los resultados de las absorbancias medidas a 415 nm. En el Anexo E, se muestran las absorbancias obtenidas para cada una de las concentraciones de la curva de calibración.

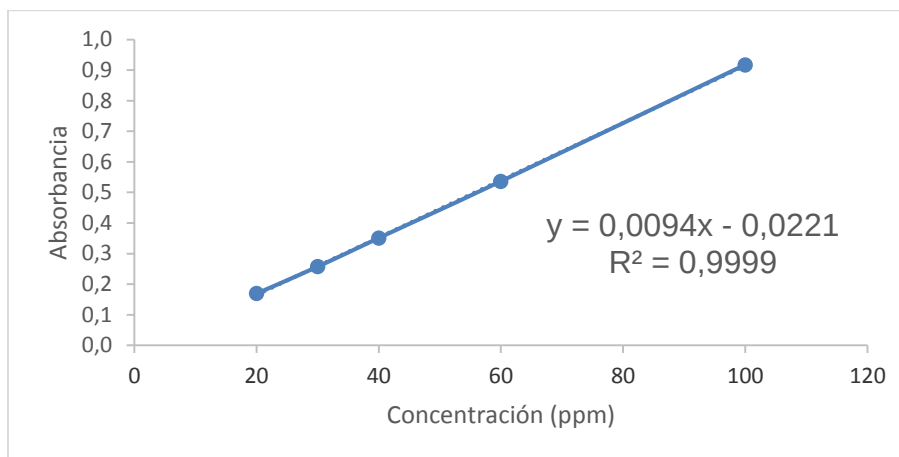
Tabla 6. Absorbancia de la curva de calibración de quercetina para flavonoides totales

Patrones quercetina (mg/L)	Absorbancia 415nm*	Desviación estándar ($\pm$)
20	0,1697	0,00039
30	0,2573	0,00107
40	0,3511	0,00098
60	0,5364	0,00128
100	0,9171	0,00132

Nota: *Cada valor representa la media de 6 repeticiones

La Figura 18, se presenta la curva de calibración para flavonoides totales usando como patrón de referencia la quercetina, con una alta correlación lineal de los datos $R^2 = 0.9999$

Figura 18. Curva de calibración para la quercetina



Los resultados promedios en la cuantificación de los flavonoides totales analizados de los extractos etanólicos de las cáscaras de naranja se presentan en la Tabla 7. En el **Anexo D**, se presentan las ecuaciones utilizadas para determinar la cantidad de compuestos flavonoides presentes en los extractos etanólicos.

Tabla 7. Promedio del resultado en la cuantificación de flavonoides totales

Extracto	Abs 415nm*	Concentración ppm (a*)	Peso extracto seco (g)	FT(mg quercetina/g extracto seco)
SXF	0,6360±0,0013	70,0	0,0102	0,19
SXS	0,6672±0,0012	73,3	0,0077	0,81
UF	0,4619±0,0012	51,5	0,0101	0,13
US	0,6493±0,0011	71,4	0,0087	0,38
MF	0,6987±0,0036	76,7	0,0074	0,56
MS	0,7316±0,0014	80,2	0,0061	1,25

Nota: *Cada valor representa la media de 6 repeticiones ± la desviación estándar. Abs: absorbancia. a*: concentración determinada por medio de la ecuación de la recta y la absorbancia de las muestras FT: flavonoides totales. SXF: *Soxhlet* con muestra en estado fresco, SXS: *Soxhlet* con muestra en estado seco, UF: ultrasonido con muestra en estado fresco, US: ultrasonido con muestra en estado seco, MF: microondas con muestra en estado fresco, MS: microondas con muestra en estado seco.

En la extracción de los compuestos flavonoides la mayor cantidad de estos se obtuvieron de los extractos etanólicos por microondas, utilizando el material vegetal seco, con un valor de 1,25 mg quercetina/ g extracto seco. De igual forma la extracción asistida por microondas usando las muestras en estado fresco, presento una cuantificación alta de compuestos flavonoides, en comparación con extracción con equipo *Soxhlet* y EAU, con un valor de 0,19- 0,13 mg quercetina/ g extracto seco.

Las muestras en estado seco, arrojaron los mejores resultados para la cuantificación de los compuestos flavonoides utilizando los diferentes métodos de extracción. Esto se atribuye a que las muestras se les habían eliminado la mayor cantidad de agua aumentando así el contacto de la muestra con el disolvente y por ende el aumento en el arrastre de compuestos de interés.

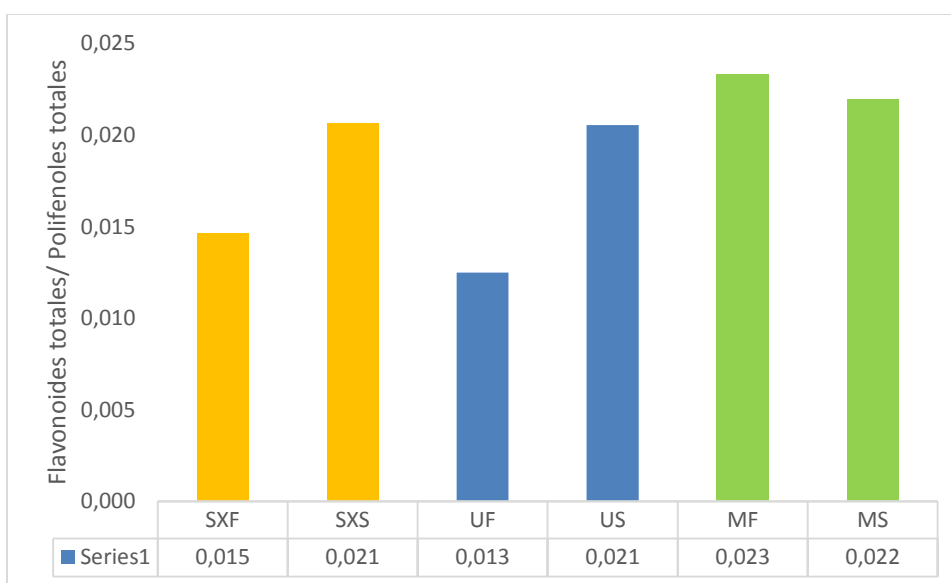
Para los valores reportados de flavonoides totales (FT) en la literatura por Guimaraes para el año 2010,⁷⁵ se tienen valores entre 0,32- 1,69 mg quercetina/g extracto, valores cercanos comparándolos con los obtenidos en esta investigación, los cuales oscilaban entre 1,25- 0,13 mg quercetina/ g extracto seco. Esto puede ser atribuido a la muestra que fue utilizada en esta investigación, ya que en la metodología propuesta en este trabajo se utilizaron residuos de varias especies de naranja y no una especie específica, aumentando así la obtención de diferentes metabolitos secundarios en diferentes cantidades.

Con los datos obtenidos se puede apreciar que los compuestos polifenoles se encuentran en mayor proporción en los extractos etanólicos, al compararlos con los flavonoides, esta tendencia era la esperada, ya que, los flavonoides son un subgrupo de los compuestos polifenoles.

La extracción asistida por microondas fue el mejor método en cuanto la cuantificación de polifenoles y flavonoides totales, esto se puede atribuir a que al ser este el método con el menor tiempo de extracción, los compuestos de interés presentes en la muestra tuvieron un tiempo corto de exposición al calentamiento y por este motivo los metabolitos secundarios no fueron desnaturalizados en comparación con los otros dos métodos de extracción.

En la Figura 19, se evidencia la tendencia en la relación de los flavonoides totales sobre los polifenoles totales, presentes en los extractos etanólicos de la cáscara de naranja.

Figura 19. Relación del contenido de flavonoides totales sobre los polifenoles totales para cada método de extracción



Nota: SXF: *Soxhlet* con muestra en estado fresco, SXS: *Soxhlet* con muestra en estado seco, UF: ultrasonido con muestra en estado fresco, US: ultrasonido con muestra en estado seco, MF: microondas con muestra en estado fresco, MS: microondas con muestra en estado seco.

Como se puede observar con los datos y la gráfica la proporción que existe de flavonoides con los polifenoles totales no tienen un amplio rango de variación, los valores son muy cercanos entre sí, lo que indica que cada uno de los métodos de extracción arrastra compuestos tipo flavonoides que se encuentran presentes en las cáscaras de naranja. Se tiene que el mayor contenido de flavonoides totales en los extractos etanólicos de la cáscara de naranja, es mayor en la extracción asistida por microondas, con las cáscaras en estado fresco con un valor de 0,023 (FT/PT). Este comportamiento también se puede atribuir al tiempo de contacto de la muestra con el disolvente, ya que al estar mayor tiempo el analito en presencia de calentamiento alguno de los metabolitos secundarios pudieron ser degradados.

4.5. Determinación de la actividad antioxidante por medio del catión radical ABTS⁺

Para este ensayo se utilizó la metodología propuesta por Re y colaboradores en 1999,⁶⁴ con modificaciones de Muñoz y colaboradores en el 2010⁷², siguiendo la metodología descrita en el numeral 3.2.1.

Para cada una de las sustancias en estudio se determinó la Actividad Antioxidante total (TAA) siguiendo la Ecuación 5, que corresponde a la relación entre la pendiente

obtenida de la curva del compuesto de referencia Trolox, sobre los kilogramos de las sustancias antioxidantes en estudio.

$$\text{Ecuación 5} \quad TAC: \frac{mmol \text{ Trolox}}{Kg \text{ muestra}}$$

La determinación de la actividad antioxidante para los extractos etanólicos se realizaron siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.1.

Fue determinada la curva del Trolox en primera instancia debido a que los datos analizados son función de este. La curva y su valor obtenido se encuentran en el Anexo F.

Se obtuvieron las curvas dosis- respuesta para cada uno de los compuestos de referencia y los extractos. En la Figura 20 y la Figura 21, se relacionan algunas de las gráficas obtenidas para cada uno de los compuestos de referencia y los extractos etanólicos de la cáscara de naranja, por los diferentes métodos utilizados para las muestras en estado fresco y seco. En los Anexos del G al M se relacionan todas las curvas antioxidantes de cada uno de los compuestos de referencia y los extractos etanólicos de la cáscara de naranja por los tres diferentes métodos.

Figura 20. Curvas de la actividad antioxidante para los compuestos de referencia

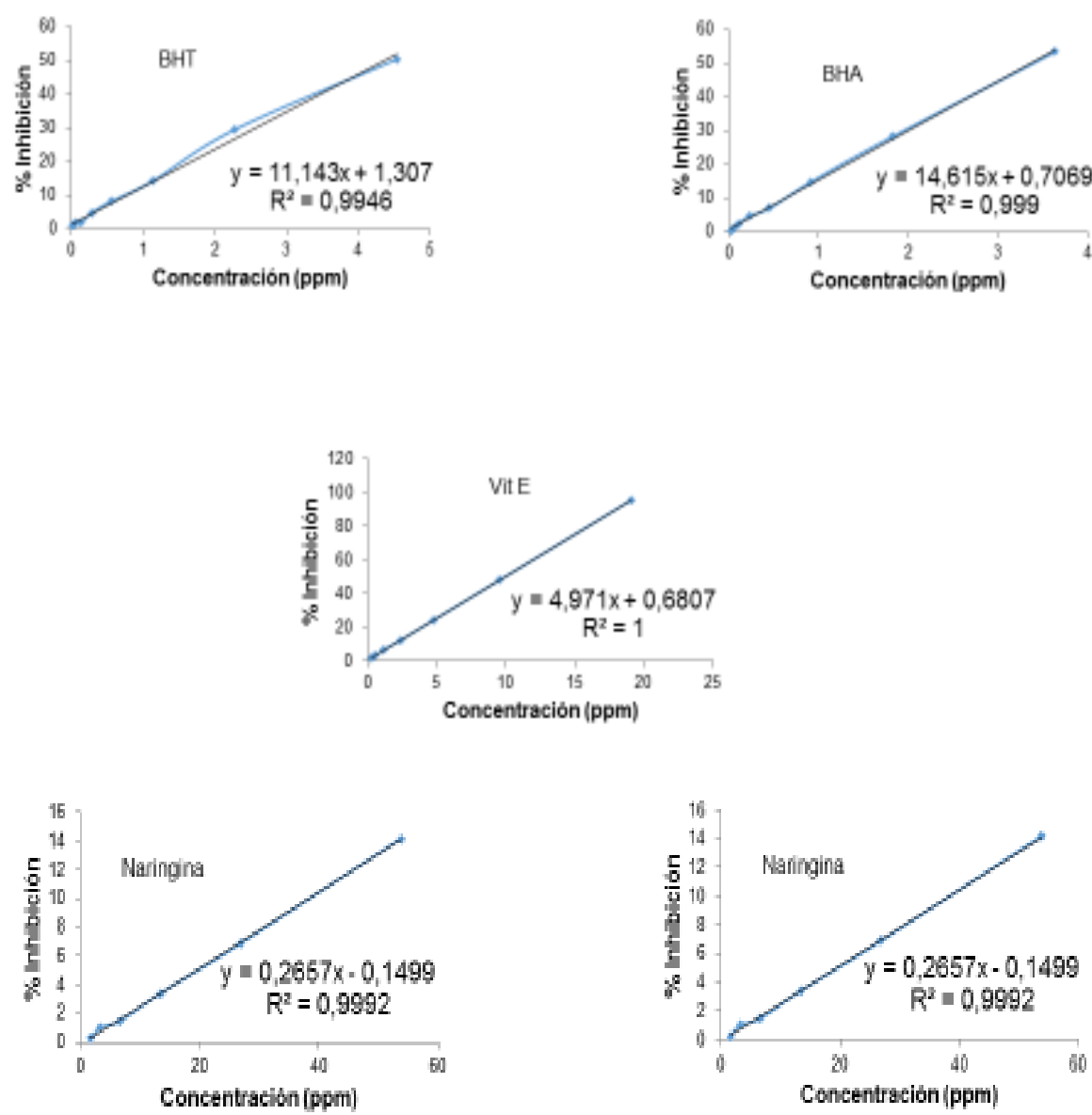
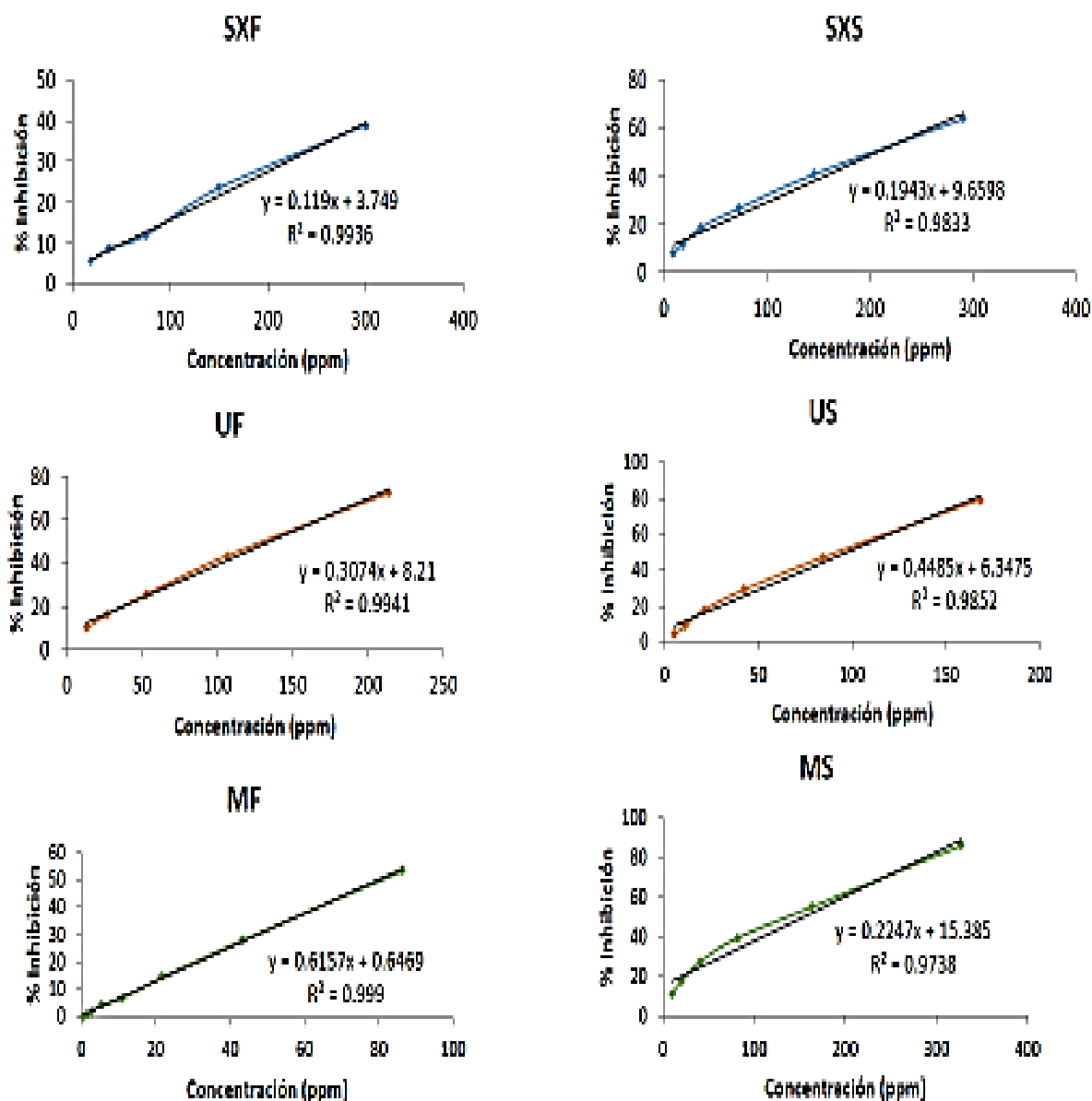


Figura 21. Curvas de la actividad antioxidante para los extractos etanólicos de la cáscara de naranja



Nota: SXF: *Soxhlet* con muestra en estado fresco, SXS: *Soxhlet* con muestra en estado seco, UF: ultrasonido con muestra en estado fresco, US: ultrasonido con muestra en estado seco, MF: microondas con muestra en estado fresco, MS: microondas con muestra en estado seco. BHT: butilhidroxitolueno. BHA: butilhidroxianisol. Vit E: vitamina E.

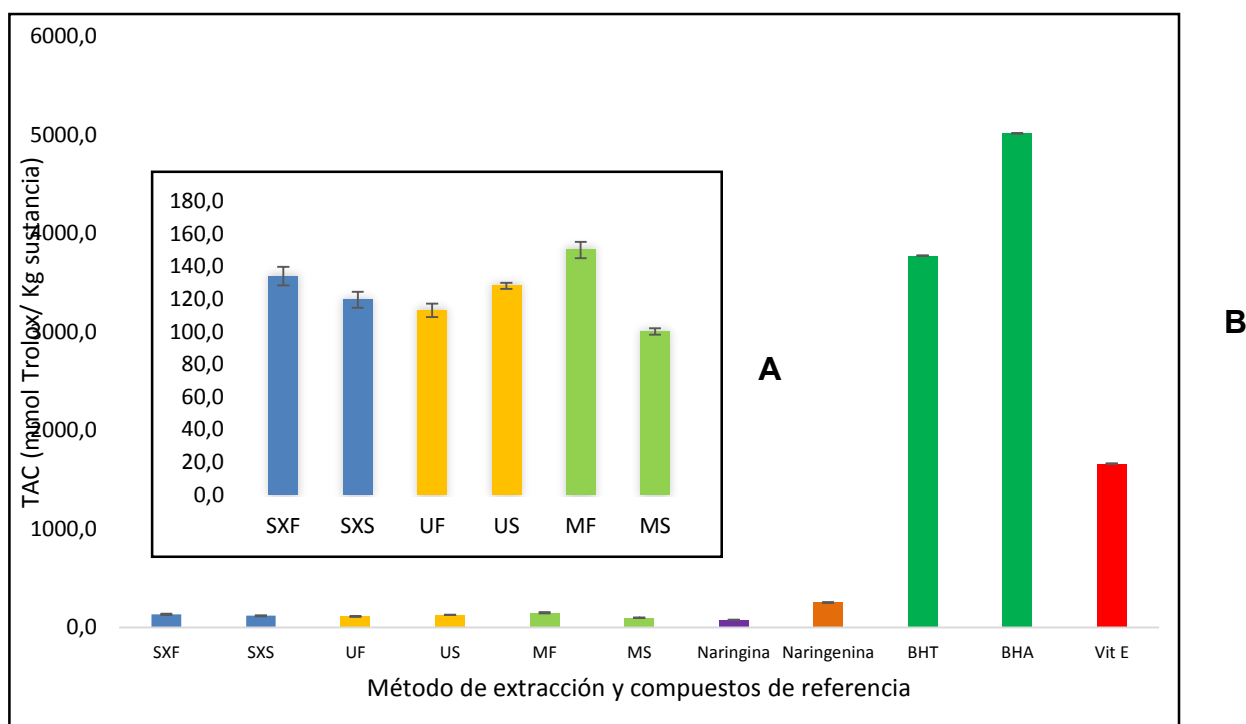
Aplicando la Ecuación 5, tenemos los datos obtenidos para los extractos etanólicos, los cuales se relacionan en la Tabla 8 y en la Figura 22, donde se comparan los datos para cada uno de los extractos etanólicos de las cáscaras de naranja en estado fresco, secos y los compuestos de referencia utilizados en este trabajo.

Tabla 8. Promedio de la actividad antioxidante para los extractos etanólicos y los compuestos de referencia

Muestra	Concentración promedio (ppm)	TAC (mmol de Trolox/ Kg muestra) $\pm$ SD*	CV (%)
BHT	200	$3777,2 \pm 8,7 \times 10^{-8}$	2,0
BHA	160	$5016,2 \pm 1,5 \times 10^{-7}$	4,4
Vit E	420	$1663,4 \pm 4,3 \times 10^{-7}$	4,3
Naringina	590	$80,1 \pm 4,9 \times 10^{-6}$	2,4
Naringenina	270	$252,5 \pm 1,0 \times 10^{-6}$	1,6
SXF	2800	$134,0 \pm 5,7$	3,4
SXS	2900	$119,5 \pm 4,9$	4,0
UF	4600	$113,0 \pm 4,1$	3,6
US	3800	$128,1 \pm 1,9$	1,6
MF	4200	$150,1 \pm 5,0$	3,1
MS	3700	$100,1 \pm 2,0$	1,9

Nota: SD*: Desviación estándar para n= 3 réplicas. SXF: *Soxhlet* con muestra en estado fresco, SXS: *Soxhlet* con muestra en estado seco, UF: ultrasonido con muestra en estado fresco, US: ultrasonido con muestra en estado seco, MF: microondas con muestra en estado fresco, MS: microondas con muestra en estado seco. BHT: butilhidroxitolueno. BHA: butilhidroxianisol. Vit E: vitamina E

Figura 22. Comparación de los valores TAC de los diferentes métodos de extracción y los compuestos de referencia



Nota: A: valores TAA por los diferentes métodos de extracción. B: valores TAA por los diferentes métodos de extracción y los compuestos de referencia. SXF: *Soxhlet* con muestra en estado fresco, SXS: *Soxhlet* con muestra en estado seco, UF: ultrasonido con muestra en estado fresco, US: ultrasonido con muestra en estado seco, MF: microondas con muestra en estado fresco, MS: microondas con muestra en estado seco. BHT: butilhidroxitolueno. BHA: butilhidroxianisol. Vit E: vitamina E.

El método de extracción que reporta la mejor actividad antioxidante utilizando las muestras de la cáscara de naranja en estado fresco, con un valor promedio TAA de 150,1 es para la EAM, seguido de la extracción por *Soxhlet* con un valor TAA de 134,0, terminando con la EAU con un TAA de 113,0 con el rendimiento más bajo entre los tres métodos.

Las muestras en estado seco variaron un poco teniendo, la EAU como el mejor método con actividad antioxidante (TAA 128,1), seguido de la extracción con *Soxhlet* (TAA 119,5) respectivamente, ya que, la EAM para las muestras en estado seco fue el que arrojó los datos más bajos comparando los tres métodos (TAC 100,1).

Los datos obtenidos con los extractos de las cáscaras de naranja arrojaron valores inferiores a los antioxidantes comerciales (BHT y BHA) utilizados como

conservantes en las industrias, al igual con la Vitamina E que es un compuesto natural, se obtuvieron valores por debajo. Con esto se tiene que los extractos etanólicos obtenidos poseen una moderada actividad antioxidante comparándolo con los compuestos de referencia.

Comparando los extractos etanólicos, con la naringenina que es un flavonoide de referencia, el cual tuvo un valor de 252,5 mmol de Trolox/ kg muestra, estos arrojaron valores cercanos, lo que evidenciaría que los extractos de la cáscara de naranja posiblemente contengan estos metabolitos secundarios. Al comparar los extractos etanólicos con la naringina (TAA 80,1), el cual es uno de los flavonoides mayoritarios presente en la naranja, podemos observar que estos poseen valores superiores a este metabolito secundario. Esta tendencia puede ser atribuida a la mezcla de compuestos de valor agregado presentes en los extractos etanólicos de los residuos de la cáscara de naranja.

En la Tabla 9, se relacionan los compuestos polifenoles y flavonoides presentes en la actividad antioxidante.

Tabla 9. Relación de la cantidad de polifenoles y flavonoides totales presentes en la actividad antioxidante

Muestra	Peso promedio extracto seco en la AA (mg)	PT (mg AG/ g extracto seco)	FT (mg quercetina/ g extracto seco)	Relación PT con AA (mg AG/ g extracto seco)	Relación FT en AA (mg quercetina/ g extracto seco)
SXF	2,8	13,0	0,19	$3,6 \times 10^{-2}$	$5,3 \times 10^{-4}$
SXS	2,9	39,2	0,81	$1,1 \times 10^{-1}$	$2,3 \times 10^{-3}$
UF	4,6	10,4	0,13	$4,8 \times 10^{-2}$	$5,9 \times 10^{-4}$
US	3,8	18,5	0,38	$7,0 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-3}$
MF	4,2	24,0	0,56	$1,0 \times 10^{-1}$	$2,3 \times 10^{-3}$
MS	3,7	56,9	1,25	$2,1 \times 10^{-1}$	$4,6 \times 10^{-3}$

Nota: SXF: Soxhlet con muestra en estado fresco, SXS: Soxhlet con muestra en estado seco, UF: ultrasonido con muestra en estado fresco, US: ultrasonido con muestra en estado seco, MF: microondas con muestra en estado fresco, MS: microondas con muestra en estado seco, AA: actividad antioxidante, PT: polifenoles totales, AG: ácido gálico, FT: flavonoides totales.

Al hacer una relación cuantitativa entre los polifenoles y flavonoides totales con los datos obtenidos en la determinación de la actividad antioxidante tenemos que los compuestos polifenólicos se encuentran en mayor cantidad, en comparación con los flavonoides. Debido al alto contenido de polifenoles presentes en la cáscara de

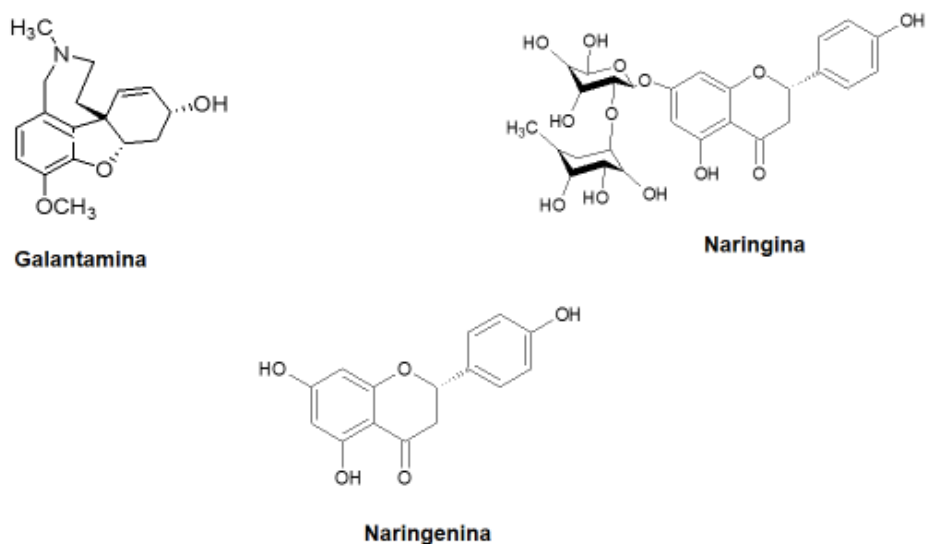
la naranja, se tiene la presencia de la capacidad antioxidante mostrada por los extractos obtenidos, ya que los compuestos presentes en ellos poseen sustituyentes hidroxilos que facilitan la transferencia de átomos de hidrógeno que pueden ayudar en la eliminación de los radicales libres.⁴⁹

Teniendo en cuenta factores como la concentración y que los extractos son mezclas complejas de varios compuestos, posiblemente debido a esto se presenta variación entre la cantidad de metabolitos secundarios presentes en las muestras con la actividad antioxidante evaluada, ya que, teniendo en cuenta que la relación con la actividad antioxidante fue alta para los extractos etanólicos en estado fresco extraídos por microondas, pero esta muestra no tiene la mayor cantidad de compuestos polifenoles.

4.6. Determinación de la actividad inhibitoria *in vitro* de la AChE.

Para esta actividad se siguió el método descrito por Ellman en el año 1961.²² Fueron utilizados compuestos de referencia como galantamina, naringina, naringenina y Vitamina E (Figura 23).

Figura 23. Compuestos de referencia para AChE



Para la determinación *in vitro* en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa de los compuestos de referencia y los extractos etanólicos de la cáscara de naranja, se realizaron los pasos de acuerdo con la metodología experimental presentada en el numeral 3.2.2.

Se determinaron las curvas dosis- respuesta para los compuestos de referencia (galantamina (como patrón de referencia para la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa), vitamina E (compuesto de referencia natural), naringina y naringenina (compuestos flavonoides)).

En la Figura 24, se ilustran algunas de las curvas dosis- respuesta para la inhibición de la enzima AChE de los compuestos de referencia y en la Figura 25, se presentan las curvas de inhibición para algunos de los extractos etanólicos de la cáscara de naranja. En los Anexos del N hasta el T, se encuentran todas las curvas dosis respuesta para la inhibición de la enzima AChE de los compuestos de referencia y los extractos etanólicos.

Figura 24. Curvas de inhibición de la enzima AChE de los compuestos de referencia.

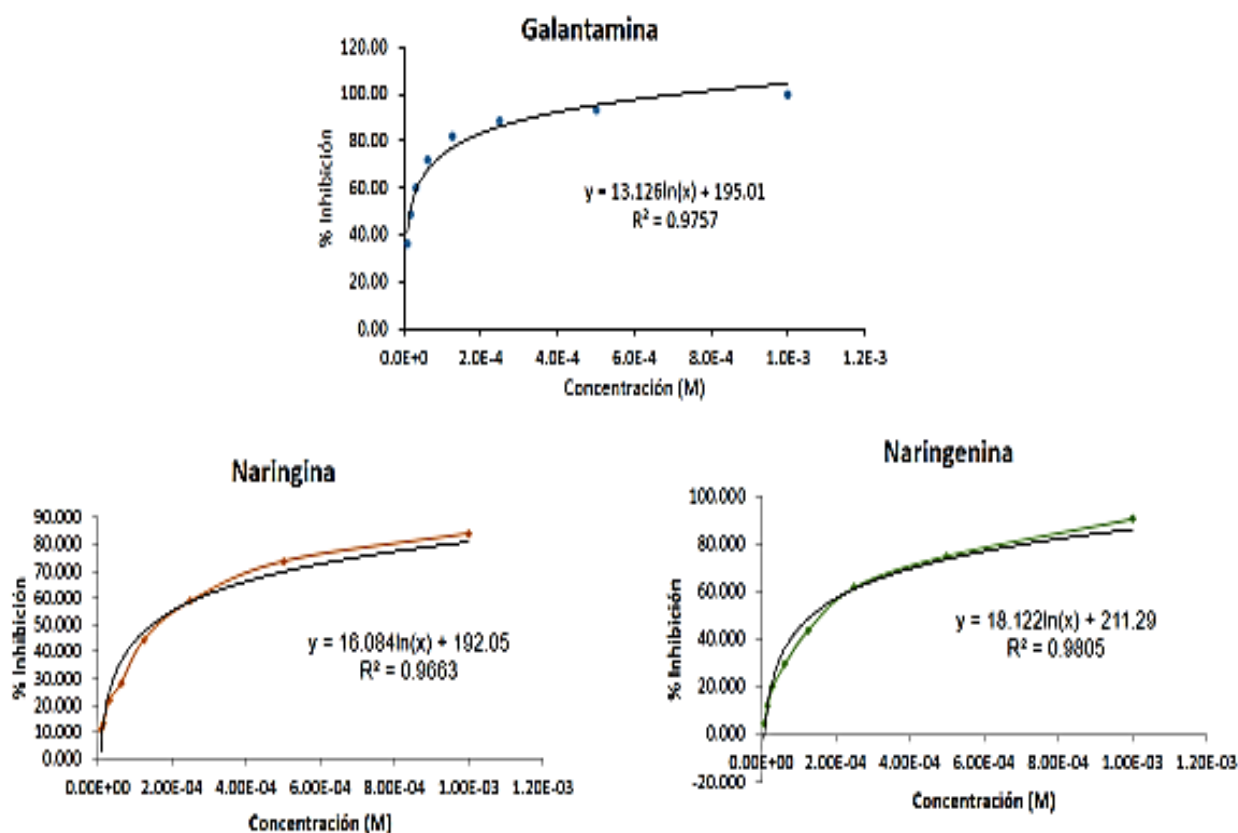
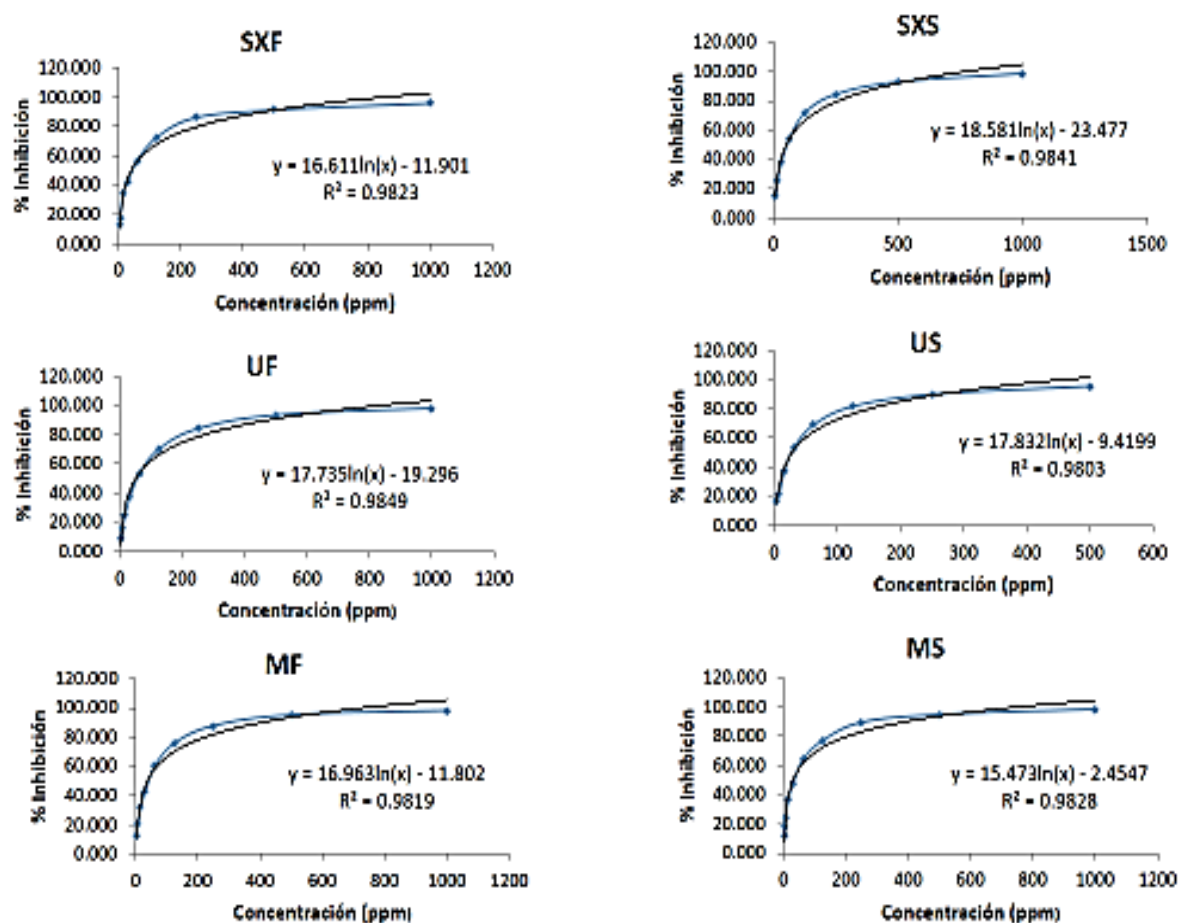


Figura 25. Curvas de inhibición de la enzima AChE de los extractos etanólicos de las cáscaras de naranja



Nota: SXF: *Soxhlet* con muestra en estado fresco, SXS: *Soxhlet* con muestra en estado seco, UF: ultrasonido con muestra en estado fresco, US: ultrasonido con muestra en estado seco, MF: microondas con muestra en estado fresco, MS: microondas con muestra en estado seco.

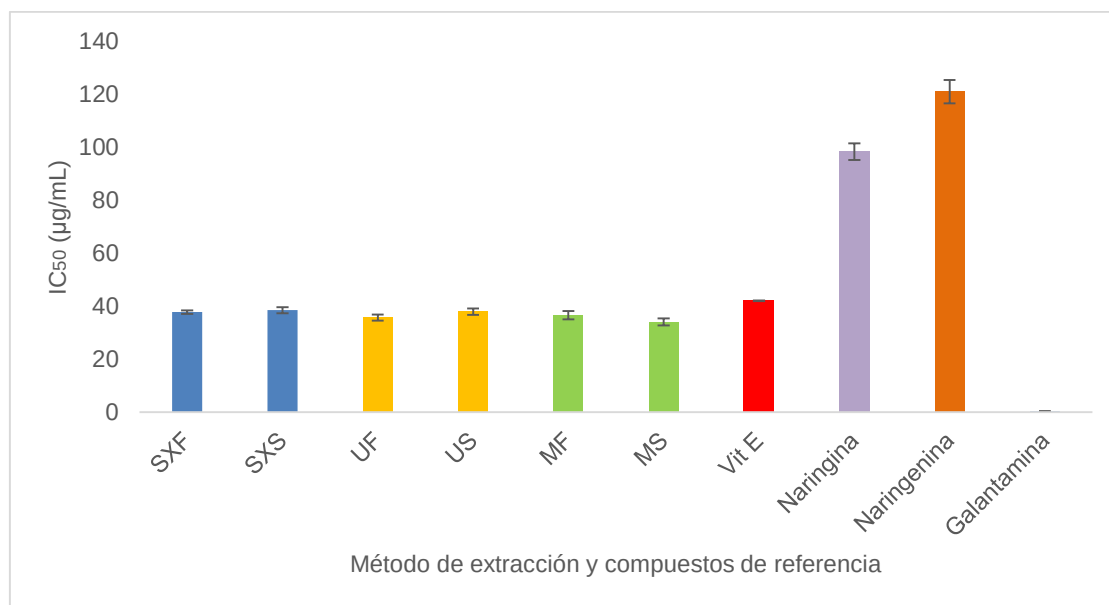
En la Tabla 10 y la Figura 26 se promedian los datos de las concentraciones inhibitorias medias determinadas para los extractos etanólicos de la cáscara de naranja en estado fresco y seco para sus tres diferentes métodos.

Tabla 10. Valores promedio de la IC₅₀ de la actividad inhibitoria de la enzima AChE de los compuestos de referencia y los extractos etanólicos de la cáscara de naranja

Muestra	IC₅₀ (µg/mL)±SD*	CV (%)
Galantamina	0,23 ± 0,11	0,9
Vit E	42,0 ± 0,13	9,76x10 ⁻⁵
Naringina	98,3 ± 3,18	3,2
Naringenina	121 ± 4,40	3,6
SXF	37,8 ± 0,67	1,8
SXS	38,5 ± 1,11	2,9
UF	35,7 ± 1,11	3,1
US	37,9 ± 1,19	2,9
MF	36,6 ± 1,55	4,2
MS	34,1 ± 1,30	3,8

Nota: SD*: Desviación estándar para n= 3 réplicas. SXF: *Soxhlet* con muestra en estado fresco, SXS: *Soxhlet* con muestra en estado seco, UF: ultrasonido con muestra en estado fresco, US: ultrasonido con muestra en estado seco, MF: microondas con muestra en estado fresco, MS: microondas con muestra en estado seco. Vit E: vitamina E.

Figura 26. Comparación de los valores de IC₅₀ de la actividad inhibitoria de la enzima AChE para los extractos etanólicos de la cáscara de naranja y los compuestos de referencia



Nota: SXF: *Soxhlet* con muestra en estado fresco, SXS: *Soxhlet* con muestra en estado seco, UF: ultrasonido con muestra en estado fresco, US: ultrasonido con muestra en estado seco, MF: microondas con muestra en estado fresco, MS: microondas con muestra en estado seco. Vit E: vitamina E.

Los extractos lograron inhibir la enzima AChE en concentraciones menores a 62,5 µg/mL, esto indica que existen compuestos tipo flavonoides presentes en estos extractos que sería interesante aislar y determina cuál de estos ejerce la inhibición sobre dicha enzima.

Con los datos obtenidos se tiene que las muestras en estado seco, fueron las que mejores datos arrojaron, siendo el método de extracción por microondas el más eficiente con una IC₅₀ de 34,1 µg/ mL, seguido de la EAU con un valor de IC₅₀ 37,9 y por último pero no menos importante la extracción con equipo *Soxhlet* con una IC₅₀ de 38,5.

Los valores obtenidos para cada uno de los métodos en estado fresco y seco no varían de manera significativa entre sí, con esto se puede decir que los extractos etanólicos de la cáscara de naranja son buenos inhibidores de la enzima AChE, independiente del estado fresco o seco de la muestra.

Los flavonoides de referencia utilizados fueron naringina y naringenina con IC₅₀ de 98,3 y 121 µg/mL respectivamente, los extractos tuvieron una IC₅₀ menor (con un

63- 69%) a estos valores, estos datos se deben a que los extractos etanólicos de la cáscara de naranja poseen una mezcla compleja de varios compuestos.

La Vitamina E como compuesto natural, posee una concentración inhibitoria media de 42,0 µg/mL, valor que se encuentra dentro del rango de los extractos etanólicos obtenidos de la cáscara de naranja, indicando que estos son buenos inhibidores de la AChE cuando se le compara con compuestos naturales.

Los extractos etanólicos de la cáscara de naranja poseen una inhibición que varía entre 34,1- 38,5 µg/mL, menores a los que se encuentran reportados en la literatura por Loizzo y colaboradores en el año 2012⁷⁶ con valores de 91,4- 107,4 µg/mL. Esto probablemente este influenciado en que para este trabajo se utilizaron residuos de la cáscara de naranja, pero para lo reportado en la literatura se hicieron los análisis con *Citrus aurantifolia*.

En la Tabla 11, se relaciona la cantidad de compuestos polifenoles y flavonoides presentes en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.

Tabla 11. Relación de la cantidad de polifenoles y flavonoides totales presentes en la inhibición de la AChE

Muestra	Peso extracto seco en la IChE (mg)	PT (mg AG/ g extracto seco)	FT (mg quercetina/ g extracto seco)	Relación PT con IChE (mg AG/ g extracto seco)	Relación FT en IChE (mg quercetina/ g extracto seco)
SXF	2	13,0	0,19	$2,6 \times 10^{-2}$	$3,8 \times 10^{-4}$
SXS	2	39,2	0,81	$7,8 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-3}$
UF	2	10,4	0,13	$2,1 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-4}$
US	2	18,5	0,38	$3,7 \times 10^{-2}$	$7,6 \times 10^{-4}$
MF	2	24,0	0,56	$4,8 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-3}$
MS	2	56,9	1,25	$1,1 \times 10^{-1}$	$2,5 \times 10^{-3}$

Nota: SXF: Soxhlet con muestra en estado fresco, SXS: Soxhlet con muestra en estado seco, UF: ultrasonido con muestra en estado fresco, US: ultrasonido con muestra en estado seco, MF: microondas con muestra en estado fresco, MS: microondas con muestra en estado seco, IChE: inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, PT: polifenoles totales, AG: ácido gálico, FT: flavonoides totales.

En la relación cuantitativa entre los polifenoles y flavonoides totales con los datos obtenidos en la inhibición de la enzima AChE, podemos observar que los compuestos polifenoles son mayoritarios, en comparación con los flavonoides. Posiblemente estos metabolitos secundarios son inhibidores de esta enzima, mas

sin embargo, al comparar la relación entre la cantidad de polifenoles y actividad inhibitoria de la AChE, no se tiene una relación directamente proporcional a estos, esto se puede atribuir a otros compuestos bioactivos presentes en los extractos, ya que estos son mezclas complejas de varios compuestos, que pueden ser estructuralmente semejantes a la acetilcolina, la cual es la enzima que se enlaza con la acetilcolinesterasa para finalizar el impulso nervioso neuromuscular en la sinapsis.

5. CONCLUSIONES

Los extractos etanólicos obtenidos con material fresco y seco fueron evaluados para determinar cuáles de los tres métodos de extracción aplicados, como lo fueron: extracción sólido líquido por *Soxhlet*, extracción asistida por ultrasonido (EAU) y extracción asistida por microondas (EAM) fue el más eficiente, obteniendo que dentro de los más eficientes se tuvo, que la, extracción por *Soxhlet* mostró un rendimiento del 8,8- 28,4 %, seguido de la extracción por ultrasonido con un rendimiento del 8,3- 15,2%, lo que deja a la extracción por microondas en la última posición con un rendimiento de 5,4- 9,5% respectivamente. Pero al evaluar el tiempo de extracción, se tiene que la extracción asistida por microondas es potencialmente el mejor método ya que en su corto tiempo de exposición con la muestra se obtienen datos significativamente altos.

Se determinó el contenido de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu mostrando que la mayor cantidad de compuestos fenólicos se obtuvo de los extractos etanólicos realizados por el método de extracción con microondas en estado seco con 56,9 AG/ g extracto seco.

Los flavonoides totales fueron evaluados por medio del método colorimétrico con $AlCl_3$ para los extractos etanólicos de la cáscara de naranja, determinando que los extractos obtenidos por medio del método de extracción por microondas en estado seco con un valor de 1,25 mg quercetina/g extracto seco, fue el método que mejores datos obtuvo en comparación con los demás.

La determinación de la actividad antioxidante determinó que los extractos etanólicos de la cáscara de naranja poseen una moderada actividad captadora de radicales libre, comparando estos datos con los compuestos comerciales analizados.

Frente la inhibición *in vitro* de la enzima acetilcolinesterasa, se tiene que los extractos etanólicos de la cáscara de naranja tienen una IC_{50} entre 34,1- 38,5 $\mu g/mL$, valores altos si se compara con los compuestos de referencia. Para este ensayo los extractos obtenidos por medio de la extracción con microondas utilizando las muestras en estado seco, mostraron los mejores resultados comparándolos con los otros métodos de extracción.

Los extractos obtenidos con muestras en estado seco utilizados en la cuantificación de cada una de las actividades biológicas evaluadas, mostraron valores superiores comparándolos con las muestras en estado fresco, esto se atribuye a que fue

eliminada la mayor cantidad de agua presente en las muestras, la cual puede interferir con el disolvente dificultando la obtención de los compuestos de interés.

Las muestras extraídas en estado seco con microondas, obtuvieron buenos resultados al compararlos con los otros métodos de extracción, esto se puede atribuir a que este método fue el que menor tiempo de extracción tuvo, reduciendo el riesgo de la descomposición de los compuestos de interés.

Al determinar la relación de los compuestos polifenólicos y los flavonoides totales, presentes en las muestras para la determinación de la actividad antioxidante por método directo (reacción hacia el catión radical ABTS⁺) y la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, se tiene una alta relación de compuestos tipo polifenoles, pero no se tiene relación directamente proporcional entre la cantidad de compuestos de interés y la cuantificación en las muestras frente las actividades biológicas, esta tendencia posiblemente se atribuya a otra clase de compuestos bioactivos presentes en los extractos etanólicos, ya que estos son mezclas complejas de varios compuestos.

Se consiguió implementar en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales de la Universidad Santo Tomás la técnica de microdilución para la determinación de la actividad antioxidante y la inhibición *in vitro* de la enzima acetilcolinesterasa para extractos etanólicos de cáscara de naranja.

6. DIVULGACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de esta investigación fueron presentados y/o divulgados en un evento internacional, se lista a continuación el título del trabajo y el evento en el cual se presentó:

1. Se presentó un poster en la modalidad de productos naturales titulada: “Determinación de fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos etanólicos de la cáscara de la naranja obtenidos por diferentes métodos de extracción”, en el **XIX Simposio Nacional de Química Orgánica SINACO**. Sociedad argentina de investigación en química orgánica. Mar del plata-Argentina. Noviembre 16 al 19 del 2013. (Anexo U)

BIBLIOGRAFÍA

1. Aazza, S., Lyoussi, B., Miguel, M. G. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules* **2011**. 16. 7672–7690.
2. Noguera, K., Olivero, J. Los rellenos sanitarios en Latinoamérica: Caso Colombiano. *Rev. Acad. Colomb. Cienc* **2010**. 34. 347–356
3. Cjuno, J., Arroyo, J. Inhibición de la actividad enzimática de la tirosinasa con EDTA , quitosano y papaina. *Rev. Per. Quím. Ing. Quím.* **2009**. 12, 42–48.
4. Méndez, R., Castillo, E., Sauri, M., Quintal, C., Vallejos, G., Juménez, B. Tratamiento fisicoquímico de los lixiviados de un relleno sanitario. *Redalyc* **2004**. 8. 155–163.
5. Buer, C., Imin, N., Djordjevic, M. Flavonoids: new roles for old molecules. *J. Integr. Plant Biol.* **2010**. 52. 98–111
6. Roben, E. *Oportunidades para reducir la generación de los desechos sólidos y reintegrar materiales recuperables en el círculo económico*. Ecuador, 2003. 1– 103.
7. Superintendencia Servicios publicos Domiciliarios. *Disposición Final de Residuos Sólidos en Colombia*.2013. Bogotá, 2012. 1-61.
8. Ordoñez, O. Estudio prospectivo de uso para disposición final de residuos sólidos, en n area parcial del predio ‘El Carrasco’ propiedad del amb S.A. E.S.P.Especialista en Ingenieria Ambiental, Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, 2010.
9. Omar, J., Alonso, I., Garaikoetxea, A., Etxebarria, N. Optimization of Focused Ultrasound Extraction (FUSE) and Supercritical Fluid Extraction (SFE) of Citrus Peel Volatile Oils and Antioxidants. *Food Anal. Methods* **2012**. 6. 1244–1252.
10. Juárez, J., Castro, A., Jaúregui, J., Lizano, J., Carhuapoma, M., Choquesillo, F., Felix, L., Cortillo, P., López, J., Jaramillo, M., Córdova, A., Ruíz, J., Ramos, M. Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (Naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. *Cienc. Invest.* **2010**. 13. 9–13.
11. Zheleva, D., Balabanova, V. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory potential of Arnica montana cultivated in Bulgaria. *Turk J Biol* **2012**. 36. 732–737.
12. Sheng, Z., Wan, P., Dong, C., Li, Y. Optimization of total flavonoids content extracted from *Flos Populi* using response surface methodology. *Ind. Crops Prod.* **2013**. 43. 778–786.
13. Naseem, B, Shah, S., Hasan, A., Sakhawat, S. Interaction of flavonoids, the naturally occurring antioxidants with different media: A UV- visible spectroscopic study. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc.***2010**. 75. 1341-1346.
14. Lorenzo, J., González, R., Sánchez, M., Amado, I., Franco, D. Effects of natural (grape seed and chestnut extract) and synthetic antioxidants

- (buthylatedhydroxytoluene, BHT) on the physical, chemical, microbiological and sensory characteristics of dry cured sausage 'chorizo'. *Food Res. Int.* **2013.** 54. 611–620.
15. Biparva, P., Ehsani, M., Hadjmohammadi, M. Dispersive liquid–liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples. *J. Food Compos. Anal.* **2012.** 27. 87–94.
 16. Aremu, A., Amoo, S., Ndhlala, A., Finnie, J., Van Staden, J. Antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibition, iridoid content and mutagenic evaluation of *Leucosidea sericea*. *Food Chem. Toxicol.* **2011.** 49. 1122–1128.
 17. Zheleva, D. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties of *Amorpha fruticosa* L. and *Phytolacca americana* L. *Pharmacogn. Mag.* **2013.** 9. 109–13.
 18. Rueda, X., Lugo, L., Parada, D. Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (*Citrus sinensis* , variedad Valenciana) cultivada en Labateca (Norte de Santander , Colombia). *Redalyc.* **2007.** 5, 3–8.
 19. Orduz, J., Garzón, D. Alternancia de la producción y comportamiento fenológico de la naranja ' Valencia ' (*Citrus sinensis* [L .] Osbeck) en el trópico bajo húmedo de Colombia. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agrope* **2012.** 13. 136–144.
 20. Shalaby, N., Abd-alla, H., Ahmed, H., Basoudan, N. Protective effect of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantifolia* against osteoporosis and their phytochemical constituents. *J. Med. Plants Res.* **2011.** 5. 579–588.
 21. Tundis, R., Loizzo, M., Bonesi, M., Menichini, F., Mastellone, V., Colica, C., Menichini, F. Comparative study on the antioxidant capacity and cholinesterase inhibitory activity of *Citrus aurantifolia* Swingle, *C. aurantium* L., and *C. bergamia* Risso and Poit. peel essential oils. *J. Food Sci.* **2012.** 77. 40–46 .
 22. Ellman, G., Courtney, D., Andres, V., Featherstone, R. A new and rapid colorimetric of acetylcholinesterase determination. *Biochem. Pharmacol.* **1961.** 7, 88–95
 23. Orduz, J., Cagua, D. Generalidades de los cítricos y recomendaciones agronómicas para su cultivo en Colombia. En *Cítricos: cultivo, poscosecha e industrialización*. Bogotá, 2012. 49–88.
 24. Aguilar, P., Escobar, M., Pássaro, C. Situación actual de la cadena de cítricos en Colombia: limitantes y perspectivas. En *Cítricos: cultivo, poscosecha e industrialización*. Bogotá, 2012. 8–47.
 25. Zhang, M., Duan, C., Zang, Y., Huang, Z., Liu, G. The flavonoid composition of flavedo and juice from the pummelo cultivar (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) and the grapefruit cultivar (*Citrus paradisi*) from China. *Food Chem.* **2011.** 129. 1530–1536.
 26. Departamento administrativo nacional de estadística. *Boletín de prensa encuesta nacional agropecuaria ena-2012*. Bogotá. 2013..

27. Khan, M., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A., Dangles, O., Chemat, F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chem.* **2010**. 119. 851–858.
28. Jennifer, R. Determinación por HPLC de naringina, hesperidina, naringenina y hesperetina en jugos cítricos y aplicación de naringinasa en el jugo de mandarina. Pregrado. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. 2006.
29. Álvarez, E., Orallo, F. Actividad biológica de los flavonoides (II). Acción cardiovascular y sanguínea. *Dep. Farmacol.* **2003**. 22. 102–110 .
30. Sawalha, S., Arráez, D., Segura, A., Fernández, A. Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE–MS/MS. *Food Chem.* **2009**. 116. 567–574.
31. Cao, J., Xia, X., Chen, X., Xiao, J., Wang, Q. Characterization of flavonoids from *Dryopteris erythrosora* and evaluation of their antioxidant, anticancer and acetylcholinesterase inhibition activities. *Food Chem. Toxicol.* **2013**. 51, 242–250
32. Murthy, K., Kim, J., Vikram, A., Patil, B. S. Differential inhibition of human colon cancer cells by structurally similar flavonoids of citrus. *Food Chem.* **2012**. 132, 27–34.
33. Ghanem, N., Mihoubi, D., Kechaou, N., Mihoubi, N. Microwave dehydration of three citrus peel cultivars: Effect on water and oil retention capacities, color, shrinkage and total phenols content. *Ind. Crops Prod.* **2012**. 40. 167–177.
34. Bojarowicz, H., Marszał, M. P., Wnuk, M., Goryński, K., Buciński, A. Determination of Rutin in Plant Extracts and Emulsions by HPLC-MS. *Anal. Lett.* **2011**. 44. 1728–1737.
35. Sandhar, H., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., Sharma, P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *IPS* **2011**. 1.1-17.
36. Stefova, M., Stafilov, T., Kulevanova, S. Flavonoids: HPLC Analysis. En *Encyclopedia of Chromatography* , 3. New York. 2009. 882- 889.
37. Xu, R. et al. Inhibition effects and induction of apoptosis of flavonoids on the prostate cancer cell line PC-3 *in vitro*. *Food Chem.* **2013**. 138, 48–53
38. Xu, R., Ye, Y., Zhao, W. Extraction and isolation of natural products. En *Introduction to natural products chemistry*. New York, 2010. 5–24.
39. Andersen, O., Markham, K. Flavans and proanthocyanidins. *Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications*. New York. 2006. 617–749.
40. Rice, C., Nicolas, M., George, P. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**. 20. 933– 956.
41. Pan, G., Yu, G., Zhu, C., Qiao, J. Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS). *Ultrason. Sonochem.* **2012**. 19. 486–490.
42. Zhang, H.-F., Yang, X.-H. & Wang, Y. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends Food Sci. Technol.* **2011**. 22, 672–688

43. Crupi, P., Coletta, a., Milella, R., Perniola, R., Gasparro, M., Genghi, R., Antonacci, D. HPLC-DAD-ESI-MS analysis of flavonoid compounds in 5 seedless table grapes grown in Apulian Region. *J. Food Sci.* **2012**. 77. 174–181.
44. Hasnat, A., Pervin, M., Lim, B. O. Acetylcholinesterase inhibition and in vitro and in vivo antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* grown on germinated brown rice. *Molecules* **2013**. 18. 6663–6679.
45. Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L., Zhang, Y. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food Chem. Toxicol.* **2011**. 49, 2689–2696
46. Gaikwad, P., Barik, A., Priyadarsini, K., Rao, B. Antioxidant activities of phenols in different solvents using DPPH assay. *Res. Chem. Intermed.* **2010**. 36. 1065–1072
47. Voet, D., Voet, J., Pratt, C. Transporte de electrones y fosforilación oxidativa in *Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular*. 2, España, 2009. 585–586.
48. Mckee, J. T., Mckee, J. Metabolismo aerobio II: transporte electronico y fosforilación in *Bioquímica la base molecular de la vida*. 3, España, 2003. 318–329.
49. Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L. Fosforilación oxidativa in *Bioquímica*. 6, España, 2008. 514–521.
50. Charles, D. Antioxidant assays. *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*. New York. 2013. 9–39.
51. Marina, D., Avella, G., Alberto, C., García, O. & Cisneros, A. M. Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. *Simp. Metrol.* 1–5 (2008). at <http://cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf>
52. Cicco, N., Lanorte, M., Paraggio, M., Viggiano, M., Lattanzio, V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem. J.* **2009**. 91 107–110
53. Soarez, L., Bassani, V., Ortega, G., Petrovick, P. Determinación de flavonoides totales para el control de calidad de extractos acuosos de *Phyllanthus niruri* L. *Bonaerense*. **2003**. 22, 203- 207.
54. Arnao, M. B., Cano, A. & Acosta, M. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Radic. Res.* **1999**. 31. 89–96.
55. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice, C. Antioxidant activity applying an improved abts radical. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**. 26. 1231–1237.
56. Aiyegoro, O. & Dyk, S. The antioxidant properties, cytotoxicity and monoamine oxidase inhibition abilities of the crude dichloromethane extract of *Tarchonanthus camphoratus* L. leaves. *African J. Biotechnol.* **2011**. 10. 17297–17304.

57. Marina, L., Carvajal, p., Turbay, S., Rojano, B., Alvarez, L., Restrepo, S., Alvarez, J., Bonilla, K., Ochoa, C., Sánchez, N. Algunas especies de *Passiflora* y su capacidad antioxidante *Rev. Cuba. plantas Med.* **2011.** 16. 354–363.
58. Kesik, M., Kanik, F., Turan, J., Kolb, M., Timur, S., Bahadir, M., Toppare, L. An acetylcholinesterase biosensor based on a conducting polymer using multiwalled carbon nanotubes for amperometric detection of organophosphorous pesticides. *Sensors Actuators B Chem.* **2014.** 205. 39–49.
59. Brenner, T., Nizri, E., Irony-Tur-Sinai, M., Hamra-Amitay, Y., Wirguin, I. Acetylcholinesterase inhibitors and cholinergic modulation in *Myasthenia Gravis* and neuroinflammation. *J. Neuroimmunol.* **2008.** 201-202. 121–127.
60. Salazar, M., Peralta, C., Pastor, F. Inhibidores de la acetilcolinesterasa in *Tratado de psicofarmacología. Bases y aplicación clínica.* 2. Buenos Aires, 2009. 260–280 .
61. Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J., Moro, M., Portolés, A. Sistema nervioso parasimpático: fármacos colinomiméticos in *Farmacología basica y clínica.* 18. Buenos Aires. 2008. 121–132.
62. Heim, K. E., Tagliaferro, A., Bobilya, D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabol ismand structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **2002.** 13. 572–584.
63. Özcan, E. Ultrasound assisted extraction of phenolics from grape pomace. Master. Middle east technical university .2006.
64. Kuljarachanan, T., Devahastin, S., Chiewchan, N. Evolution of antioxidant compounds in lime residues during drying. *Food Chem.* **2009.** 113. 944–949
65. Hayat, K., Zhang, X., Chen, H., Xia, S., Jia C., Zhong, F. Liberation and separation of phenolic compounds from *Citrus mandarin* peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity. *Sep. Purif. Technol.* **2010.** 73. 371–376.
66. Hegazy, A., Ibrahim, M. I. Antioxidant Activities of Orange Peel Extracts. *World Appl. Sci. J.* **2012.** 18, 684–688
67. Barros, H., Ferreira, T., Genovese, M. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of *Citrus* from Brazil. *Food Chem.* **2012.** 134. 1892–1898.
68. Moulehi, I., Bourgou, S., Ourghemmi, I., Saidani, M. Variety and ripening impact on phenol composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulate* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurium* L.) seeds extracts. *Ind. Crops Prod.* **2012.** 39. 74–80.
69. Asikin, Y. et al. Volatile aroma components and antioxidant activities of the flavedo peel extract of unripe Shiikuwasha (*Citrus depressa* Hayata). *J. Food Sci.* **2012.** 77, 469–75.
70. Luengo, E., Álvarez, I., Raso, J. Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2013.** 17. 79–84

71. Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J. food drug Anal.* **2002**. *10*. 178–182.
72. Muñoz, A., Vargas, L., Stashenko, E., Kouznetsov, V. Improved Trolox® equivalent antioxidant capacity assay for efficient and fast search of new antioxidant agent. *Anal. Chemistry Lett.* **2011**. *1*. 86–102.
73. Cardona, E., Rios, L., Restrepo, G. Extracción del carotenoide licopeno del tomate chonto (*Lycopersicum esculentum*). *Vitae.* **2006**. *13 (2)*. 44–53.
74. Tamayo, S. extracción y evaluación del aceite esencial en dos especies cultivadas en la región del Quíndio. Semillero de investigación. Universidad del Quíndio. Armenia. 2009.
75. Guimaraes, R., Barros, L., Barreira, J., Sousa, M., Carvalho, A., Ferreira, I. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits, grapefruit, lemon, lime and orange. *Food. Chem. Toxicol.* **2010**. *48*. 99–106.
76. Loizzo, M., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., Luca, D., Colica, C., Minichini, F. Evaluation of *Citrus aurantifolia* pell and leaves extracts for their chemical composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Sci. food Agric.* **2012**.

ANEXOS

Anexo A. Informe ensayo bromatológico realizado en el CICTA

	LABORATORIO DE ALIMENTOS -CICTA-	INFORME DE ENSAYO	FOITIE.01
			Versión: 03
			Página 1 de 2

INFORME DE ENSAYO

Número: 206-15

FECHA: Abril 17 de 2015
NOMBRE/EMPRESA: Eileen Guerra
DIRECCIÓN: Cra 1ª manzana G Casa 30
TELÉFONO: 3173767509

CÓDIGO DE LA MUESTRA: M205-15
PRODUCTO: Cáscara de naranja

FECHA DE RECEPCIÓN: Abril 8 de 2015
REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS: Abril 10 a Abril 15 de 2015.

DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS:

1. La humedad se determinó por medio de secado en estufa siguiendo la metodología descrita en la Norma internacional AOAC 925.10 18th Edición.
2. La determinación de cenizas se realizó en un horno hasta peso constante siguiendo la Norma internacional AOAC 923.03 18th Edición.
3. La proteína fue analizada por el método de Kjeldahl, procedimiento interno validado GOMEPH.01, versión 5, 2014-04-23 basado en AOAC 920.87 Ed.18:2005
4. La determinación de grasa se realizó por extracción con solvente en equipo Soxhlet siguiendo la Norma internacional AOAC 920.85 Ed.18:2005
5. La fibra cruda se llevó a cabo siguiendo la norma internacional AOAC 930.20 18th Edición mediante una hidrólisis básica y ácida a la muestra.
6. Los carbohidratos totales y el valor calórico fueron calculados matemáticamente según la resolución 333 del 2011 del Ministerio de Protección Social.

CICTA - Laboratorio de Alimentos
Km. 2 Vía al Refugio, Sede UIS Guatiguará, Piedecuesta - Santander
Telefax (7) 6 55 08 04
cicta@uis.edu.co



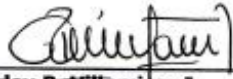
Anexo A. Continuación

	LABORATORIO DE ALIMENTOS -CICTA-	INFORME DE ENSAYO	FOITIE.01
			Versión: 03
			Página 2 de 2

TABLA 1. RESULTADOS ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO M205-15

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO	MÉTODO DE ANÁLISIS
Humedad	g/100 g mtra	75,47	AOAC 925.10 18th Edición-Gravimétrico
Ceniza	g/100 g mtra	1,23	AOAC 923.03 18th Edición-Gravimétrico
Grasa	g/100 g mtra	0,25	AOAC 920.85 Ed.18:2005-Gravimétrico
Proteína	g/100 g mtra	1,36	Procedimiento Interno Validado GOMEPH.01
Fibra	g/100 g mtra	3,83	AOAC 930.20 18th Edición
Carbohidratos totales	g/100 g mtra	21,69	--
Valor calórico	kcal/100 g mtra	94,45	--

REVISÓ


Arley R. Villamizar J.
Químico PQ2839
 Coordinador de Calidad

APROBÓ


Luis Javier López Giraldo
Ph.D. Qca, Bioquímica y Ciencia de Alimentos
 Director

NOTA: ESTE INFORME DE RESULTADOS CORRESPONDE ÚNICAMENTE A LA MUESTRA ANALIZADA, NO PUEDE SER NI PARCIAL NI TOTALMENTE REPRODUCIDO SIN LA APROBACIÓN DEL LABORATORIO

FIN DEL INFORME

Anexo B. Rendimientos de la extracción de las muestras en estado fresco y seco respectivamente

Muestra	Replica	Peso de la muestra (g)	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
SXF	1	30,1405	3,7698	12,5
	2	30,0389	2,0956	7,0
	3	30,0037	2,1455	7,1
UF	1	30,1103	2,5535	8,5
	2	30,0683	2,5155	8,7
	3	30,0500	2,4452	8,1
MF	1	100,0309	8,2026	8,2
	2	100,0375	4,5339	4,5
	3	100,0466	3,5232	3,5

Nota: SXF: *Soxhlet* con muestra en estado fresco, UF: ultrasonido con muestra en estado fresco, MF: microondas con muestra en estado fresco.

Muestra	replica	Peso de la muestra (g)	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
SXS	1	30,0076	9,9325	33,1
	2	30,0046	7,0565	23,5
	3	30,0110	8,6068	28,7
US	1	30,0096	3,5354	11,8
	2	30,0433	4,4600	14,8
	3	30,0906	5,7062	19,0
MS	1	100,1533	10,4233	10,4
	2	100,0090	9,9819	10,0
	3	100,0055	8,0478	8,0

Nota: SXS: *Soxhlet* con muestra en estado seco, US: ultrasonido con muestra en estado seco, MS: microondas con muestra en estado seco.

Anexo C. Absorbancias de la curva de calibración del ácido gálico (AG) para polifenoles totales

Patrones de AG (mg/L)	Absorbancia 765 nm
50	0,0642
	0,0653
	0,0657
	0,0662
	0,0664
	0,0671
100	0,1358
	0,1353
	0,1357
	0,1358
	0,1359
	0,1362
150	0,2117
	0,2118
	0,2122
	0,2128
	0,2132
	0,2137
250	0,3757
	0,3762
	0,3766
	0,3769
	0,3772
	0,3779
500	0,7580
	0,7591
	0,7600
	0,7605
	0,7610
	0,7616

Anexo D. Ecuaciones para la determinación de la cantidad de polifenoles y flavonoides totales

Cuando se tienen diluciones de una alícuota se debe calcular la concentración inicial de esta, para esto se tiene:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

C₁: concentración que se quiere conocer

V₁: volumen de la alícuota

C₂: concentración hallada por medio de la ecuación de la recta

V₂: volumen de la dilución

Conociendo esta concentración, se calcula la cantidad de compuesto de interés presente en la alícuota:

$$C_1 * V_{alícuota} (L)$$

Teniendo la cantidad de compuesto de interés en la alícuota, se procede a determinar la cantidad de compuesto en el volumen inicial

$$\text{Cantidad de compuesto de interes} * \left(\frac{V_{inicial}}{V_{alícuota}} \right)$$

Al conocer la cantidad de compuesto de interés presente en el volumen inicial, se calcula la cantidad de compuesto en el total del extracto

$$\frac{\text{Cantidad de compuesto en } V_{inicial} * \text{Peso del extracto total}}{\text{Peso del extracto utilizado para el análisis}}$$

Conociendo la cantidad de compuesto de interés se procede a expresarlo en las cantidades deseadas, en este trabajo fue dividido en mil para tener:

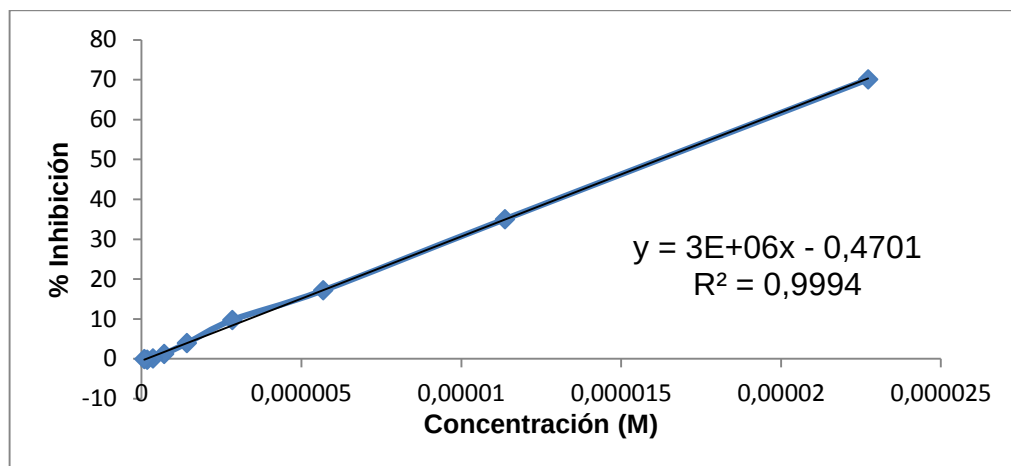
$$\frac{\text{mg de compuesto de interes}}{\text{g extracto seco}}$$

Nota: la alícuota fue tomada de la dilución que se hizo del extracto a 1 mL. Para polifenoles, se tomaron 0,02mL y esta fue llevada a un volumen final de 10 mL. Para flavonoides se tomo una alícuota de 0,5 mL y se llevó a un volumen final de 5 mL.

Anexo E. Absorbancias de la curva de calibración de quercetina para flavonoides totales

Patrones de AG (mg/L)	Absorbancia 765 nm
20	0,1693
	0,1695
	0,1692
	0,1700
	0,1701
	0,1700
30	0,2584
	0,2588
	0,2567
	0,2569
	0,2562
	0,2565
40	0,3498
	0,3503
	0,3526
	0,3511
	0,3513
	0,3516
60	0,5374
	0,5358
	0,5379
	0,5372
	0,5349
	0,5351
100	0,9162
	0,9192
	0,9181
	0,9171
	0,9164
	0,9157

Anexo F. Datos y curva del Trolox

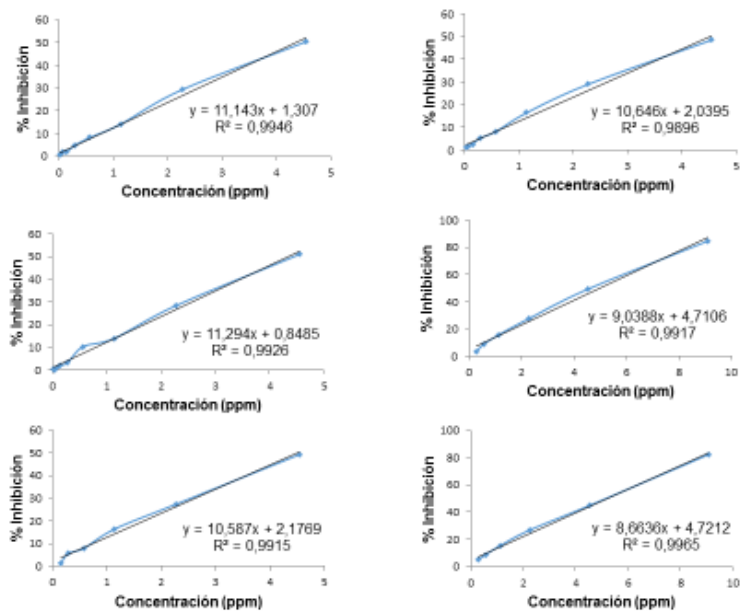


Compuesto	TEAC	SD*(±)	CV
Trolox	1,68E-02	2,94E-04	1,76

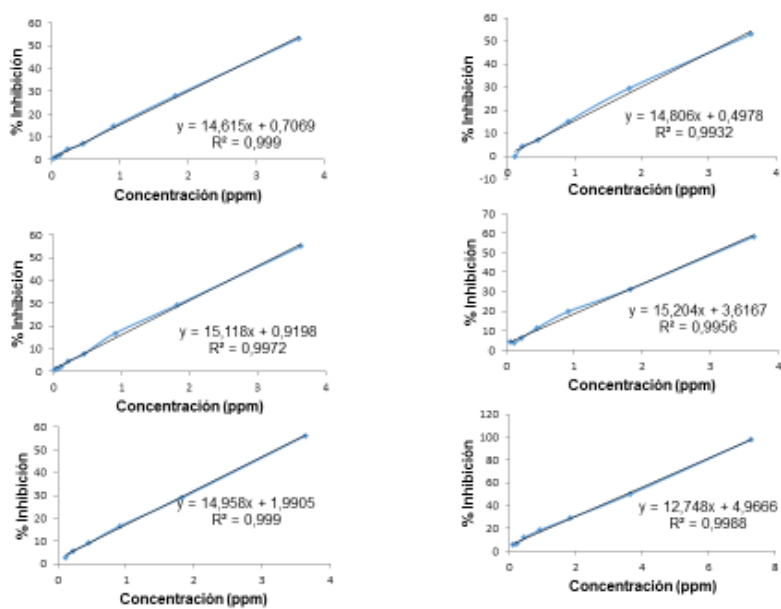
SD*: Desviación estándar para n= 3 replicas

Anexo G. Curvas antioxidante para los patrones de referencia BHT, BHA, Vit E, naringina y naringenina

BHT

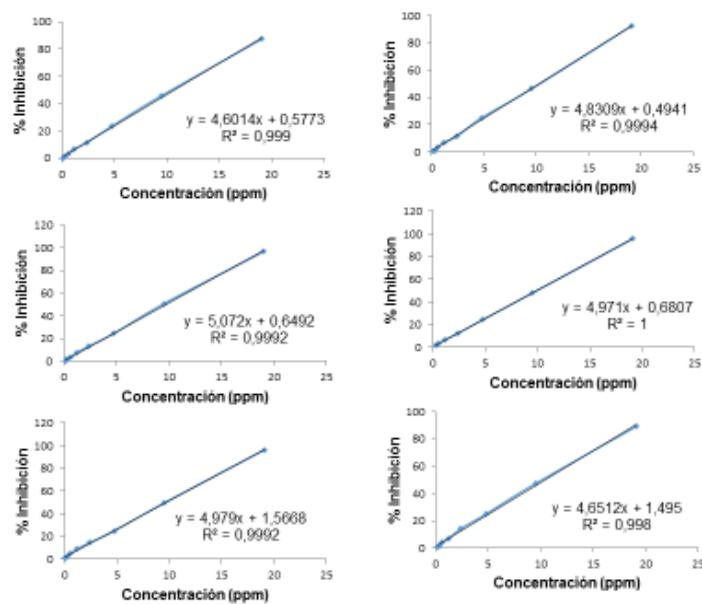


BHA

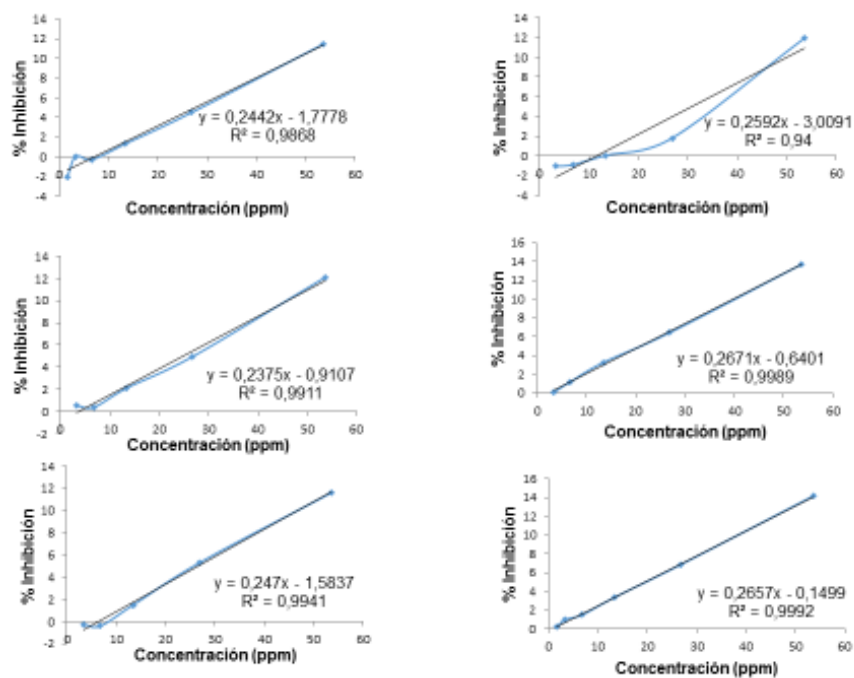


Anexo G. Continuación

Vitamina E

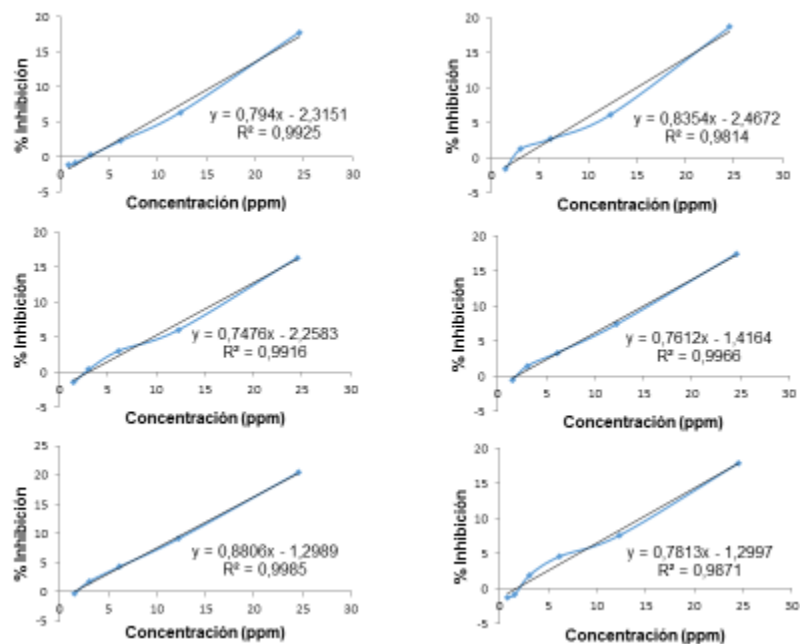


Naringina

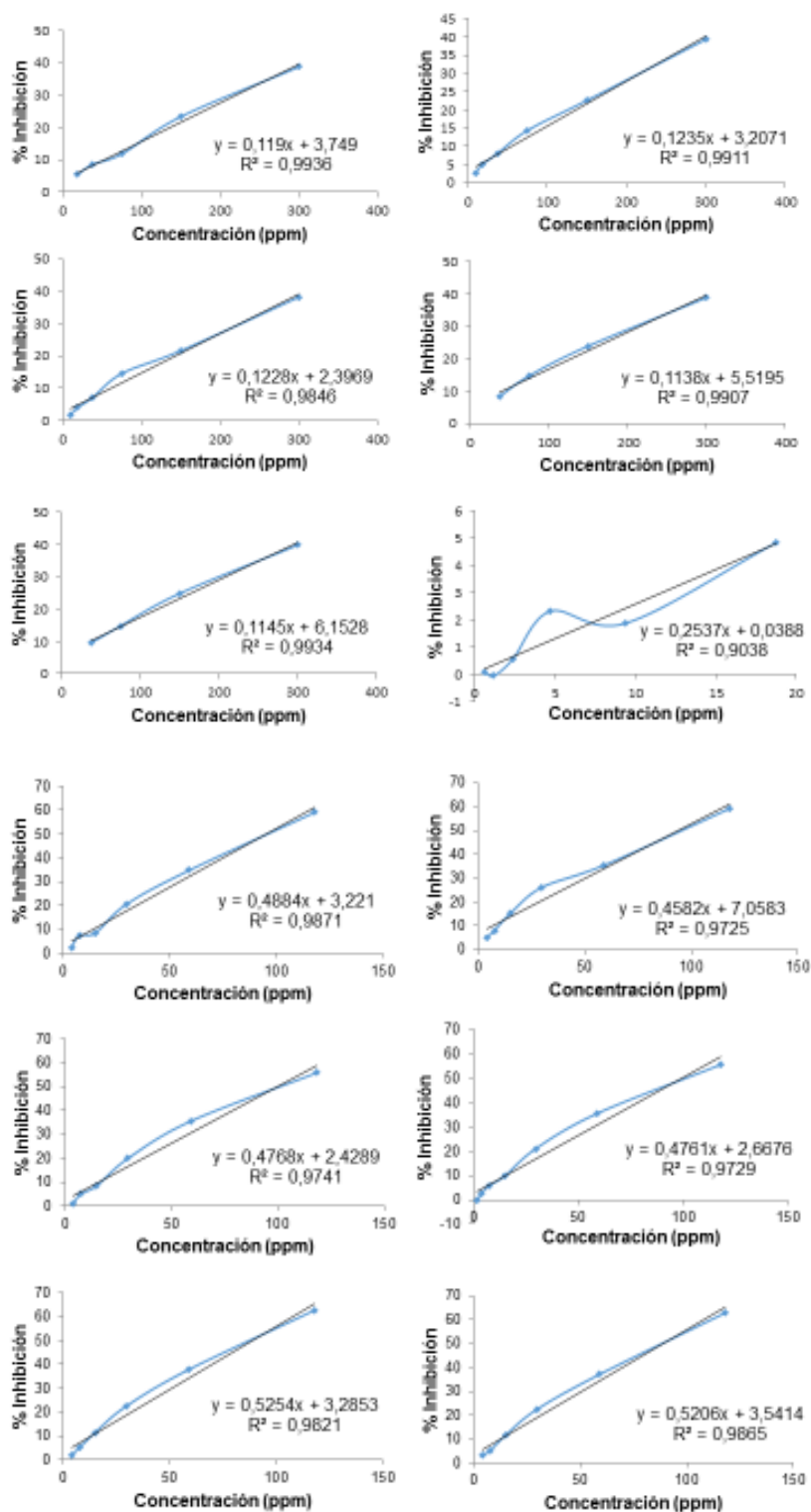


Anexo G. Continuación

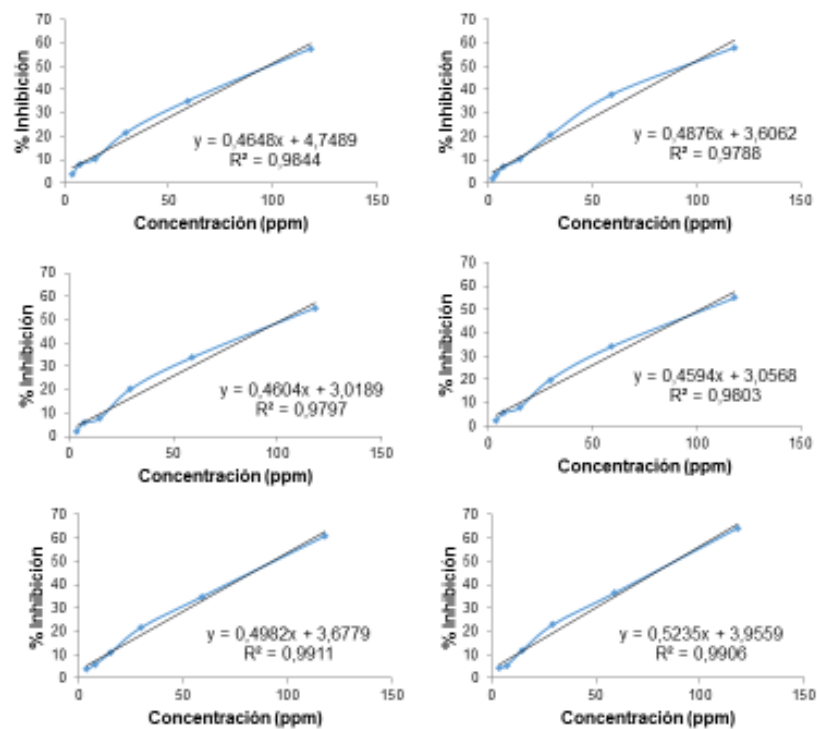
Naringenina



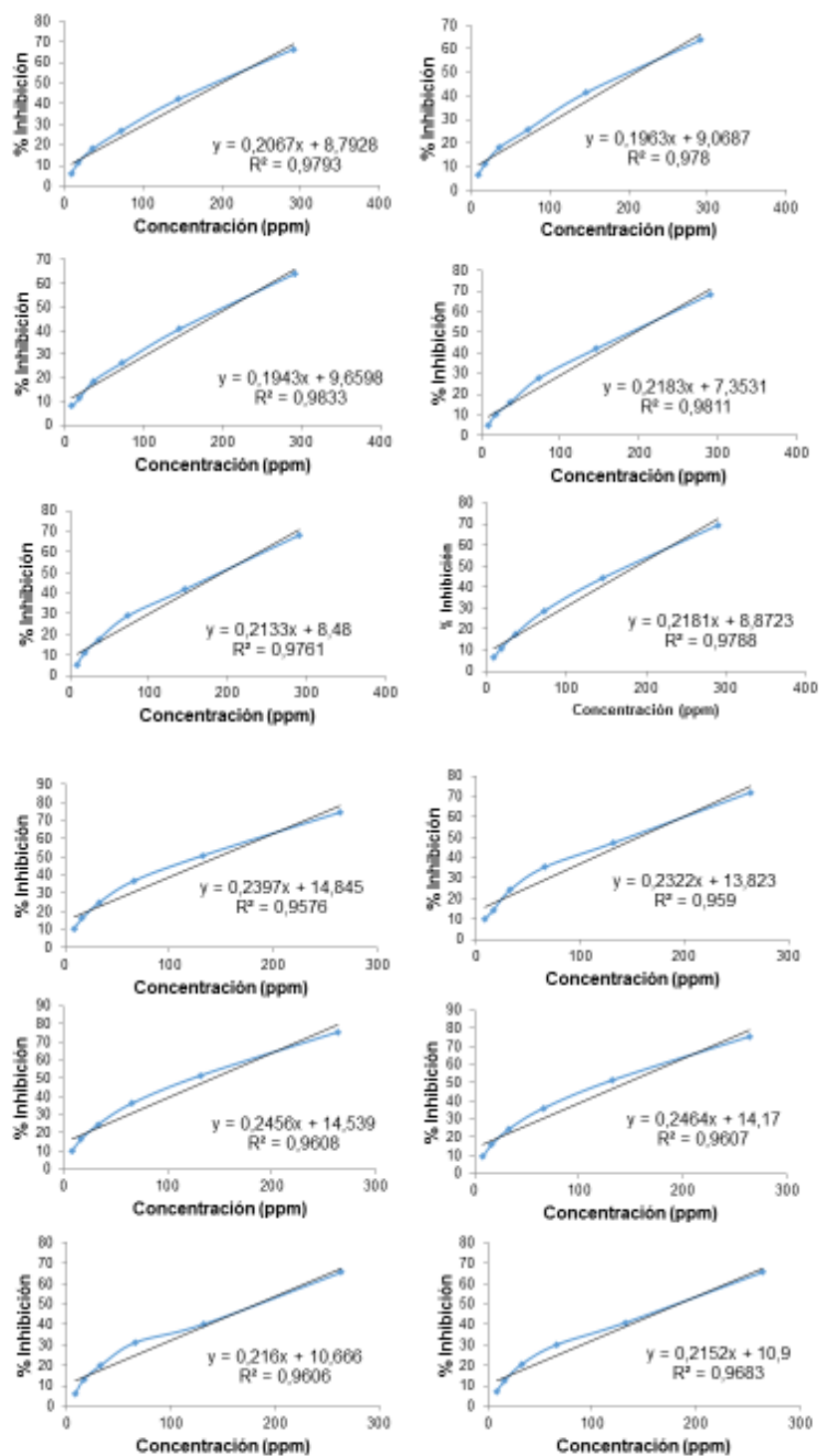
Anexo H. Curvas antioxidante para muestras en estado fresco para método Soxhlet



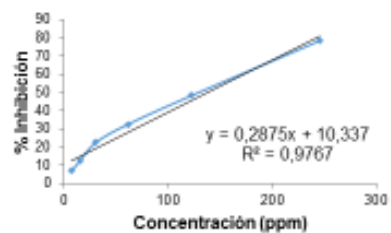
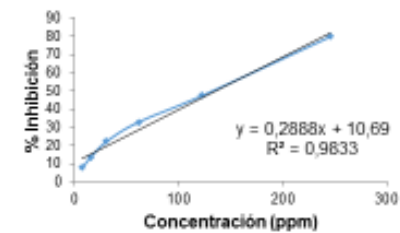
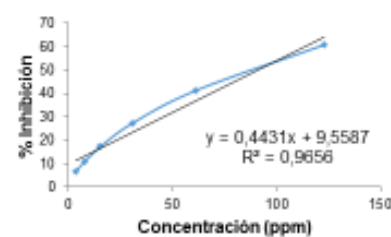
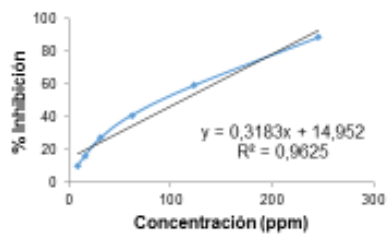
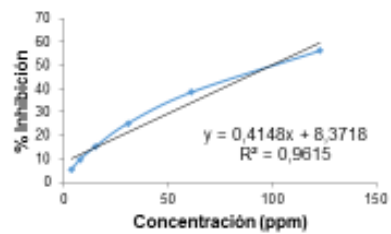
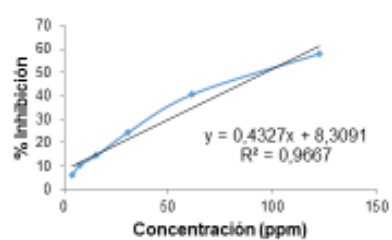
Anexo H. Continuación



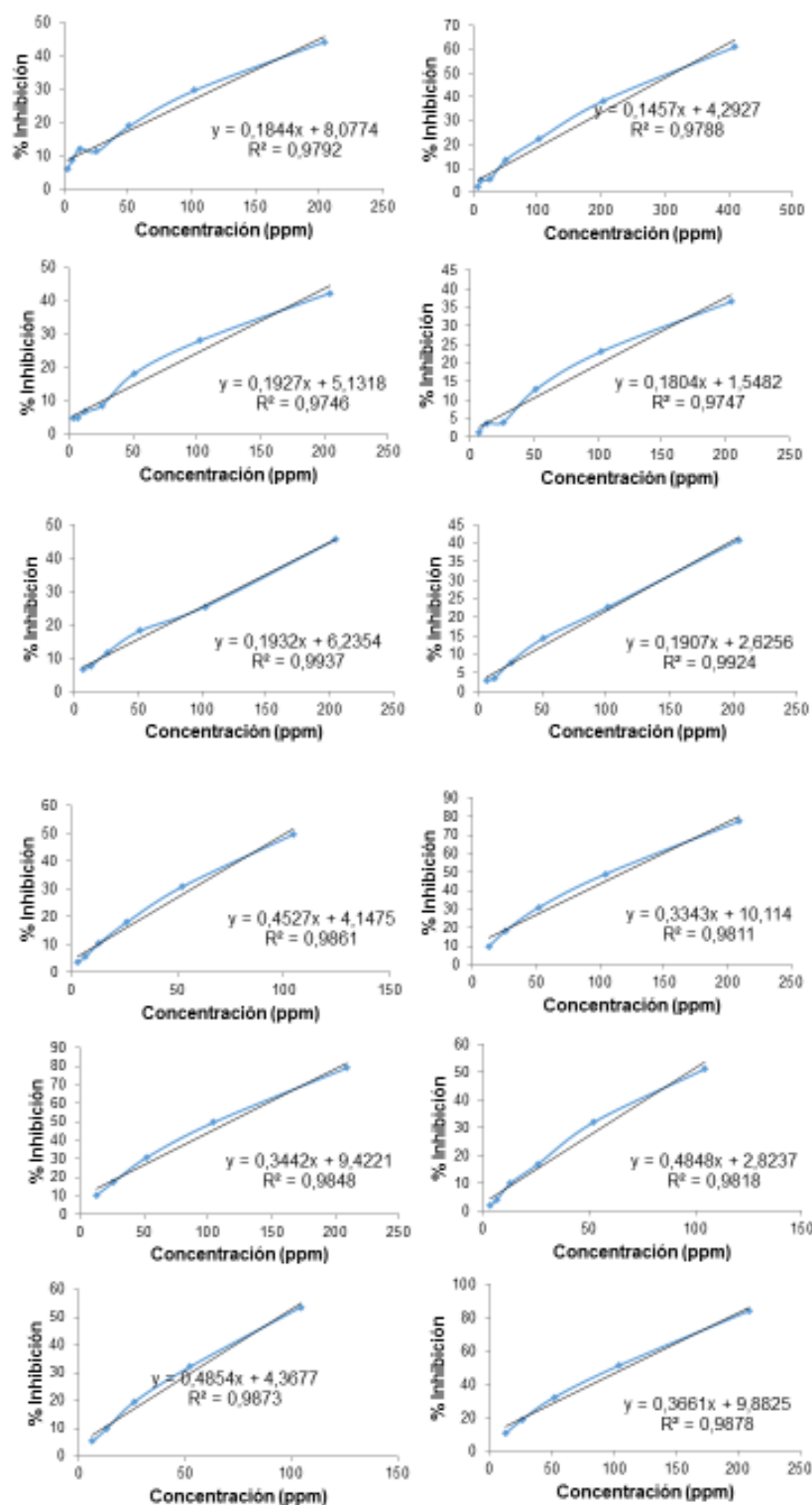
Anexo I. Curvas antioxidante para muestras en estado seco para método Soxhlet



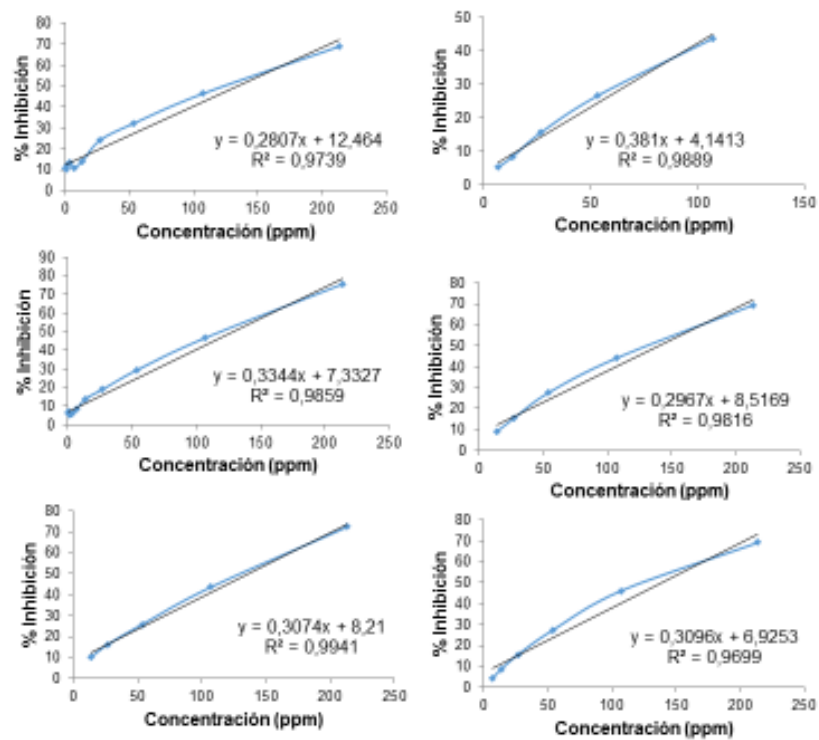
Anexo I. Continuación



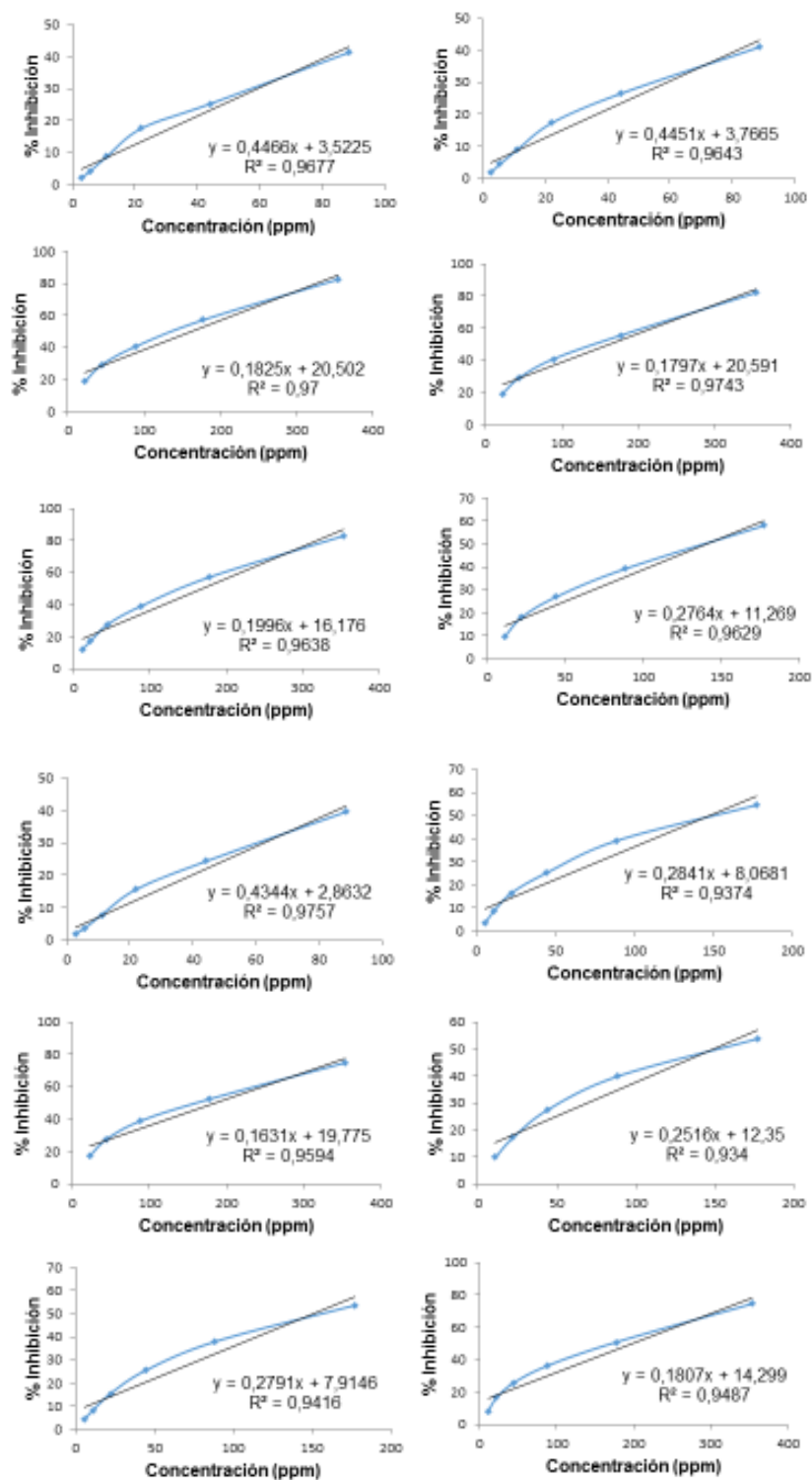
Anexo J. Curvas antioxidante para muestras en estado fresco para EAU



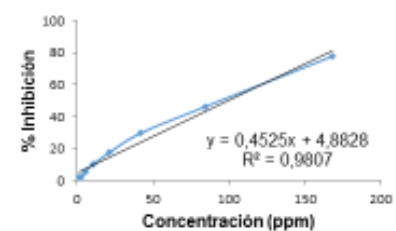
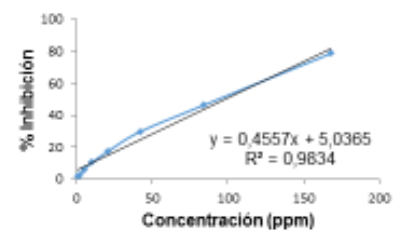
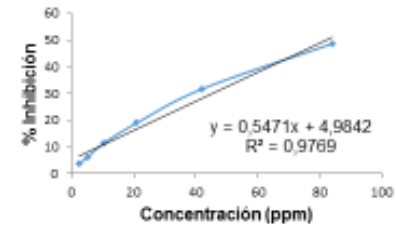
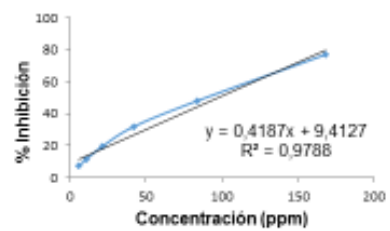
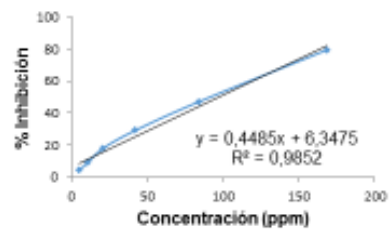
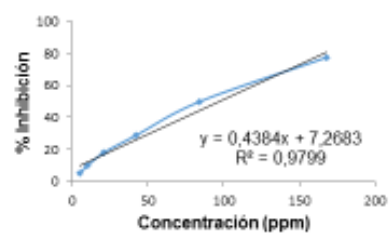
Anexo J. Continuación



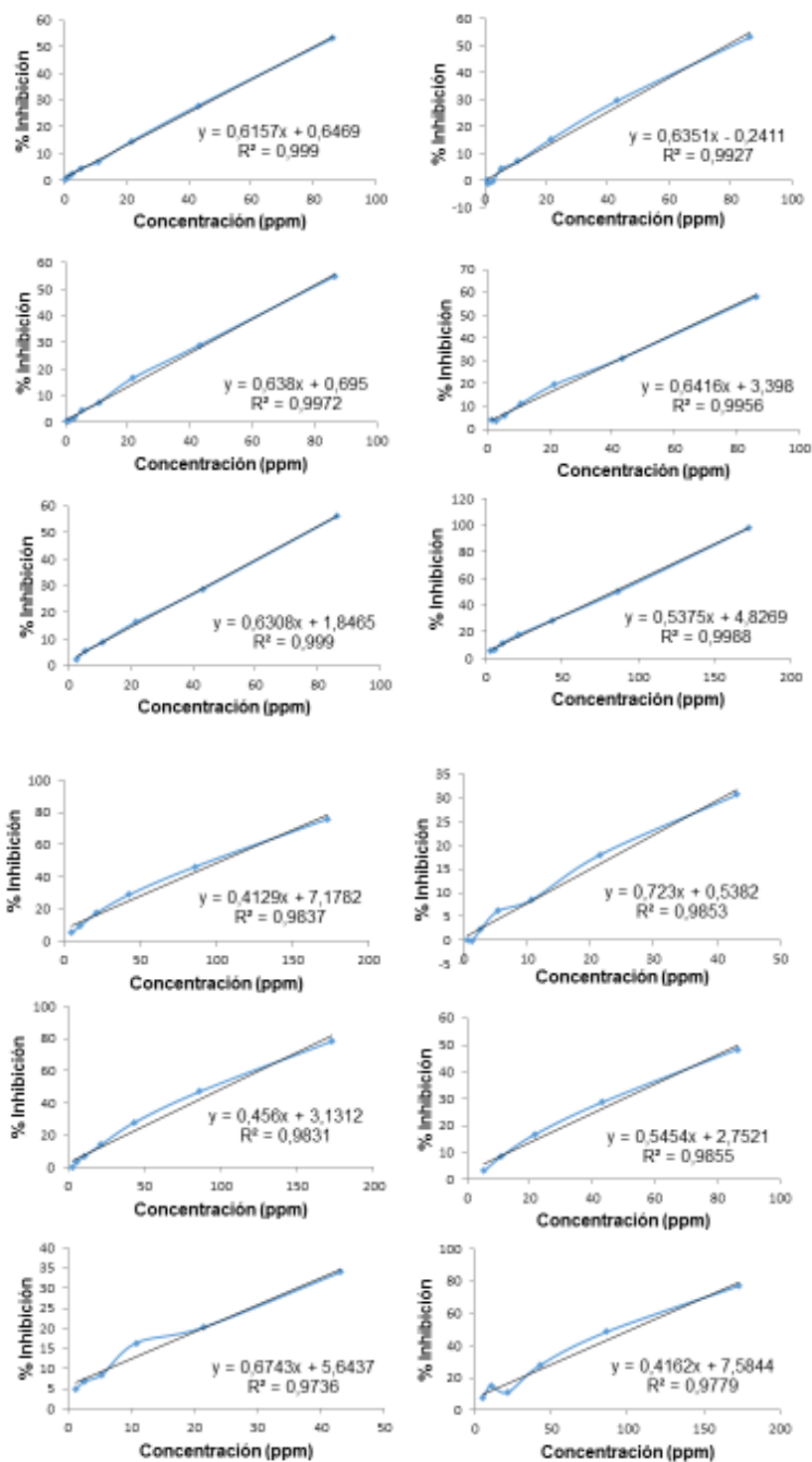
Anexo K. Curvas antioxidante para muestras en estado seco para EAU



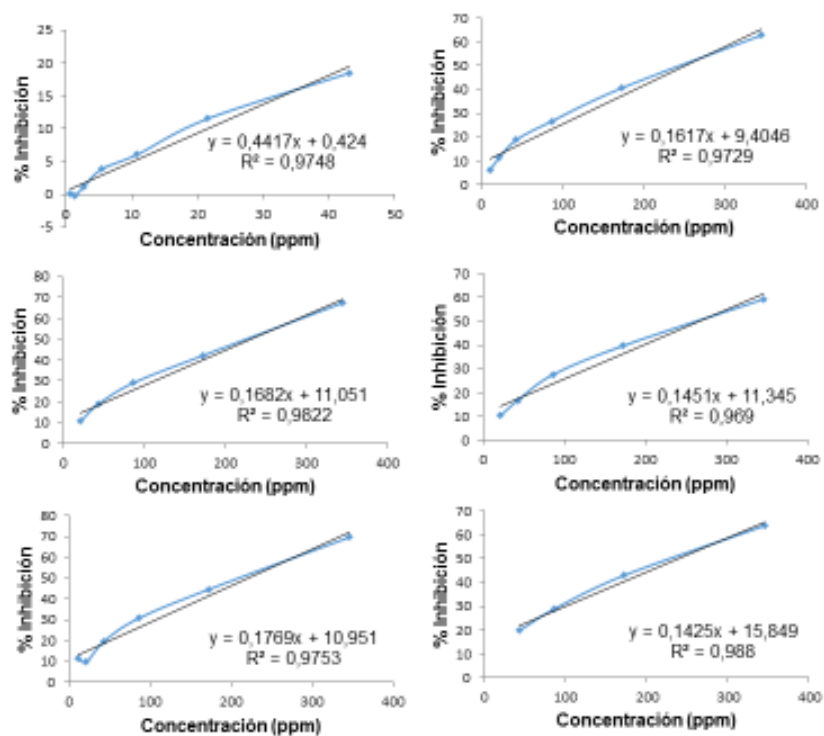
Anexo K. Continuación



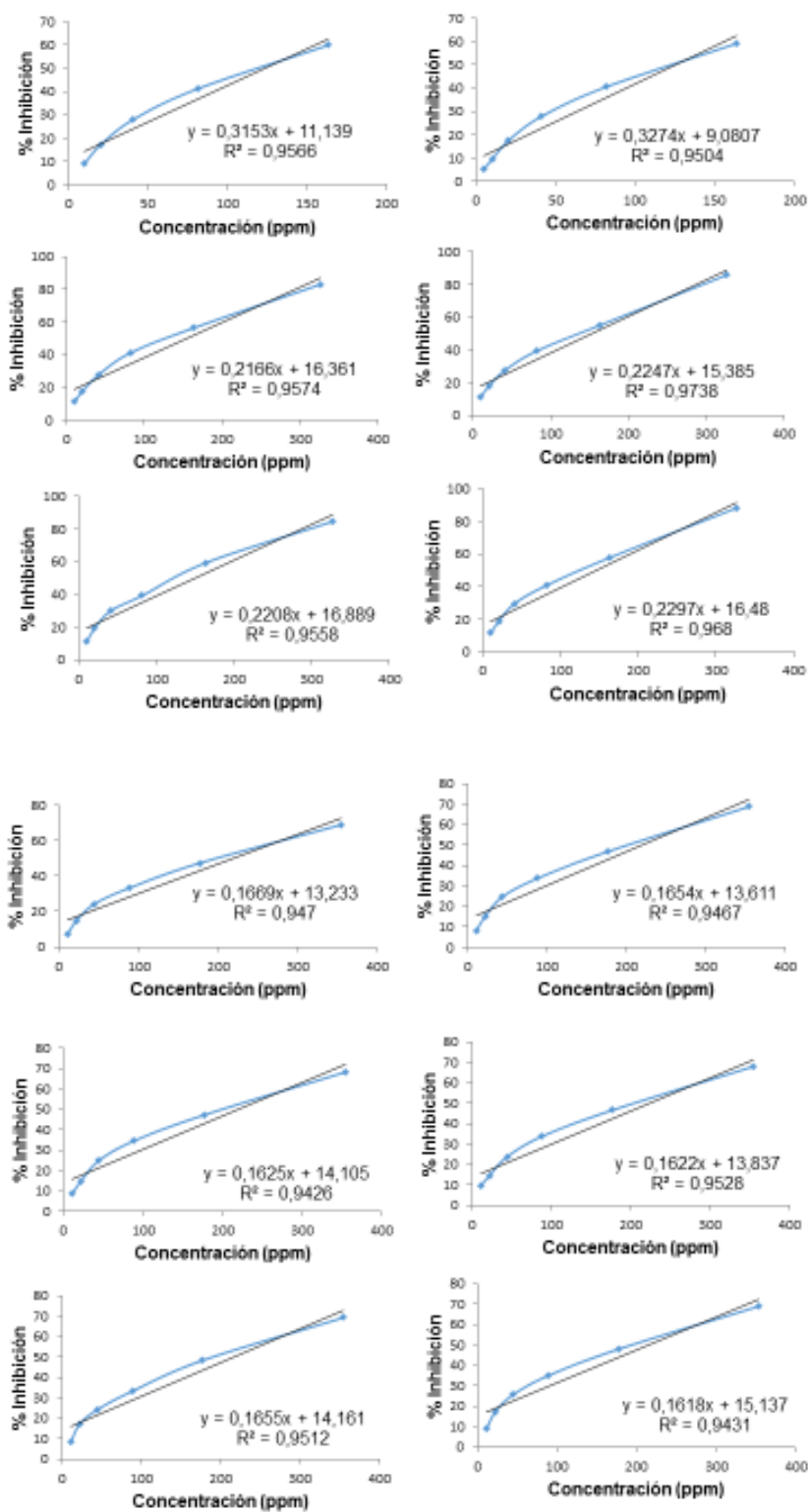
Anexo L. Curvas antioxidante para muestras en estado fresco para EAM



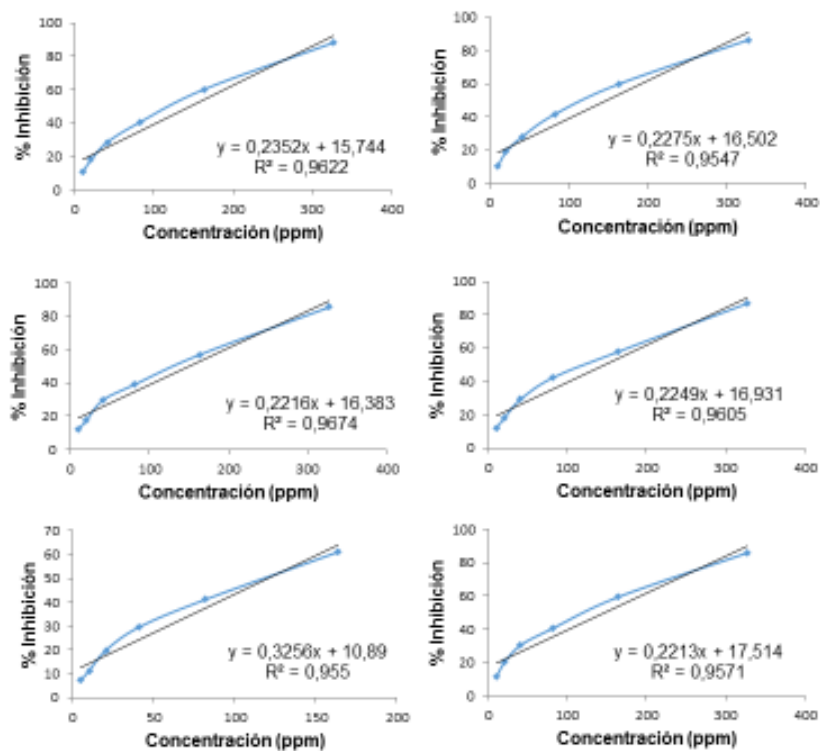
Anexo L. Continuación



Anexo M. Curvas antioxidante para muestras en estado seco para EAM

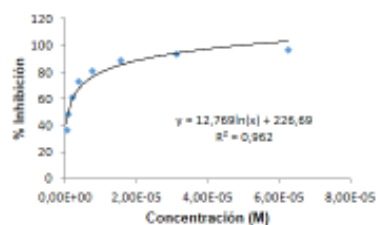
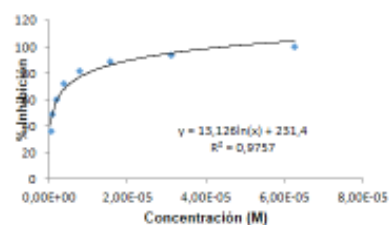
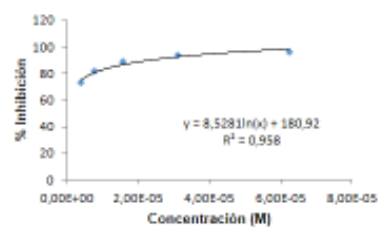
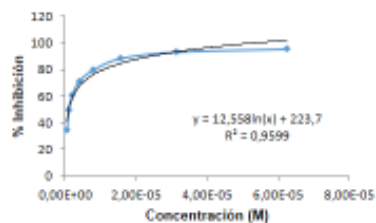


Anexo M. Continuación

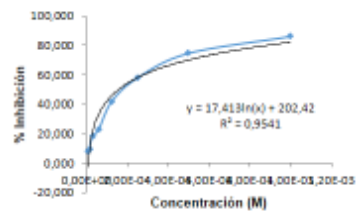
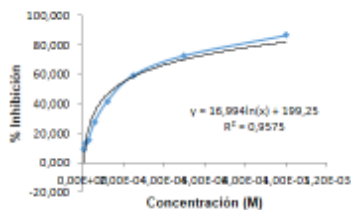
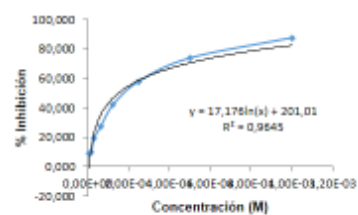
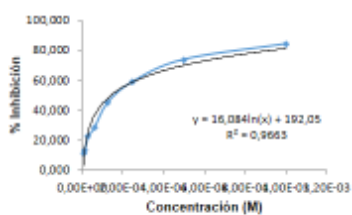


Anexo N. Curvas de inhibición de la enzima AChE de los compuestos de referencia galantamina, naringina y naringenina

Galantamina

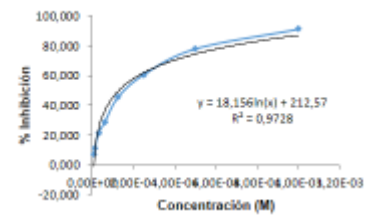
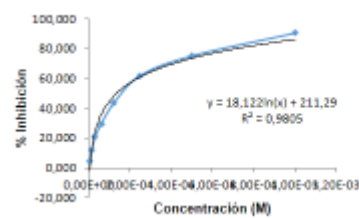
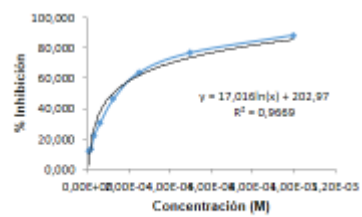
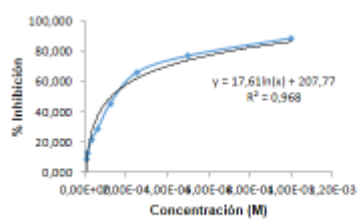


Naringina

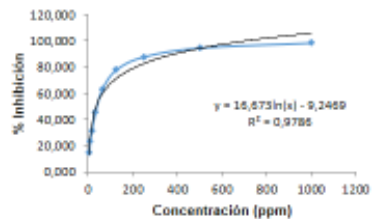
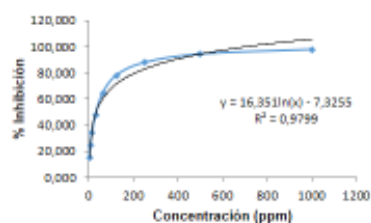
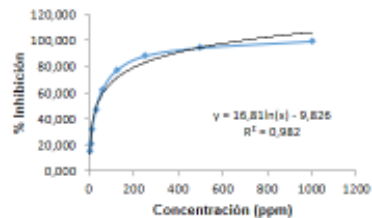
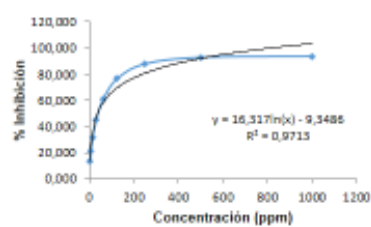
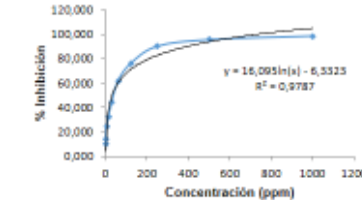
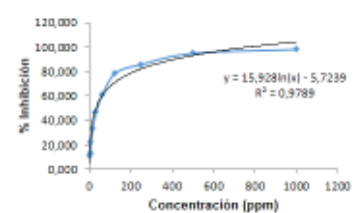
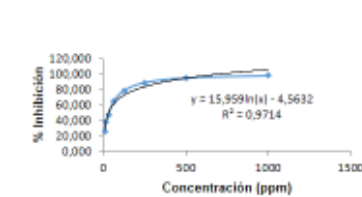
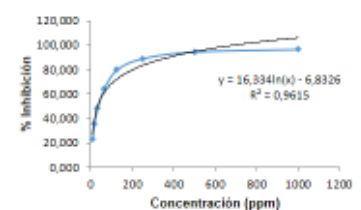
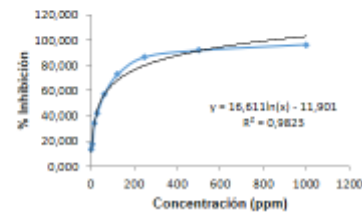
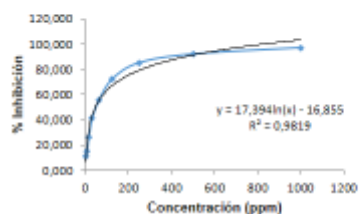
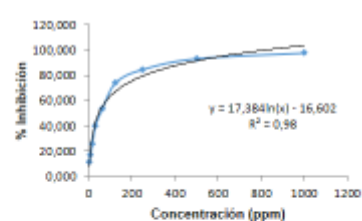
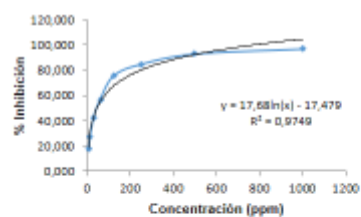


Anexo N. Continuación

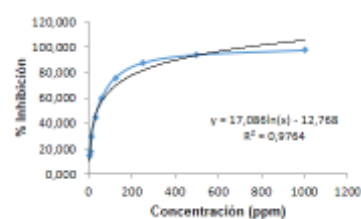
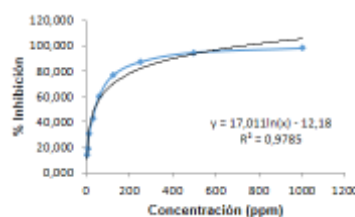
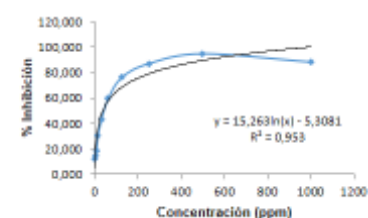
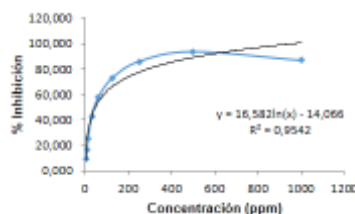
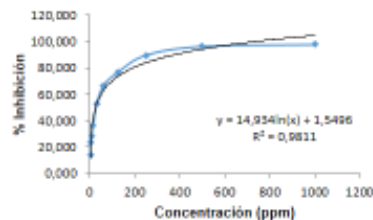
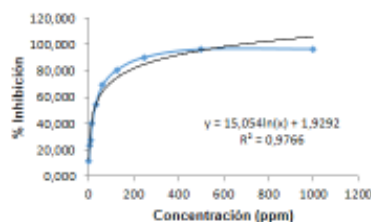
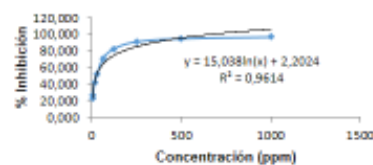
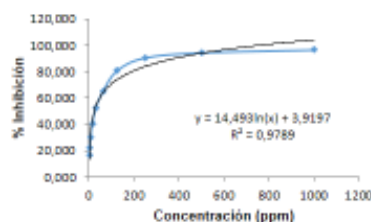
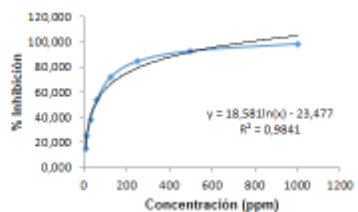
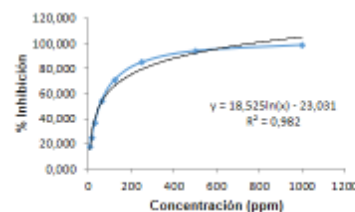
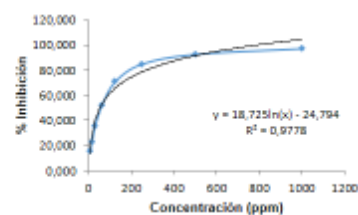
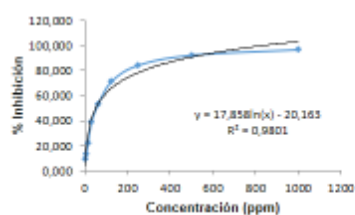
Naringenina



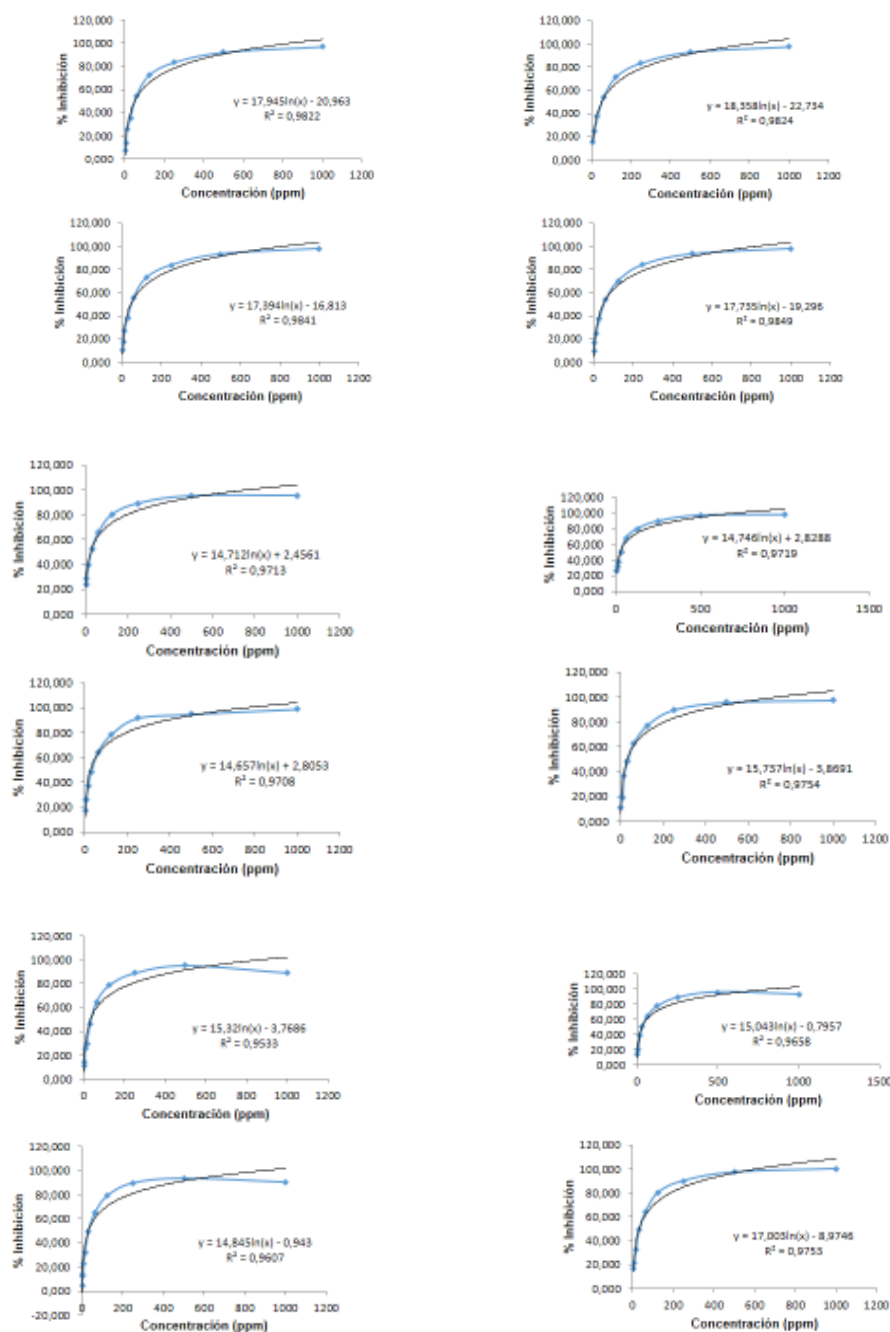
Anexo O. Curvas de inhibición de la AChE para muestras en estado fresco por método Soxhlet



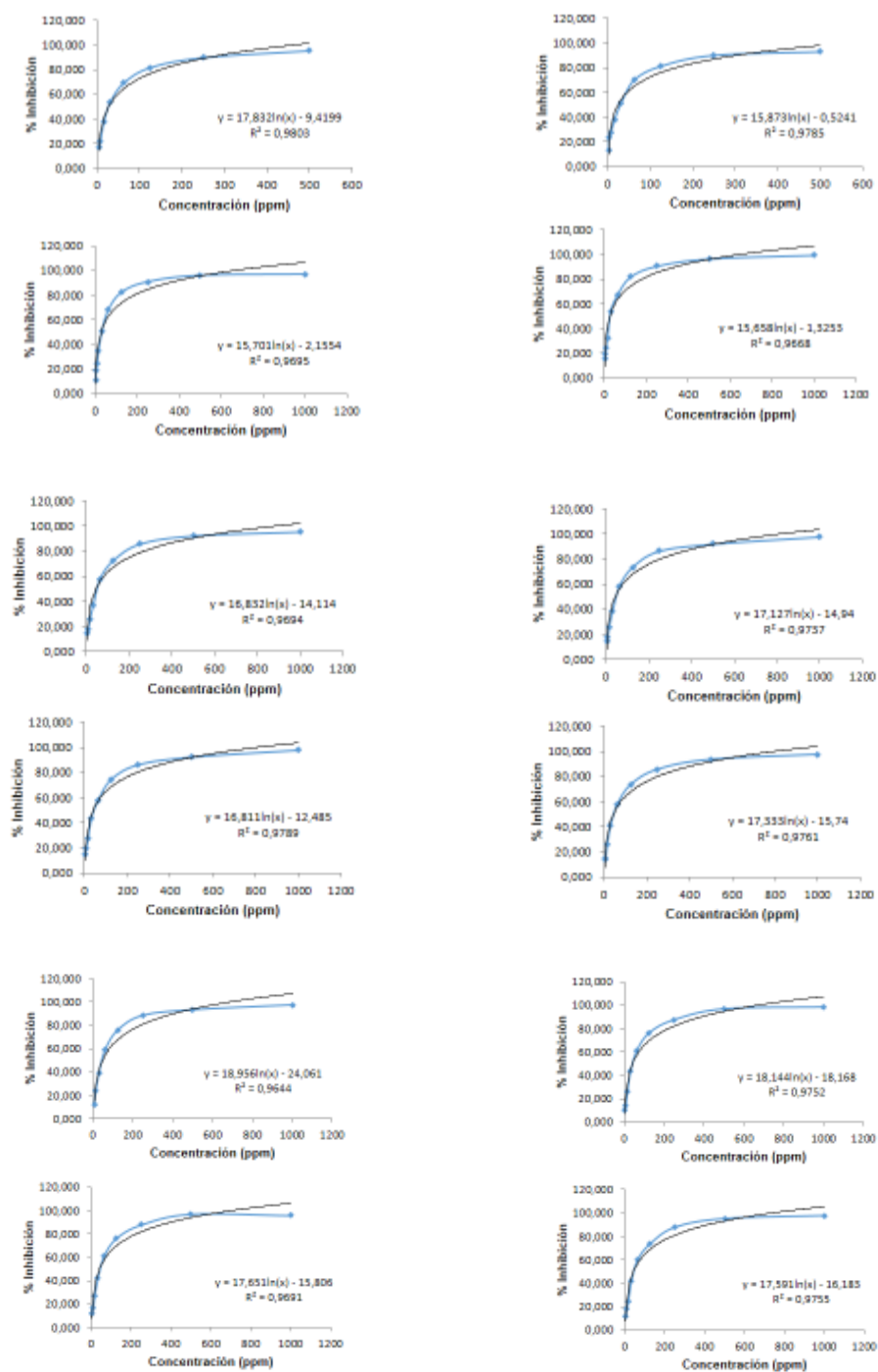
Anexo P. Curvas de inhibición de la AChE para muestras en estado seco por método Soxhlet



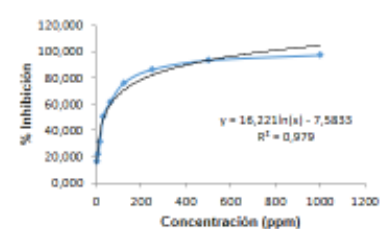
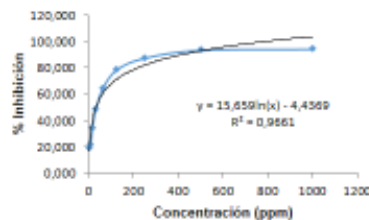
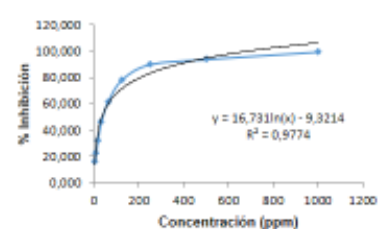
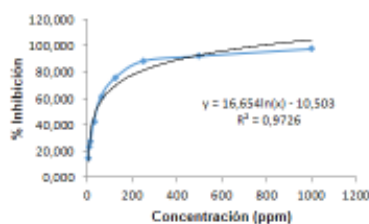
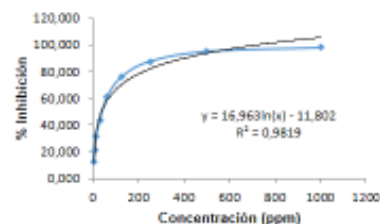
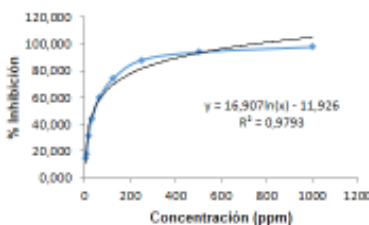
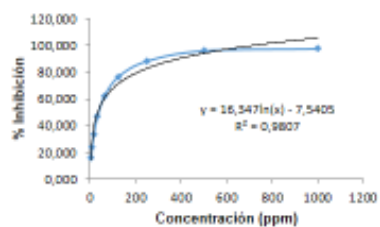
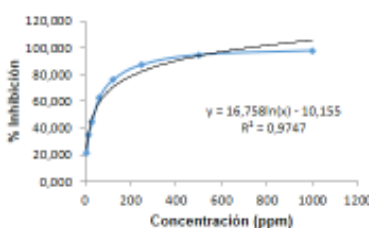
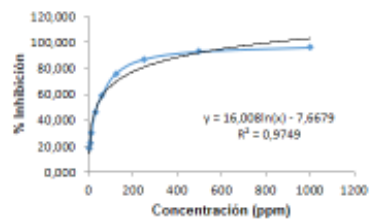
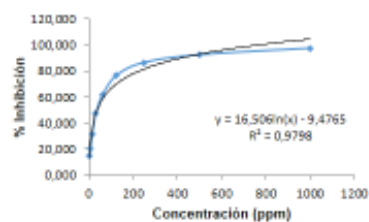
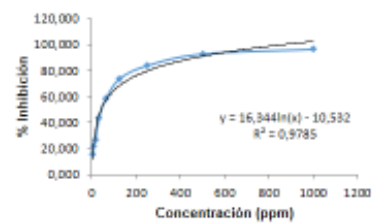
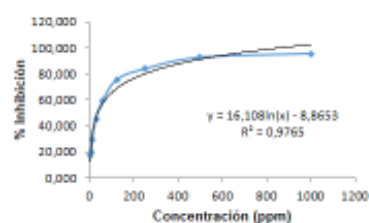
Anexo Q. Curvas de inhibición de la AChE para muestras en estado fresco por EAU



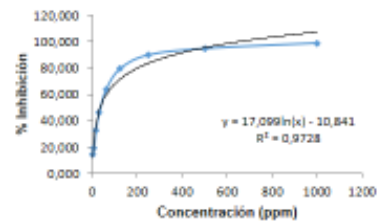
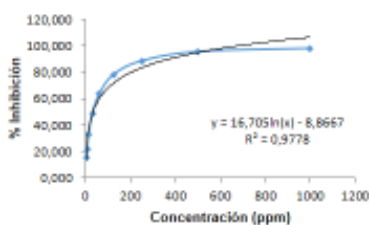
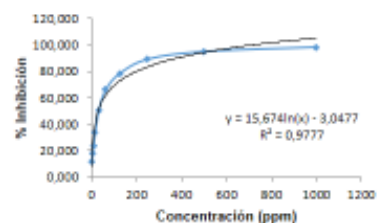
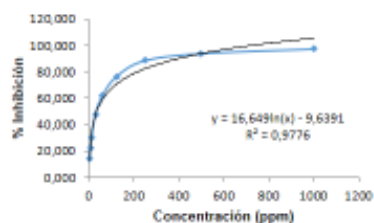
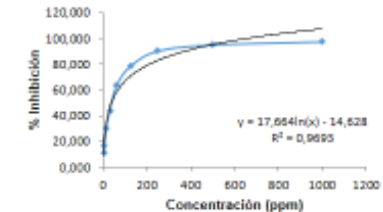
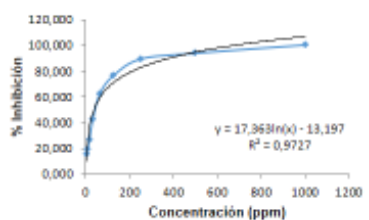
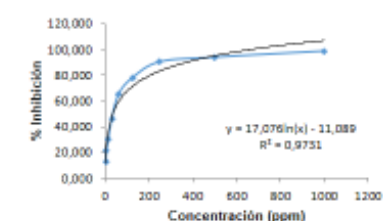
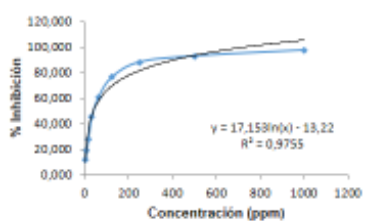
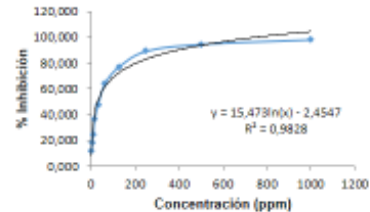
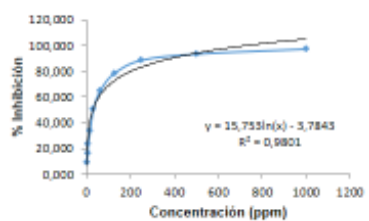
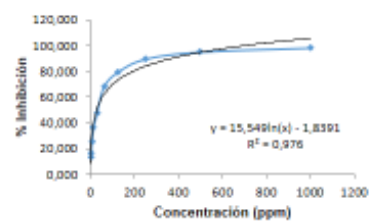
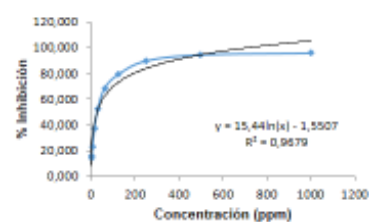
Anexo R. Curvas de inhibición de la AChE para muestras en estado seco por EAU



Anexo S. Curvas de inhibición de la AChE para muestras en estado fresco por EAM



Anexo T. Curvas de inhibición de la AChE para muestras en estado seco por EAM



Anexo U. Evidencia de la participación en el XIX Simposio Nacional de
Química Orgánica

