



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA



**Elaboración de una crema a base
del extracto de *Callistemon citrinus*
con propiedad antioxidante.**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener

El título profesional de

QUIMICA FARMACOBIOLOGA

Presenta

DULCE IVETTE MORALES ALCARAZ

Asesora de tesis:

Dra. Patricia Ríos Chávez

Morelia, Michoacán. Julio del 2017

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE FITOBIOQUÍMICA (B4) DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA (U.M.S.N.H) BAJO LA DIRECCIÓN DE LA D.C. PATRICIA RÍOS CHÁVEZ

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, D.C Patricia Ríos Chávez, mi más amplio agradecimiento por brindarme la oportunidad de realizar mi proyecto de tesis en el laboratorio de Fitobioquímica, por guiarme durante todo el desarrollo de la tesis, por compartir su conocimiento científico, por el apoyo incondicional y la confianza depositada en el proyecto.

A mis sinodales, por el gran apoyo y buena disposición siempre. Al I.Q Arturo Chávez, D.C Daniel Godínez y M.C Raquel Santillán, quienes se han tomado el arduo trabajo de transmitirme sus diversos conocimientos, especialmente del campo y de los temas que corresponden a mi profesión. Por encaminarme en el camino correcto con sus sabios consejos.

Al D.C Rafael Salgado y M.C Alejandra Hernández por la revisión y corrección de la tesis, por los consejos y por el gran apoyo brindado durante este proceso.

A mis Papás por ser mis pilares más grandes, por el gran apoyo incondicional que me han brindado siempre, por la confianza depositada, por sus sabios consejos y por estar presentes, porque sin ellos no hubiera logrado tanto. Por ser un ejemplo a seguir de fortaleza y gran corazón. Por enseñarme que con esfuerzo, trabajo, dedicación y constancia todo se puede lograr.

A mis hermanos por brindarme su apoyo, cariño y amor siempre.

A mis amigos del laboratorio, porque también sin ellos no hubiera sido posible esto, por ser voluntarios y confiar en los resultados, a Jordy por apoyarme en la parte estadística.

A mis mejores amigos por estar presentes durante toda esta etapa de mi vida, por su gran y valiosa amistad de años, por motivarme, por sus consejos y sostenerme siempre.

A todas las personas que contribuyeron directa e indirectamente en este proceso y etapa de mi vida.

INFINITAS GRACIAS.

“Cualquier persona que te motiva a ser mejor, es alguien a quien merece la pena mantener cerca”

Mike Ross

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	i
Índice de cuadros	iii
Resumen	iv
Abstract	v
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Plantas medicinales	3
2.2 Metabolitos secundarios	4
2.2.1 Clasificación de metabolitos secundarios	5
2.3 <i>Callistemon citrinus</i>	8
2.3.1 Taxonomía y clasificación científica	10
2.3.2 Usos y atribuciones	10
2.4 Daño oxidativo, radicales y antioxidantes	11
2.4.1 Radicales libres y sus efectos cutáneos	12
2.5 Antioxidantes y sus efectos en la piel	13
2.6 Emulsiones cosméticas	15
2.6.1 Tipos de emulsiones cosméticas	16
2.6.1.2 Emulsión aceite en agua (O/W)	16
2.6.1.3 Emulsión agua en aceite (W/O)	17
2.6.2 Componentes de las emulsiones	18
2.6.2.1 Estabilidad de las emulsiones	18
3. Justificación	21
4. Objetivos	22
4.1. Objetivo general	22
4.2. Objetivos específicos	22
5. Materiales y métodos	23
5.1. Recolección de material vegetal	23
5.2. Preparación de extractos etanólicos	23
5.3. Descripción de las materias primas químicas empleadas	24

5.4. Formulaci3n de "Base suave retirable con agua"	25
5.4.1. Preparaci3n de extractos oleosos	25
5.4.2. Preparaci3n de extractos etanolicos	25
5.4.3. Preparaci3n de extracto hexanico oleoso	25
5.4.4. Formulaciones elaboradas	25
5.5. Metodolog3a de la elaboraci3n de emulsi3n O/W	26
5.6. Caracterizaci3n del producto final	27
5.7. Determinaci3n de la actividad antioxidante	27
5.7.1. <i>T3cnica DPPH</i> (Seg3n Karam3c <i>et al.</i> , 2005 modificado por CID-Estrada)	28
5.7.2. <i>T3cnica FRAP</i> (Seg3n Thaipong <i>et al.</i> , 2006 modificado por CID-Estrada)	28
5.7.3. <i>T3cnica ABTS</i> (Seg3n Arnao <i>et al.</i> 2001, modificado por CID-Estrada)	28
5.7.4. <i>T3cnica determinaci3n de Fenoles</i> (Seg3n Pripdeevech <i>et al.</i> , 2010, modificado por CID-Estrada)	29
5.7.5. <i>T3cnica determinaci3n de Flavonoides</i> (Seg3n Chang <i>et al.</i> , 2002, modificado por CID-Estrada)	29
5.8. Determinaci3n de la actividad antibacteriana	29
5.8.1. preparaci3n de medio de cultivo	29
5.8.2. Inoculaci3n de placas de Petri	30
5.9. An3lisis Estad3stico	30
6. Resultados y discusi3n	31
6.1. Evaluaci3n de la capacidad antioxidante	31
6.2. Contenido de compuesto fen3licos	34
6.3. Contenido de flavonoides	34
6.4. An3lisis de muestras mediante cromatograf3a de gases acoplada a espectrometr3a de masas (GC/MS)	35
6.5. Determinaci3n de la actividad antibacteriana de los extractos de hoja y flor de <i>C. citrinus</i>	36
6.6. Caracterizaci3n del producto final	39

6.7. Aceptación del producto terminado	41
7. Conclusión	42
8. Literatura citada	43
9. Anexos	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Eventos en los cuales, los MS se inducen durante la respuesta de defensa de las plantas (fuente: elaboración propia).	5
Figura. 2. Estructura química de MS: el mentol, un monoterpeno (izquierda), la nicotina, un alcaloide (centro) y el eucaliptol, un compuesto fenólico (derecha) (Fuente: elaboración propia).	6
Figura 3. Detalle de la inflorescencia de <i>Callistemon citrinus</i> en el sitio de estudio.	9
Figura 4. Tipos de emulsiones (Fuente: elaboración propia).	17
Figura 5. Mecanismos que contribuyen a la inestabilidad de las emulsiones (fuente: Aranberri, 2006).	19
Figura 6. Metodología de los extractos de <i>Callistemon citrinus</i> .	23
Figura 7. Metodología para elaborar una emulsión O/W.	27
Figura 8. Composición química de los extractos etanólicos determinada por GC-MS	35
Figura 9. Composición química de los extractos hexánicos determinada por GC-MS	36
Figura 10. Efecto de los extractos etanólicos de la hoja y flor de <i>C. citrinus</i> sobre el crecimiento de las dos bacterias Gram positivas: <i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	37
Figura 11. Efecto de la crema de flor de <i>C. citrinus</i> sobre el crecimiento de la bacteria Gram positiva: <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	38
Figura 12. Crema sin presencia de crecimiento bacteriano debido a las propiedades antibacterianas de los extractos.	39
Figura 13. Color del producto terminado. Crema de hoja (izquierda) y crema de flor (derecha).	40
Figura 14. Prueba de estabilización: centrifugación.	40
Figura 15. Curva patrón del Trolox para la técnica DPPH.	50
Figura 16. Curva patrón del Trolox para la técnica FRAP.	50
Figura 17. Curva patrón del Trolox para la técnica ABTS.	51

Figura 18. Curva patrón del Ácido Gálico para la determinar fenoles.	51
Figura 19. Curva patrón de rutina para determinar flavonoides.	52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los principales antioxidantes de la piel.	14
Cuadro 2. Compuestos base para hacer una emulsión.	24
Cuadro 3. Capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de hoja y flor de <i>Callistemon citrinus</i> y contenido de fenoles y flavonoides totales.	32
Cuadro 4. Capacidad antioxidante de los extractos hexánicos de hoja y flor de <i>Callistemon citrinus</i> y contenido de fenoles y flavonoides totales.	32
Cuadro 5. Propiedades organolépticas y fisicoquímicas de la crema.	39

RESUMEN

La piel es el órgano más expuesto de manera directa al daño por radicales libres y el desequilibrio de su defensa antioxidante acelera el mecanismo de envejecimiento y predispone al cáncer cutáneo. Actualmente existen ensayos clínicos que proporcionan evidencia del beneficio de los antioxidantes al ser aplicados de manera tópica. Consecuencia de esto, el desarrollo de productos farmacéuticos que lo contienen ha crecido de modo acelerado en los últimos años, principalmente como complemento en la terapia contra el envejecimiento cutáneo.

A través de los años *Callistemon citrinus* ha sido extensamente analizado desde el punto de vista farmacológico y otras propiedades biológicas son: inhibidor de la actividad de la elastasa (Kim *et al.*, 2009), como atrapador de radicales libres, (Das y Singh, 2012), antihelmíntico, antimicrobiano y antimicótico (Oyedeji *et al.*, 2009), además de presentar actividad antioxidante (Mansour, 2010).

El objetivo de este trabajo fue elaborar una crema con propiedad antioxidante a base del extracto de *C. citrinus* para proteger a la piel. Se utilizaron extractos etanólicos y hexánicos de hoja y de flor, la capacidad antioxidante se determinó por los métodos de FRAP, DPPH Y ABTS, se cuantificó la cantidad de fenoles y flavonoides totales y la composición química se analizó por cromatografía de gases acoplada a masas.

Los compuesto mayoritarios en los extractos hexánicos fueron: en la flor Eucaliptol, Mentol y Elemene y en la hoja Eucaliptol, Escualeno y Mentol; y en los extractos etanólicos de la flor fueron: D-limoneno, Eucaliptol y α -Terpineolo y de la hoja Eucaliptol Fitol y Terpinoleno. La mayor capacidad antioxidante así como el mayor contenido de fenoles lo presentó el extracto de la flor, mientras que la hoja tuvo el mayor contenido de flavonoides. Con relación a las propiedades organolépticas, fisicoquímicas y de estabilidad las formulaciones que cumplen con las características mencionadas fueron la fórmula 4 y 8.

Palabras claves: *Callistemon citrinus*, actividad antioxidante, radical libre, metabolitos secundarios, fenoles

ABSTRACT

The skin is the organ most exposed directly to damage by radical free and the imbalance of its antioxidant defense accelerates the aging mechanism and predisposes to skin cancer. There are clinical trials that provide evidence of the benefit of antioxidants when applied topically. As a result, the development of pharmaceutical products containing it has grown so accelerated in recent years, mainly as a complement in the therapy against skin aging.

Through the years *Callistemon citrinus* has been widely analyzed from the point of view of the drug and other biological properties are: elastase activity inhibitor (Kim et al., 2009), and free radical trap, (Das and Singh, 2012), anthelmintic, antimicrobial and antifungal (Oyedeji et al., 2009), as well as present antioxidant activity (Mansour, 2010).

The objective of this work was to elaborate a cream with antioxidant property based on the extract of *C. citrinus* to protect the skin. Ethanolic and hexane of leaf and flower extracts were used, the antioxidant capacity was determined by the methods of FRAP, DPPH and ABTS, quantified the amount of phenols and total flavonoids and chemical composition was analyzed by gas chromatography coupled to masses.

The major compounds in the hexanic extracts were: Eucalyptol, menthol and Elemene flower and leaf Eucalyptol, squalene and menthol; and in extracts of flower ethanol were: d-limonene, Eucalyptol and α -Terpineolo and Eucalyptol, Phytol, and Terpinolene sheet. The highest antioxidant capacity as well as the higher content of phenols present flower extract, while the sheet had the highest content of flavonoids. With regard to organoleptic, physico-chemical properties and stability, formulations that comply with the characteristics mentioned were the formula 4 and 8.

Key words: *Callistemon citrinus*, antioxidant activity, radical free, secondary metabolites, phenols

1. INTRODUCCIÓN

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial. Durante cientos y miles de años los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso de que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales (Cano *et al.*, 2009). A las plantas también se les atribuyen beneficios dentro de la cosmética natural, ofreciendo ventajas para la salud de la piel, ya que al no ser agresivas fortalecen y mejoran las funciones dérmicas, gracias a sus componentes químicos naturales (Cifuentes *et al.*, 2013).

Los metabolitos secundarios juegan un papel importante en las plantas ornamentales y alimentarias. Por ejemplo, olor, gusto, sabor y color. Muchos metabolitos secundarios de las plantas son usados como sustancias químicas finas, tales como medicamentos, colorantes, insecticidas, fragancias y sabores (Serrano, 2012). Entre ellos, los flavonoides son polifenoles estudiados por sus múltiples propiedades terapéuticas y cosméticas, metabolitos atrapadores de radicales libres, tanto en la fase inicial como en la de propagación. En consecuencia, protegen la membrana de la célula y por ende todos los procesos de la misma, frenando su deterioro, con un efecto antienvjecimiento, proclamado en productos “*anti-aging*” (antiedad) (Nadinic, 2009).

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. Estas acciones se dan constantemente en las células de nuestro cuerpo, proceso que debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante (Avello y Suwalsky, 2006). Los antioxidantes son un conjunto de compuestos químicos o productos biológicos

que contrarrestan de una manera directa o indirecta los efectos nocivos de los radicales libres u oxidantes, tales como oxidación a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando las funciones celulares. Se han clasificado en dos principales sistemas, el sistema enzimático y no enzimático. Cuando estos sistemas antioxidantes fracasan se produce un exceso de radicales libres (López, 2012).

Callistemon citrinus (Curtis) Skeels (Syn. *Callistemon lanceolatus* DC, "crimson bottlebrush") es una planta perteneciente a la familia Myrtaceae y es nativa de Australia, pero se encuentra ampliamente distribuida en diferentes partes del mundo, incluyendo las regiones tropicales y subtropicales del Sur de América y Asia. La planta es comúnmente conocida como "*bottlebrush*" (cepillo) por su semejanza a un cepillo cilíndrico para limpiar botellas. *C. citrinus* es la especie más ampliamente cultivada entre las 34 especies del género *Callistemon*. La planta es un arbusto o árbol pequeño, que crece hasta 7,5 m de altura y posee flores de color carmesí y anteras rojo oscuras (Shrestha *et al.*, 2015).

C. citrinus posee propiedades farmacológicas y biológicas. En la india es usado para el tratamiento de diabetes mellitus (Brushan y Bansal, 2015) también tiene actividad antiespasmódica (Shrestha *et al.*, 2015), actividad antifúngica y bactericida (Jamzad *et al.*, 2014), inhibidor de la actividad de la elastasa, como atrapador de radicales libres y presenta actividad antioxidante (Singh, 2012).

Recientemente Cid-Estrada (2014) analizó los extractos etanólicos de flor y hoja de *C. citrinus*, reportando un alto contenido de fenoles así como una importante actividad antioxidante, sin embargo Pérez-González (2016) comprobó que dicha actividad antioxidante se debe a los compuestos fenólicos encontrados.

El objetivo del presente trabajo fue elaborar una crema con propiedad antioxidante, utilizando los extractos de hoja y flor de *C. citrinus*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Plantas medicinales

El uso de plantas medicinales se remonta a los inicios de la civilización humana, las culturas antiguas como la China, la India y la Nor-Africana han proporcionado evidencia sobre el uso de este recurso con fines curativos (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2014). Este patrimonio cultural se ha transmitido de generación en generación, de manera que algunas costumbres subsisten y son ejercidas de manera cotidiana, tanto en áreas rurales como urbanas (García *et al.*, 2012).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), una planta medicinal es aquella que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos y/o pueden servir como principios activos o como precursores para la semi-síntesis de nuevos fármacos (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2014). La OMS y la Organización de Naciones Unidas (ONU), estiman que el 80% de los habitantes de nuestro planeta, dependen de las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades de atención primaria en la salud (Cifuentes *et al.*, 2013).

Las plantas poseen características medicinales debido a principios activos referidos a las propiedades químicas que se encuentran en ellas; principios que se localizan en las diferentes partes de la planta como hojas, flores, tallos, semillas o raíces (Cifuentes *et al.*, 2013).

En la actualidad existe un interés creciente en la medicina alternativa para la cura de numerosos padecimientos y enfermedades que afectan a los seres humanos (Álvarez, 2012), es por eso que a las plantas también se les atribuyen beneficios dentro de la cosmética natural, ofreciendo ventajas para la salud de la piel, ya que al no ser agresivas fortalecen y mejoran las funciones dérmicas, gracias a sus componentes químicos naturales (Cifuentes *et al.*, 2013).

2.2 Metabolitos secundarios

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples (García y Carril, 2009). Los metabolitos secundarios (MS) son compuestos derivados del metabolismo primario (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011). Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003) que no solamente tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos ya que antiguamente se aceptó que las sustancias secundarias se producían con funciones relativas inespecíficas, después se encontró que muchas de éstas poseen altos rendimientos y que tienen múltiples funciones en las plantas (Wink, 1999).

Tal es la síntesis activa de MS, que se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados); b) el ataque por microorganismos: (virus, bacterias y hongos); c) la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas; y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Figura 1) (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003). Otros tienen una función fisiológica, por ejemplo los alcaloides, las pectinas que pueden servir para el transporte de nitrógeno tóxico y compuestos de almacenamiento, mientras que los compuestos fenólicos como los flavonoides realizan una función como protectores de rayos ultravioletas (Wink, 1999)

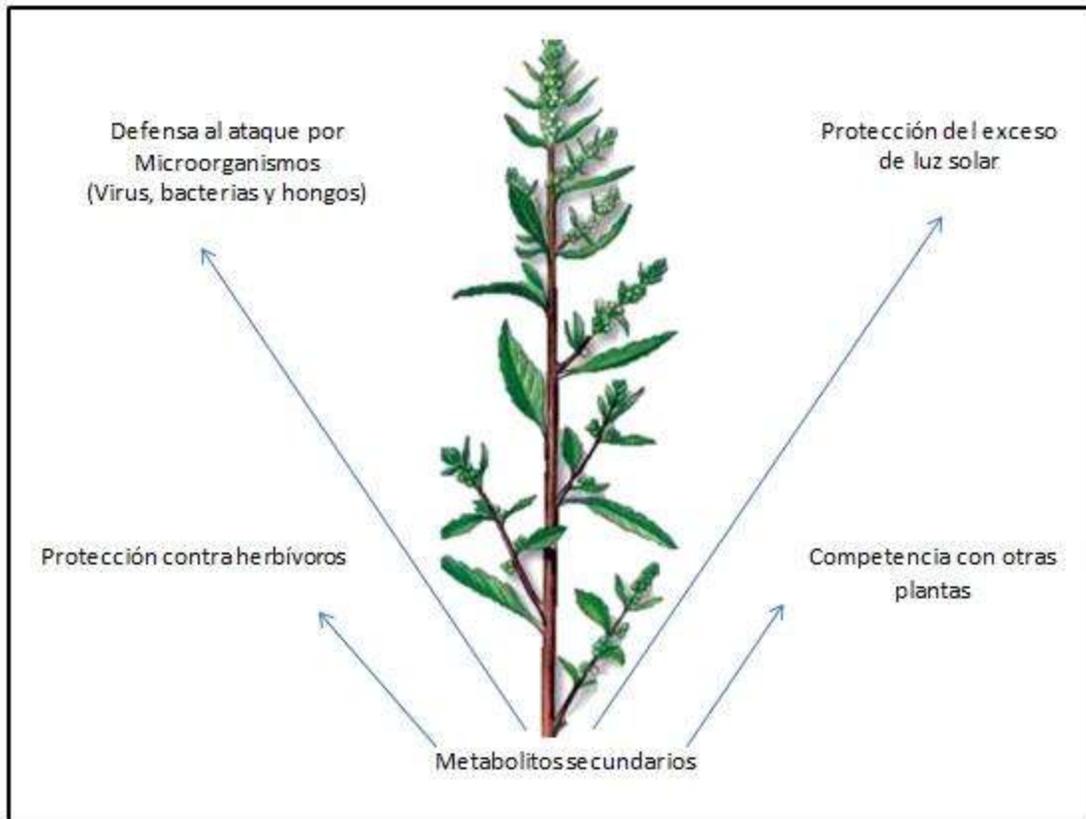


Figura 1. Eventos en los cuales, los MS se inducen durante la respuesta defensa de las plantas (fuente: elaboración propia).

Es importante destacar que los MS también reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado este último de su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizaban en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc. (García y Carril, 2009).

2.2.1 Clasificación de metabolitos secundarios

Los MS se pueden clasificar de diferentes maneras: en función a sus características químicas, origen vegetal u origen biosintético (Verpoorte y Alferman, 2000). En todos estos casos es inevitable la superposición. Por ejemplo,

por ser moléculas generalmente polifuncionales es difícil ubicarlas en un determinado grupo químico, o dos compuestos totalmente diferentes tienen la misma acción, o la misma fuente de producción puede originar compuestos muy distintos (Marcano y Hasegawa, 2002). Las tres clases principales de metabolitos secundarios de acuerdo a su biosíntesis son los terpenos, alcaloides y compuestos fenólicos (Azcón y Talón, 1993) (Figura 2).

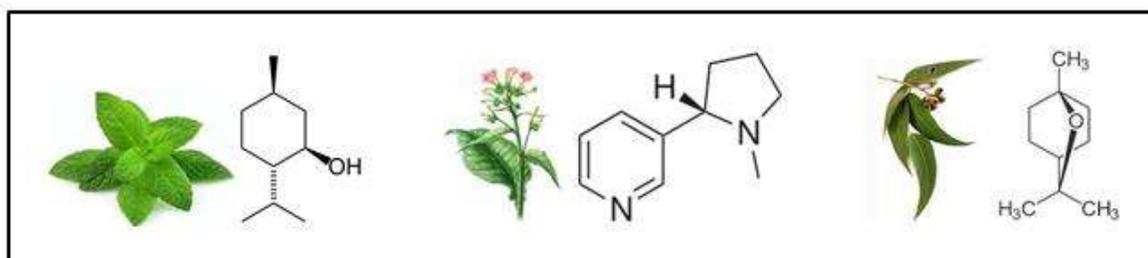


Figura. 2. Estructura química de MS: el mentol, un monoterpeno (izquierda); la nicotina, un alcaloide (centro); y el eucaliptol, un compuesto fenólico (derecha) (Fuente: elaboración propia).

a) **Terpenos**

Los terpenoides o isoprenoides, se derivan de la fusión de unidades de cinco carbonos llamada isopreno (2-metil-1,3butadieno) (C₅) y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que los forman (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003). Se dividen en seis grupos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y esteroides, dentro de los cuales se encuentran los carotenos, el taxol entre otros (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011). Los terpenos que se encuentran en los aceites esenciales son generalmente monoterpenos (García y Carril, 2009), que son sustancias lipofílicas, volátiles, responsables del olor característico de muchas plantas (Romo, 2006), como ejemplo está el limoneno y el mentol, constituyentes de los aceites de limón y menta, respectivamente (García y Carril, 2009).

b) **Alcaloides**

Los alcaloides son compuestos heterocíclicos que generalmente se sintetizan a partir de aminoácidos, tales como triptófano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina, solos o combinados con terpenoides. También se pueden derivar de purinas (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003). Estos son fisiológicamente activos en humanos (cocaína, nicotina, morfina) y por supuesto de gran interés en la industria farmacología (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Los alcaloides son localizados en los tejidos periféricos de los diferentes órganos de la planta, es decir en el recubrimiento de las semillas, corteza del tallo, raíz o fruto y en la epidermis de la hoja; esto permite pensar que los alcaloides cumplen una importante función como es la de proteger a la planta, por su sabor amargo de éstos, del ataque de insectos (Acosta, 2008)

c) **Compuestos fenólicos**

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo. La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina. (García y Carril, 2009) En los polifenoles se incluyen los ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides y taninos.

Las aplicaciones farmacéuticas de estos compuestos son considerables, se refieren a sus efectos como analgésicos, antibacterianos, antihepatotóxicos, antioxidantes, antitumorales, inmunoestimulantes, (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011), antimutagénicos, antihistamínicos (Munir y Sarfraz, 2014) y también presentan propiedades fisiológicas tales como antialérgica, antitrombótico, cardioprotector y efectos vasodilatadores (Balasundram *et al.*, 2006).

Cabe destacar que los efectos beneficiosos derivados de compuestos fenólicos se han atribuido a su actividad antioxidante (Balasundram *et al.*, 2006), esto debido a

la capacidad que tiene los fenoles para actuar como agentes reductores neutralizando radicales libres, como los radicales de oxígeno y descomponiendo peróxidos (González, 2016).

2.3 *Callistemon citrinus*

El género *Callistemon* pertenece a la familia Myrtaceae y es el género ornamental más importante de Australia (Álvarez *et al.*, 2011). *Callistemon* es un género de 34 especies de arbustos, todos ellos endémicos de Australia (Goyal *et al.*, 2012) pero ahora se extienden por todo el mundo, y comprenden arbustos o pequeños árboles que se han utilizado para la silvicultura y como árboles de granja (Petronilho *et al.*, 2013).

Las especies de *Callistemon* se utilizan para la producción de aceites esenciales, plantaciones cortavientos, recuperación en tierras degradadas y la horticultura ornamental, entre otras aplicaciones (Oyedeki *et al.*, 2009) como control de malezas y como bioindicadores para la gestión ambiental (Haque *et al.*, 2012).

El género *Callistemon* es conocido en la medicina popular por sus propiedades tales como antitusivas, antibronquitis, efectos insecticidas y sus aceites volátiles han sido utilizados como agentes antimicrobianos y antifúngicos (Goyal *et al.*, 2012).

C. citrinus (*Callistemon*; estambres hermosos; *citrinus*, por su aroma a limón), también conocida como árbol del cepillo, escobillón rojo, cepillo cilíndrico, entre otros.

C. citrinus es un arbusto o arbolillo siempre verde, de 1-5 m, carece de pelos salvo en las ramillas jóvenes, que llevan pelos sedosos, y a veces en las inflorescencias. Las hojas van en disposición alterna y son estrechamente elípticas o lanceoladas,

bastante rígidas, generalmente agudas, con nervadura pinnada (se suelen apreciar bien tanto el nervio medio como los laterales); al estrujarlas tienen un olor muy aromático, como a limón. Las inflorescencias son unas espigas cilíndricas de 5-10 cm, no muy apretadas, de un color rojo muy vivo, que se debe a los filamentos de los estambres, con el eje y los cálices frecuentemente pelosos. (González, 2006) (Figura 3).

Los puntos de la flor roja brillante de *C. citrinus* son muy ricos en néctar y atraen a muchas aves (Oyedeki *et al.*, 2009). *C. citrinus* también podría ser recomendado para la forestación de la región industrial debido a resistencia de sus hojas a emisiones industriales (Zandi-Sohani *et al.*, 2012).



Figura 3. Detalle de la inflorescencia de *C. citrinus* en el sitio de estudio.

2.3.1 Taxonomía y clasificación científica

Los principales sinónimos de *C. citrinus* en la literatura son *Callistemon lanceolatus* y *Metrosideros citrina*.

C. citrinus fue descrito por Skeels y publicado en el U.S. Department of Agriculture Bureau of Plant Industry Bulletin 282: 49 en 1913. Previamente, había sido descrito en 1794 por Curtis, quien lo nombró *Metrosideros citrina*.

Su clasificación científica es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Myrtales

Familia: Myrtaceae

Tribu: Melaleuceae

Género: *Callistemon*

Especie: *C. citrinus* (Curtis) Skeels 1913

Sinonimia: *Callistemon lanceolatus*, *Metrosideros citrina* (López, 2015)

2.3.2 Usos y atribuciones

C. citrinus ha sido estudiado para mostrar varios efectos farmacológicos. La fruta y las hojas han exhibido efectos de bloqueo de canales de calcio y actividad anti-espasmódico (Shrestha *et al.*, 2015), también se ha encontrado que las diferentes partes de esta planta han sido utilizadas en la medicina popular como un recurso común para la diarrea, disentería, reumatismo y antibronquitis (Mabhiza *et al.*, 2016).

C. citrinus también se ha utilizado para tratar condiciones como el dolor gastrointestinal (Shrestha *et al.*, 2015), tiene actividad anticaries, hepatoprotector e hipoglucémico (Shaha y Salunkhe, 2014) y actividad cardioprotectora (Ahmed y Rahman, 2016). Los resultados de estudios recientes mostraron que el extracto de hojas de *C. citrinus* ha mostrado buena actividad contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos (Zandi-Sohani *et al.*, 2012). Se sabe que los aceites de hoja de *C. citrinus* tienen propiedades antimicrobianas, fungitóxicas, antinociceptivas y actividades antiinflamatorias (Kumar *et al.*, 2015).

Los monoterpenoides y sesquiterpenoides se encuentran ampliamente en la naturaleza, especialmente en plantas y frutas, y puede promover un amplio espectro de beneficios para la salud humana, principalmente antiinflamatorios, antibacterianos y actividades antitumorales. El 1,8-cineol y el α -terpineol se han aislado como principales compuestos de las hojas y flores de *C. citrinus*. En el aceite esencial de la hoja de *C. citrinus* se identificó limoneno (Kumar *et al.*, 2015). En los extractos etanólicos de las hojas y flores se determinó la presencia de α -pineno, β -pineno, α -terpineno, 1,8-cineol, linalol, *trans*-pinocarveol, 4-terpineol, geraniol y α -terpineol que han mostrado tener actividades anti-bacterianas y antifúngicas (Petronilho *et al.*, 2013). El 1,8-cineol es conocido por sus propiedades medicinales y aromatizantes. También es un compuesto amigable con el medio ambiente con potencial para reemplazar a los solventes industriales que agotan el ozono (Kumar *et al.*, 2015).

2.4 Daño oxidativo, radicales y antioxidantes

La piel es el órgano más expuesto de manera directa al daño por radicales libres (RL) y el desequilibrio de su defensa antioxidante acelera el mecanismo de envejecimiento y predispone al cáncer cutáneo. En 1950 Denham Harman fue el primero en proponer la "Teoría del envejecimiento celular inducido por radicales libres" (Ramos y Pérez, 2010), planteó la relación entre radicales libres y envejecimiento. Se señaló que la expectativa de la vida humana podría aumentar

al disminuir los efectos del proceso oxidativo. Así las especies reactivas del oxígeno (ERO), entre otros, los radicales libres, pueden alterar la membrana interna o el ADN mitocondrial lo que conlleva más producción de ERO, en consecuencia más daño y aumento del estrés, al producirse más oxidantes y perderse el equilibrio requerido por la célula (Coronado *et al.*, 2015).

Una defensa antioxidante integrada es crucial para proteger a la piel de los ERO existe, sin embargo, un número considerable de estudios que proporcionan evidencia de sus beneficios, tales como capacidad fotoprotectora y anticarcinogénica (Solari *et al.*, 2011).

2.4.1 Radicales libres y sus efectos cutáneos

Desde el punto de vista químico, los RL son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad (Gutiérrez, 2002). El origen de los RL puede ser: a) endógeno, metabolismo aeróbico celular, daño oxidativo por las células fagocíticas, isquemia; y b) exógeno, radiación ultravioleta, contaminación ambiental, humo de tabaco, plaguicidas (Ramos y Pérez, 2010), alcohol o debido a una alimentación no adecuada (León *et al.*, 2015), los medicamentos y los aditivos químicos en alimentos procesados (Paniagua *et al.*, 2004). La vida media biológica del RL es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos (Avello y Suwalsky, 2006). Existen algunas circunstancias en que también se producen RL como son: Dieta hipercalórica, dieta insuficiente en antioxidantes, procesos inflamatorios y traumatismos, fenómenos de isquemia y reperfusión y ejercicio extenuante (Gutiérrez, 2002).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales (Avello y Suwalsky, 2006). Son los RL

derivados de la cadena respiratoria, que a nivel cutáneo pueden provocar acumulación de lesión oxidativa en moléculas de vida larga como el colágeno y la elastina (Ramos y Pérez, 2010).

La exposición a la radiación UV es la principal causa de estrés oxidativo en la piel y, por lo tanto, es un importante factor de riesgo para el desarrollo de problemas de la piel, por ejemplo, formación de arrugas, lesiones y cáncer. Sobre la exposición a la luz del sol, las moléculas de la piel absorben UVR (radiación ultravioleta) que da lugar a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Existen dos tipos de ERO: el tipo 1 consiste en una única molécula de oxígeno excitado (O_2), mientras que las moléculas de oxígeno con electrón desapareado, constituyen el segundo tipo de ERO: Las más importantes son: radical anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (HO)⁺ y el radical óxido nítrico (NO). Las entidades reactivas de oxígeno ejercen un efecto perjudicial sobre las fracciones celulares incluyendo las paredes celulares, las membranas lipídicas, las mitocondrias, el núcleo y el ADN que producen "estrés oxidativo", es decir, una diferencia entre ERO y antioxidantes, siendo ERO en exceso conduciendo a lesión tisular y desarrollo de enfermedad incluyendo envejecimiento, cáncer, isquemia, lesión hepática, artritis y síndrome de Parkinson, entre otras (Jadoon *et al.*, 2015).

Se ha postulado que al menos 50% del daño de la piel inducido por la luz solar es atribuible a la formación de RL. La exposición a radiación ultravioleta (UVR) induce producción de cromóforos, moléculas que al absorber la luz (principalmente UVB pero también UVA) producen RL (Ramos y Pérez, 2010).

2.5 Antioxidantes y sus efectos en la piel

Los antioxidantes se definen como aquellas sustancias que, presentes en bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas tales como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN) (Gutiérrez, 2002),

retardan o previenen la oxidación. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres, estos producen reacciones en cadena que dañan las células (Solari *et al.*, 2011). Al interactuar con el radical libre, el antioxidante cede un electrón, se oxida y se transforma en un RL débil no tóxico (Paniagua *et al.*, 2004).

Dado que los sistemas vivos tienen la capacidad de mantener homeostasis de ERO en la célula, la piel humana está protegida de UVR a través del complejo sistema de defensa antioxidante (Jadoon *et al.*, 2015), existen dos tipos de antioxidantes: los endógenos, dotados por el propio sistema biológico, y los exógenos, tomados de la dieta (Paniagua *et al.*, 2004) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de los principales antioxidantes de la piel.

ORIGEN ENZIMÁTICO	COFACTORES ENZIMÁTICOS O “ELEMENTOS TRAZA”	DERIVADOS DE LOS NUTRIENTES
Inhibitorios:		Vitamina B3:
- Oxidasa de NADPH		Nicotinamida
- Sintasa de O ₂		Ácido nicotínico
Neutralizantes:		
- Superóxido dismutasa Citosólica	Zinc	Vitamina E (Tocoferol)
- SOD mitocondrial	Manganeso	
- Glutación peroxidasa	Selenio	
- Catalasa	Hierro	
Reparadores:		Vitamina C (Ácido L-ascórbico)
- Ceruloplasmina y SOD extracelular	Cobre	Fitoquímicos: Polifenoles del té, flavonoides, estilbenos.

Si hay desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes endógenos, los antioxidantes exógenos son útiles para restablecer el equilibrio. Los antioxidantes exógenos forman parte de compuestos que no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano. Vitaminas, ascorbato, carotenoides y polifenoles, que constituyen este último tipo de antioxidantes que también participan en el mantenimiento de la homeostasis oxidativa. Los antioxidantes endógenos se agotan en capas epidérmicas y dérmicas de la piel expuestas al sol bajo el efecto de los niveles elevados de ERO generados por UVR. Tal agotamiento se traduce en la actividad disminuida de estos antioxidantes produciendo daño a la piel. Con la edad, los antioxidantes endógenos se consumen constantemente aumentando el riesgo de estrés oxidativo; entonces el uso de antioxidantes exógenos como estrategia de prevención es esencial (Jadoon *et al.*, 2015).

Se ha reportado que la vitamina C mejora la apariencia de la piel fotodañada y aumenta la síntesis de fibras de elastina y colágeno. Por otro lado existen los antioxidantes derivados de las plantas, como son los flavonoides que son compuestos polifenólicos de los que se han identificado más de 8000. Otros antioxidantes de origen vegetal que ha probado actividad antioxidante fotoprotectora y anticarcinogénica son: el carotenoide licopeno, la silimarina (extracto del “cardo lechero” o *Silybum marianum*), extracto de semilla de uva (*Vitis vinífera*), pignogenol (extracto de corteza de pino) y la idebenona, entre muchos otros, algunos en fase experimental (Ramos y Pérez, 2010).

2.6 Emulsiones cosméticas

El estudio de las emulsiones es de gran interés, ya que se encuentra en una inmensa cantidad de productos que utilizamos a diario como son las cremas para el cuidado personal, de la piel, pintalabios, algunos alimentos (helados, leche, mantequilla) y productos agroquímicos como los insecticidas y pesticidas. En el sector de los cosméticos, las cremas hidratantes, protectoras para los rayos UV,

también son emulsiones de partículas aceitosas dispersas en agua (Aranberri y Fletcher, 2006). Las emulsiones pueden servir como vehículo ideal para permitir la incorporación de muchos ingredientes importantes y necesarios para formular un producto de cuidado de la piel o de protección solar (Santos, 2010).

Una emulsión es un sistema disperso, estabilizado mediante la adición de un agente emulgente adecuado, de dos fases inmiscibles, en el que ambas, la fase interna y la externa, son líquidas. El tamaño de partícula de la fase interna varía entre 0.5 y 100 μm . La International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) define una emulsión como un líquido que contiene gotas líquidas y/o cristales líquidos dispersos (Higuero, 2004).

2.6.1 Tipos de emulsiones cosméticas

Las emulsiones cosméticas deben presentar atributos que le dan mayor valor al producto final, tales como: sensorial agradable, aspecto atractivo, facilidad de aplicación y de esparcimiento, estabilidad físico química y microbiológica, facilidad de ser absorbida por las capas superiores de la piel, entre otros (Santos, 2010).

2.6.1.2 Emulsión aceite en agua (O/W)

Es aquella en que la fase externa está constituida de agua o de componentes hidrosolubles (Figura 4). La fase interna consiste en uno o más tipos de aceites y grasas. Están caracterizadas por presentar conductividad eléctrica y dispersarse en agua (Santos, 2010). En la terapéutica dermatológica actual, la emulsión de fase externa acuosa (O/W) es el medio más adecuado para incorporar principios activos eficaces en diversas patologías de la piel. Tiene las siguientes ventajas: Permite incorporar varios principios activos con facilidad, los hidrosolubles, en la fase acuosa; los liposolubles, en la fase oleosa; y los termolábiles, en la emulsión terminada; por su composición hidrata la piel sin aportar excesiva grasa.

Los principales inconvenientes de las emulsiones es debido a que tienen mayor inestabilidad con respecto a otras formas y su elaboración es laboriosa (Higuero, 2004). Este tipo de emulsiones son formuladas en lociones de protección solar, leches de limpieza de piel, cremas para el día, bases de maquillaje, crema para las manos no grasosas, cremas para el cuerpo, lociones infantiles, entre otros (Santos, 2010).

2.6.1.3 Emulsión agua en aceite (W/O)

En este tipo de emulsión, el agua es dispersada y el aceite es la fase externa o la fase continua (Figura 4). Este tipo de emulsión no presenta conductividad eléctrica ni se dispersa en agua (Santos, 2010). Las emulsiones W/O tienen un papel terapéutico más limitado, reservándose a zonas hiperqueratósicas y cuando se requiere un aporte graso a la piel (Higuero, 2004). Estas emulsiones son utilizadas en productos de protección solar resistente al agua, cremas “universales”, cremas para la noche, cremas protectoras, cremas infantiles, cremas para pieles muy secas, cremas para los pies (Santos, 2010).

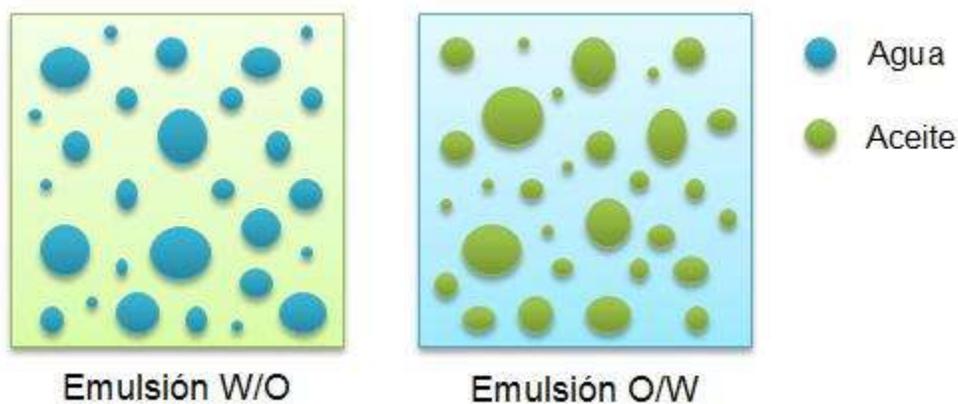


Figura 4. Tipos de emulsiones (Fuente: elaboración propia).

2.6.2 Componentes de las emulsiones

Fase oleosa

Formada por ingredientes no polares. En esta clase de ingredientes están las materias primas grasas, aceites y ceras, incluyendo el alcohol y los ácidos grasos, los esterios, los hidrocarburos, los glicéridos y las siliconas.

Fase acuosa

Es la parte de la emulsión constituida por el agua y por los demás materiales hidrofílicos del sistema. Puede ser formada por ingredientes humectantes, como la glicerina o el propilenglicol; los polímeros hidrosolubles, que aumentan la viscosidad o proporcionan acondicionamiento; preservantes, colorantes, electrolitos o ingredientes activos, como extractos botánicos o proteínas hidrolizadas.

Interface

Son los tensioactivos con propiedades emulsionantes, fundamentales para la formulación. Permiten, aisladamente o en mezclas, obtener la dispersión homogénea y estable de aceites o sustancias grasas en agua, y viceversa, formando emulsiones W/O u O/W (Santos, 2010).

2.6.2.1 Estabilidad de las emulsiones

El proceso de ruptura de las emulsiones puede ocurrir mediante varios mecanismos de inestabilidad diferentes (Aranberri y Fletcher, 2006) (Figura 5) que están relacionadas a sus características físicas (Santos, 2010) tales como:

Cremaación: las partículas de menor densidad tienden a subir hacia la superficie de la emulsión. Este fenómeno puede ser revertido por medio de agitación sencilla, pues se trata de un problema poco serio de inestabilidad y no hay aglomeración de partículas.

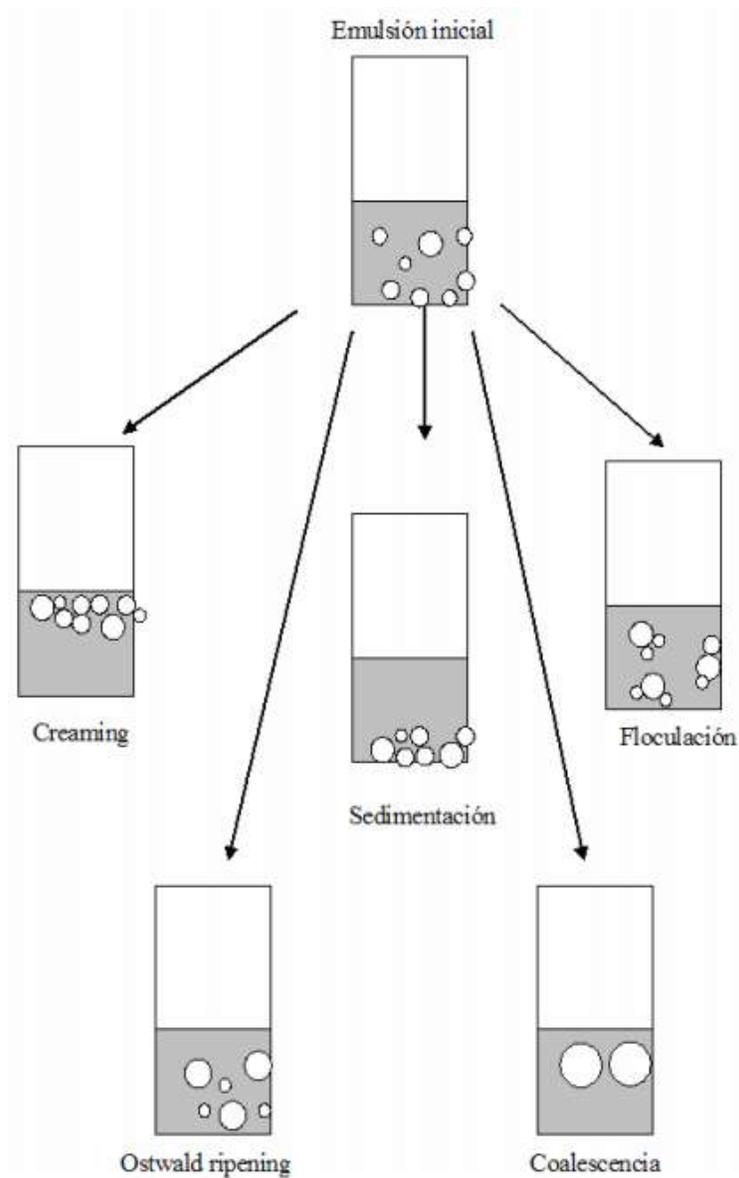


Figura 5. Mecanismos que contribuyen a la inestabilidad de las emulsiones (fuente: Aranberri, 2006).

Sedimentación: fenómeno semejante al de la Cremeación, pero, a diferencia de este, se produce la unión de las partículas más pesadas que se depositan en el fondo de la emulsión. Puede ser revertido con agitación.

Floculación: ocurre debido al desbalanceamiento de la carga eléctrica en las micelas, lo que reduce la fuerza repulsiva entre las mismas. Las gotículas de la fase interna se asocian entre sí de forma reversible y con fuerza de baja intensidad. Puede ser revertido con agitación.

Coalescencia: partículas de la fase interna se combinan y forman partículas mayores. Si un número muy grande de partículas se unen, el resultado será la separación completa de las dos fases. Es irreversible (Santos, 2010).

Engrosamiento de gotas (ostwald ripening): se debe al crecimiento de las gotas más grandes a costa de las más pequeñas hasta que estas últimas prácticamente desaparecen. Este proceso ocurre a una velocidad que es función de la solubilidad de la fase dispersa en la fase continua y se debe a que la presión interna de las gotas es mayor en las gotas más pequeñas (Aranberri y Fletcher, 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo, gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos. Las especies vegetales constituyen hoy más que nunca una gran fuente de ingredientes para la cosmética, por lo que son objeto de creciente investigación y desarrollo de productos por parte de la industria cosmética. La moda actual de los productos naturales se ha extendido en farmacia y también en cosmética. Además de las preferencias del consumidor, esta tendencia se mantiene gracias a la facilidad de extracción y de análisis de los componentes vegetales.

Callistemon citrinus es una planta nativa de Australia pero ya se encuentra en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. En muchos países son utilizados los extractos de hoja y flor de *C. citrinus* para el tratamiento de diversas afecciones en humanos, ya que posee diversas propiedades medicinales, pero en este caso el enfoque es evaluar la capacidad que tiene de atrapar radicales libres y en la propiedad antioxidante que posee esta planta. Para ello se propone la elaboración de una crema que proteja de los radicales libres y evite la resequedad de la piel.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Elaboración de una formulación cosmética con actividad antioxidante usando extractos de hoja y flor de *Callistemon citrinus*.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar la concentración de compuestos fenólicos totales de los extractos etanólicos y hexánicos de flor y hoja de la planta de *C. citrinus*.
- Determinar la concentración de flavonoides en los extractos etanólicos y hexánicos de flor y hoja de la planta *C. citrinus*.
- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos e hexánicos de flor y hoja de la planta *C. citrinus* mediante diferentes métodos.
- Comprobar actividad antimicrobiana de los extractos de flor y hoja de *C. citrinus*.
- Elaborar una formulación cosmética que ayude a proteger la piel de los radicales libres.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Recolección de material vegetal

Las hojas y flores de *Callistemon citrinus* fueron colectadas de plantas adultas que se encuentran ubicadas sobre el camellón de Avenida Universidad, afuera de las instalaciones de Ciudad Universitaria de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en el mes de agosto del 2016 en Morelia, Michoacán, México.

5.2. Preparación de extractos etanólicos

Una vez colectadas las hojas y flores se pesaron en fresco y se maceraron con etanol al 98% en una relación 1:10 (1 gramo de tejido por cada 10 mL de etanol). Los extractos se dejaron reposar en oscuridad a una temperatura de 10°C durante 5 días. Posteriormente, los extractos se filtraron y se llevaron a sequedad por evaporación con remoción al vacío en rotavapor a 45°C. El extracto concentrado de flor y hoja se almacenó a 4°C hasta su posterior utilización (Figura 6.)

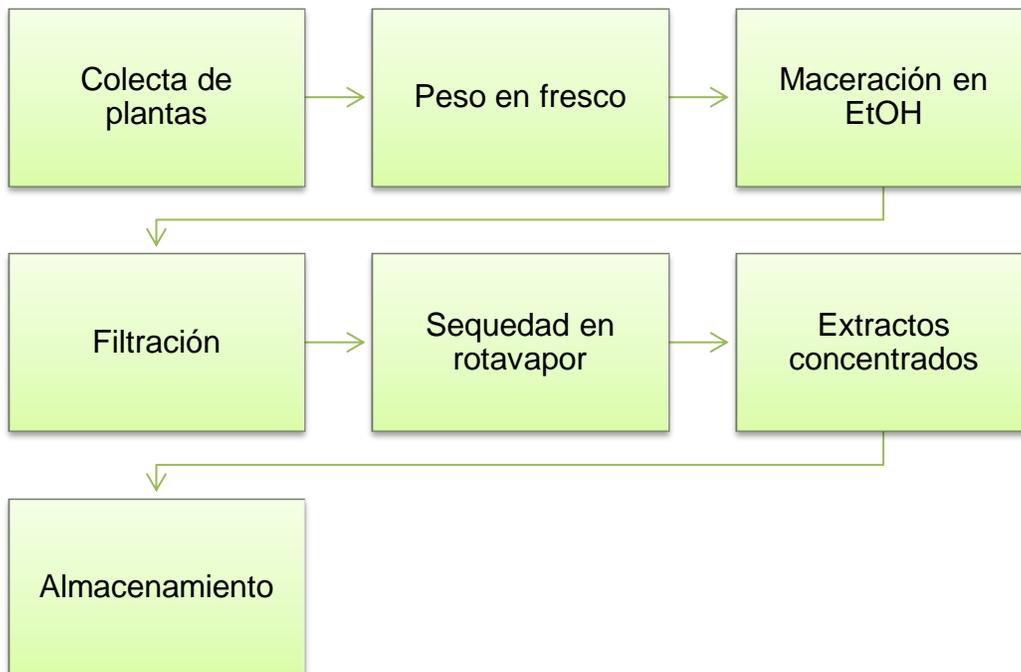


Figura 6. Metodología de los extractos de *Callistemon citrinus*.

5.3. Descripción de las materias primas químicas empleadas

Toda crema se compone de una sustancia base (excipiente), una materia prima y un principio activo, este último en una pequeña cantidad y es el que realiza la acción de la crema.

Cuadro 2. Compuestos base para hacer una emulsión.	
MATERIA PRIMA	USO Y PROPIEDADES
Alcohol estearílico	Tiene propiedades emolientes y emulsificantes débiles, aumentando la viscosidad y consistencia de las emulsiones.
Alcohol cetílico	Es un emulgente, aumenta la estabilidad de las emulsiones. Tiene acción emoliente por impedir la desecación de la epidermis en su capa cornea al retardar la evaporación del agua de la superficie cutánea, quedando la piel más blanda y flexible.
Lauril sulfato de sodio	El lauril sulfato sódico es un agente detergente (surfactante aniónico) y humectante que es efectivo tanto en medio ácido como en medio básico. También actúa de emulsificante aniónico, formando emulsiones O/W
Monoestearato glicerilo	Es usado habitualmente como estabilizante en emulsiones W/O y también a veces como coemulgente en las O/W.
Aceite mineral	Tiene propiedades hidratantes y protectoras, y alta eficacia limpiadora.
Glicerina	Es emoliente, protegiendo y ablandando la piel. En cosmética se usa ampliamente por sus propiedades emolientes y humectantes
Agua	Es un componente fundamental para realizar la crema emulsión e hidratante de la piel

5.4. Formulación de “Base suave retirable con agua”

Alcohol estearílico	5 g
Alcohol cetílico	3 g
Monoestearato de glicerilo	2 g
Glicerina	5 mL
Aceite mineral	5 mL
Lauril sulfato de sodio	2 g
agua destilada cbp	100 mL
nipagín	5 gotas

5.4.1. Preparación de extractos oleosos

Relación 1:10 (1 g de tejido vegetal por cada 10 mL de aceite mineral).

5.4.2. Preparación de extractos etanólicos

Relación 1:10 (1 g de tejido vegetal por cada 10 mL de etanol).

5.4.3. Preparación de extracto hexánico oleoso

Las flores y hojas fueron maceradas, por separado, con hexano en una relación 1:10 (un gramo de tejido por 10 mL de hexano). Ambos extractos se dejaron reposar durante quince días dentro de matraces Erlenmeyer cubiertos con papel aluminio. Ambos extractos se filtraron para después ser llevados a sequedad utilizando un rotavapor a una temperatura de 45°C.

Los extractos fueron resuspendidos en 10mL de aceite mineral.

5.4.4. Formulaciones elaboradas

Fórmula 1: base suave retirable con agua (25g), 1 mL de extracto hexánico oleoso de flor y 5 gotas de nipagín.

Fórmula 2: base suave retirable con agua (100g), 3 mL de extracto hexánico oleoso de flor y 10 mL de extracto etanólico de flor. Sin nipagín.

Fórmula 3: base suave retirable con agua (100g), 10 mL de extracto oleoso de flor (centrifugado) y 10 mL de extracto etanólico de flor. Sin nipagín

Fórmula 4: base suave retirable con agua (100g), 3 mL de extracto oleoso de flor (centrifugado) y 10 mL de extracto etanólico de flor. Sin nipagín

Fórmula 5: base suave retirable con agua (100g), 3 mL de extracto oleoso de flor (sin centrifugar) y 10 mL de extracto etanólico de flor. Sin nipagín

Fórmula 6: base suave retirable con agua (25g), 1 mL de extracto hexánico oleoso de hoja y 5 gotas de nipagín.

Fórmula 7: base suave retirable con agua (100g), 10 mL de extracto etanólico de hoja y 5 gotas de nipagín

Fórmula 8: base suave retirable con agua (100g), 3 mL de extracto oleoso de Hoja (centrifugado) y 10 mL de extracto etanólico de hoja.

5.5. Metodología de la elaboración de emulsión O/W

La formulación del producto consiste en una emulsión de aceite en agua (O/W). La elaboración del producto está definida por dos fases: la fase oleosa que está constituida por alcohol estearílico, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo y aceite mineral y la fase acuosa está formada por agua destilada, lauril sulfato de sodio y glicerina.

Los componentes de la fase oleosa, incluidos los emulgentes fueron mezclados en un vaso de precipitado, en otro vaso se vertieron los componentes de la fase acuosa. Posteriormente, la fase oleosa se sometió a calentamiento a la temperatura de fusión del componente con punto de fusión más elevado, en este caso, el monoestearato de glicerilo con un punto de fusión de 54-64°C. También la fase acuosa fue calentada a la misma temperatura que la fase oleosa, finalmente se preparó la emulsión por adición de la fase acuosa sobre la oleosa, con agitación moderada durante toda la fase de enfriamiento. Posteriormente, se

añadió el extracto oleoso y el extracto etanólico, homogeneizando la emulsión (Figura 7).

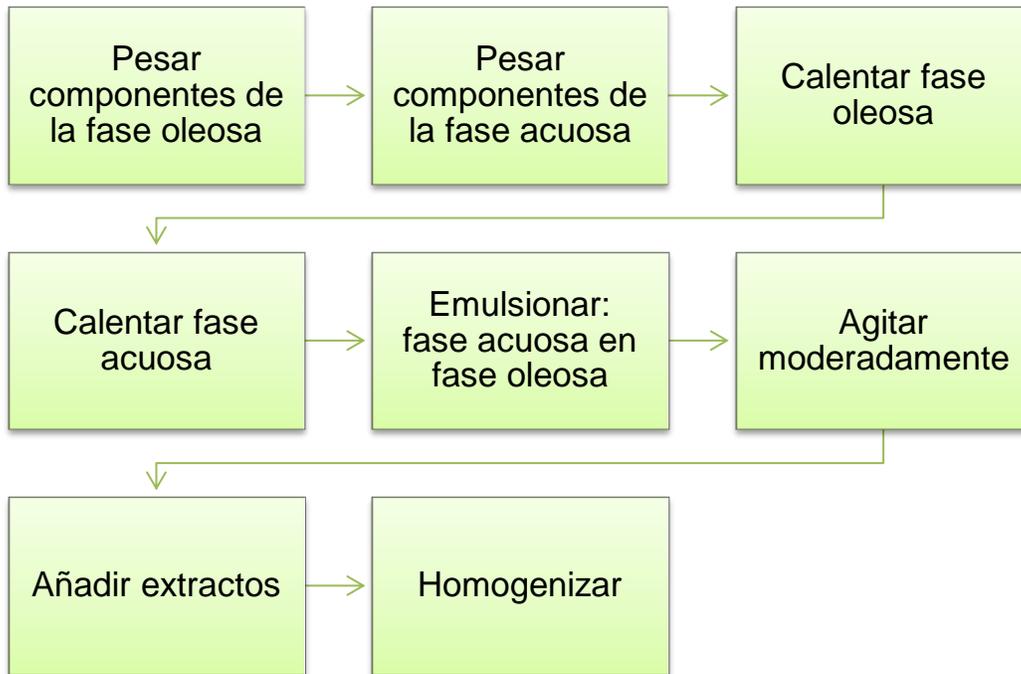


Figura 7. Metodología para elaborar una emulsión O/W.

5.6. Caracterización del producto final

Una vez formulada y preparada la crema se valoraron las siguientes propiedades organolépticas: color, olor, brillo, textura, consistencia y apariencia. También se analizaron las propiedades fisicoquímicas, en este caso el pH. Finalmente se efectuaron las pruebas de estabilidad mediante el proceso de centrifugación.

5.7. Determinación de la actividad antioxidante

5.7.1. Técnica DPPH (Según Karamác *et al.*, 2005 modificado por CID-Estrada)

Se preparó el reactivo DPPH 1,1-difenil-2-picrilhidrazil a 500 μ M en etanol y una solución buffer (Tris-HCl a 0.1 M con un pH de 7.4). Para la curva patrón se utilizó el trolox o ácido ascórbico. La reacción fue: 0.1 mL del extracto agregándole 0.5 mL del reactivo DPPH y 0.4 mL de la solución buffer transcurridos 20 min para que haga reacción, determinando la absorbancia a 517 nm.

5.7.2. Técnica FRAP (Según Thaipong *et al.*, 2006 modificado por CID-Estrada)

Se preparó la solución FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power) en relación 1:1:10 compuesta de las siguientes soluciones: [2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina, TPTZ a 10 mM], (FeCl₃ a 20 mM) y (Acetato de sodio a 300 mM con un pH de 3.6). Como estándar se utilizó Trolox. Una vez obtenida la solución FRAP se hizo la siguiente reacción: se tomó 0.2 mL del extracto agregándole 3 mL de la solución FRAP dejando 20 min en oscuridad para que se lleve a cabo la reacción y después se tomaron lecturas a 593 nm en el espectrofotómetro.

5.7.3. Técnica ABTS (Según Arnao *et al.* 2001, modificado por CID-Estrada)

Se preparó las soluciones stock de ABTS (Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6- sulfónico), 7.4 mM y de persulfato de potasio 2.6mM. A continuación, se preparó la solución de trabajo mezclando las 2 soluciones stock en cantidades iguales y se dejó reaccionar durante 12 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Después, la solución de trabajo se diluyó mediante la mezcla de 1 mL de la solución stock de ABTS con 60 mL de metanol y se tomaron lecturas en el espectrofotómetro esperando obtener una absorbancia de 1.1 ± 0.02 unidades a 734 nm. Para los ensayos se utilizó la siguiente reacción: del extracto de la muestra se tomó 150 μ L y se dejó reaccionar con 2850 μ L de solución stock de ABTS durante 2 h en oscuridad. A continuación, se determinó la absorbancia a

734 nm. Para la curva patrón se utilizó trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) en un rango de 25 a 600 μ M.

5.7.4. Técnica determinación de Fenoles (Según Pripdeevech *et al.*, 2010, modificado por CID-Estrada)

A 0.2 mL de la solución problema, se le añadió 1.0 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, 1 mL de una solución acuosa de Na_2CO_3 7% y 5 mL de agua destilada, se mezcló vigorosamente, y se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente, y después se tomaron lecturas a 765 nm. Se usó ácido gálico como estándar.

5.7.5. Técnica determinación de Flavonoides (Según Chang *et al.*, 2002, modificado por CID-Estrada)

A 500 μ L de extracto se le añadió 1500 μ L de etanol al 95%, 100 μ L de AlCl_3 al 10% y 100 μ L de acetato de potasio (1M) y 2800 μ L de agua destilada, se agitó la mezcla y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min, después se determinó la absorbancia a 415 nm. Se usó rutina como estándar.

5.8. Determinación de la actividad antibacteriana

5.8.1. Preparación de medio de cultivo

Para las pruebas de actividad antibacteriana se utilizó medio de cultivo Luria, el cual, para un litro contiene: 10g de peptona (triptona), 10g de NaCl, 5g de extracto de levadura y 15g de agar bacteriológico, a pH 7.

El medio se esterilizó (autoclave) a una temperatura de 121°C/a 15 libras de presión por 15 minutos; y fue vertido en cajas Petri, dejándose enfriar a temperatura ambiente para posteriormente sellarse con plástico adherible. Se almacenaron a 5°C para ser usadas en un lapso de 5 días después de la preparación.

5.8.2. Inoculación de placas de Petri

Las cajas se inocularon mediante la metodología de rayado, esparciendo con una asa 30µL de cada una de las bacterias, en fase logarítmica, de manera uniforme, rotando la caja aproximadamente 60° para asegurar una distribución homogénea.

Cada caja se dividió en cuatro cuadrantes, y se agregó a dos secciones 3µL de solución de los diferentes extractos y en las otras dos secciones se agregó una porción de las diferentes cremas. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando 2 cajas de Petri por cepa bacteriana, de 2 bacterias Gram positivas: *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*.

También se utilizaron dos cajas Petri con medio de cultivo Luria divididas en dos secciones donde en cada sección añadimos una porción de crema de cada extracto.

5.9. Análisis Estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos obtenidos en los ensayos DPPH, FRAP, ABTS fueron expresados en µM Trolox (TEAC). También se analizaron las muestras mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los antioxidantes más seguros de origen vegetal son esenciales para prevenir la progresión de trastornos mediados por radicales libres. Los radicales libres (FR) se crean cuando las células utilizan oxígeno para generar energía. Un proceso de oxidación, que se produce naturalmente en el cuerpo humano, implica la transferencia de electrones de un átomo a otro. Dado que el oxígeno es el último aceptor de electrones en el flujo de electrones, sistema que produce energía en forma de ATP, la oxidación es una parte esencial de la vida aeróbica y el metabolismo humano. Pero el problema surge cuando el flujo de electrones del proceso de oxidación se desparejan y posteriormente generan radicales libres, conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO), tales como superóxido, hidroxilo, peróxido de hidrogeno y óxido nítrico (Sampath *et al.*, 2016).

6.1. Evaluación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Alternativamente, diversos compuestos cromógenos (ABTS, DPPH y FRAP) son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos que contienen las plantas para captar los radicales libres generados, operando así en contra los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno (Kuskoski, 2005).

Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y plantas medicinales. Pero aquella que ha recibido una preferencial atención es la técnica que utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Este radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente oxidante (Guija-Poma *et al.*, 2015). La actividad antioxidante es dependiente de la concentración del extracto (Kuskoski, 2005).

Existe una gran variedad química de compuestos que presentan actividad antioxidantes y presentan diferente mecanismo de acción, el usar únicamente un método para la determinación de la actividad antioxidante no provee de una información confiable del perfil antioxidante de una planta, es por eso que la literatura sugiere el uso de dos o más técnicas que midan dicha capacidad. En este estudio usamos tres métodos diferentes el DPPH, ABTS y el FRAP. La actividad antioxidante en de los extractos etanólicos se describen en el cuadro 3 y los resultados de los extractos hexánicos se describen en el cuadro 4.

Cuadro 3. Capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de hoja y flor de *Callistemon citrinus* y contenido de fenoles y flavonoides totales.

	Capacidad antioxidante (μM Trolox/g peso fresco)			Fenoles	Flavonoides
	ABTS	DPPH	FRAP	GAE mg/mg de tejido	Rutina mg/mg de tejido
Hoja de <i>C. citrinus</i>	4499.22	7275.56	9786.54	0.66	0.06
Flor de <i>C. citrinus</i>	4499.22	12264.44	11189.1	1.01	0.01

Cuadro 4. Capacidad antioxidante de los extractos hexánicos de hoja y flor de *Callistemon citrinus* y contenido de fenoles y flavonoides totales.

	Capacidad antioxidante (μM Trolox/g peso fresco)			Fenoles	Flavonoides
	ABTS	DPPH	FRAP	GAE mg/mg de tejido	Rutina mg/ mg de tejido
Hoja de <i>C. citrinus</i>	5582.43	10801.12	2044.16	0.52	0.04
Flor de <i>C. citrinus</i>	10801.12	25007.94	3264.65	0.95	0.27

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH, se ha expresado en equivalentes de Trolox (TEAC) para las muestras de hoja y flor de *C. citrinus*. Los valores obtenidos varían, en el extracto etanólico de flor con una concentración de 1226.44 μM de Trolox/mg de extracto seco y en el extracto etanólico de hoja con 727.55 μM de Trolox/mg de extracto seco. La capacidad antioxidante de los extractos hexánicos es mayor que la concentración de los extractos etanólicos, en el extracto hexánico de hoja hay una concentración de 10801.12 μM de Trolox/mg de extracto seco, el extracto de flor con una concentración de 25007.94 μM de Trolox/mg de extracto seco presentó la mayor capacidad antioxidante.

Actualmente el método ABTS es usado tanto para materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipofílica (Kuskoski *et al.*, 2004) en este caso los valores obtenidos en los extractos etanólicos tanto de hoja como flor son iguales, dando una concentración de 449.921 μM de Trolox/mg de extracto seco. Los resultados obtenidos de los extractos hexánicos tienen mayor capacidad antioxidante que los extractos etanólicos, el extracto de flor con una concentración de 10801.12 μM de Trolox/mg de extracto seco a diferencia del extracto de hoja con una concentración de 5582.43 μM de Trolox/mg de extracto seco.

El método de FRAP consiste en medir el incremento en la absorbancia a 593nm que se desarrolla cuando el complejo TPTZ- Fe^{+3} se reduce a TPTZ- Fe^{+2} así de esta forma, la capacidad antioxidante que presentan los extractos de diferentes plantas se mide como la capacidad reductora del extracto (Garcia *et al.*, 2011). Los valores más altos como reductores lo posee el extracto etanólico de flor de *C. citrinus* con una concentración de 1118.9102 μM de Trolox/mg de extracto seco mientras que el extracto etanólico de hoja tiene una concentración de 978.653 μM de Trolox/mg de extracto seco. Como describimos anteriormente los resultados obtenidos de los extractos hexánicos son mayores que los etanólicos, en este caso la concentración de la hoja casi se duplica teniendo 2044.16 μM de

Trolox/mg de extracto seco y triplicándose el valor de la flor con mayor capacidad reductora del extracto con una concentración de 3264.65 μM de Trolox/mg de extracto seco.

6.2. Contenido de compuesto fenólicos

Los compuestos fenólicos son muy importantes como constituyentes de las plantas debido a su habilidad para secuestrar radicales libres (Jauregui *et al.*, 2007). La concentración de compuestos fenólicos totales de *C. citrinus* se expresan en mg ácido gálico equivalente/mg de extracto seco. El contenido de compuestos fenólicos totales es un poco variable, el extracto etanólico de la flor de *C. citrinus* presenta mayor contenido respecto de la hoja de *C. citrinus* con una concentración de 0.1005 mg de GAE/mg de extracto seco y 0.0655 mg de GAE/mg de extracto seco, respectivamente. Los resultados obtenidos de los compuestos fenólicos del extracto hexánico de flor y hoja, varían un poco teniendo en hoja 0.52 mg de GAE/mg de extracto seco y en flor con mayor concentración 0.95 mg de GAE/mg de extracto seco.

6.3. Contenido de flavonoides

Existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (Trueba, 2003). La concentración del contenido de flavonoides de *C. citrinus* se expresan en mg de Rutina/ mg de extracto seco. La hoja de *C. citrinus* tiene una concentración de 0.0619 mg de Rutina/mg de extracto seco mientras que la concentración de flor es menor con 0.0106 mg de Rutina/mg de extracto seco. En los valores obtenidos del contenido de flavonoides en los extractos hexánicos, varían mucho respecto a los extractos etanólicos, teniendo así en hoja 0.04 mg de Rutina/mg de extracto seco y en flor una concentración de 0.27 mg de Rutina/mg de extracto seco.

6.4. Análisis de muestras mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)

Entre los compuestos analizables por GC-MS figuran los de interés ambiental, aromas y fragancias, drogas y sus metabolitos, solventes. Entre diversos productos naturales, se han caracterizado miles de terpenos y terpenoides, derivados fenólicos y alcaloides (Martínez, 2011). La composición química de los extractos de *C. citrinus* tanto hexánicos como etanólicos se determinó mediante su análisis por GC/MS. Entre los compuestos más abundantes identificados en el extracto etanólico de flor tenemos D-limoneno, Eucaliptol y α -Terpineolo y en la hoja tiene Eucaliptol, Fitol y Terpinolen. En la Figura 8, se registran los compuestos mayoritarios identificados en los extractos de las especies vegetales estudiadas.

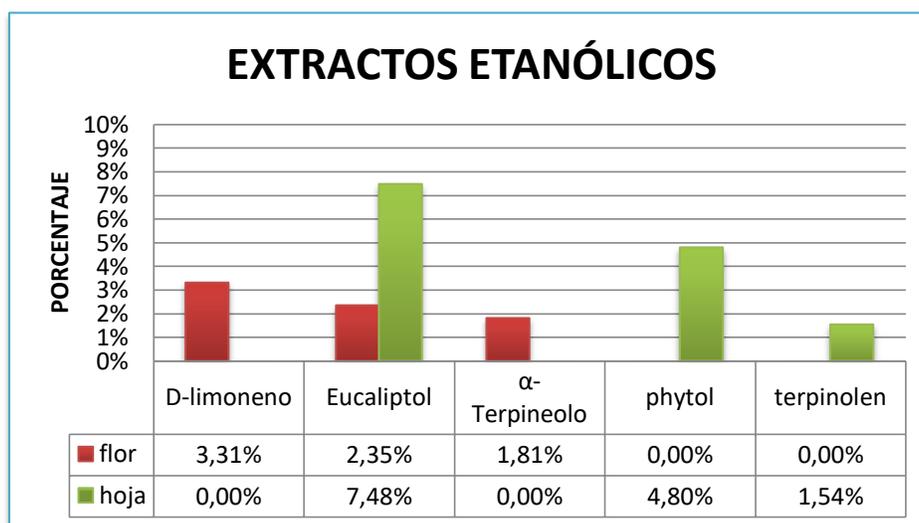


Figura 8. Composición química de los extractos etanólicos determinada por GC-MS.

También se determinaron los compuestos de los extractos hexánicos, entre los más abundantes de los extractos hexánicos de flor tenemos el Eucaliptol, Mentol y

Elemene mientras que en la hoja encontramos Eucaliptol, Escualeno y Mentol como se muestra en la Figura 9.

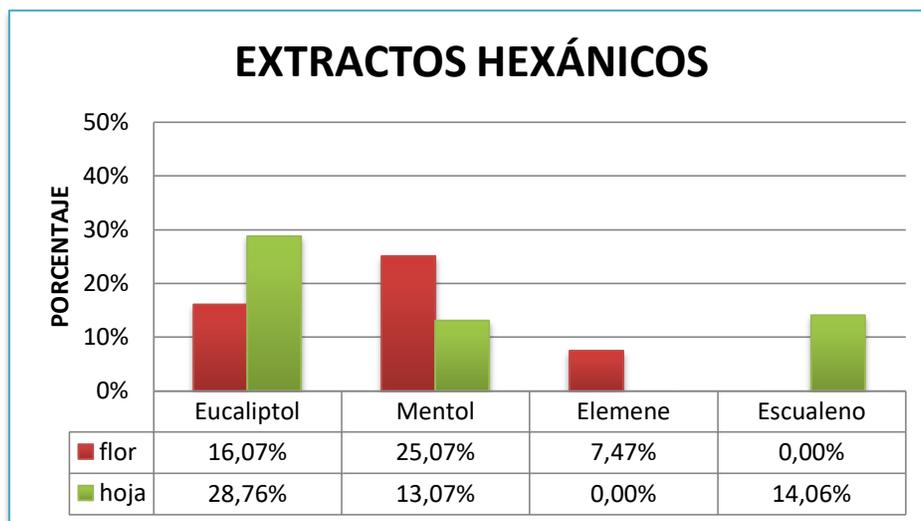


Figura 9. Composición química de los extractos hexánicos determinada por GC-MS.

6.5. Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de hoja y flor de *C. citrinus*

Numerosas son las investigaciones que se realizan encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales. Un considerable número de estudios han sido encaminados hacia la evaluación de actividades antimicrobianas en extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Para ello se han empleado las técnicas *in vitro* dada la sencillez y reproducibilidad de las mismas (Hernández, 2001). En este trabajo se analizó la actividad antibacteriana de la hoja y flor de *C. citrinus*. Las bacterias seleccionadas fueron dos especies Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. En la Figura 10 se muestra el efecto antibacteriano

de los extractos etanólicos de flor y hoja de *C. citrinus*, el que presentó halos de inhibición antibacteriana contra las dos bacterias.

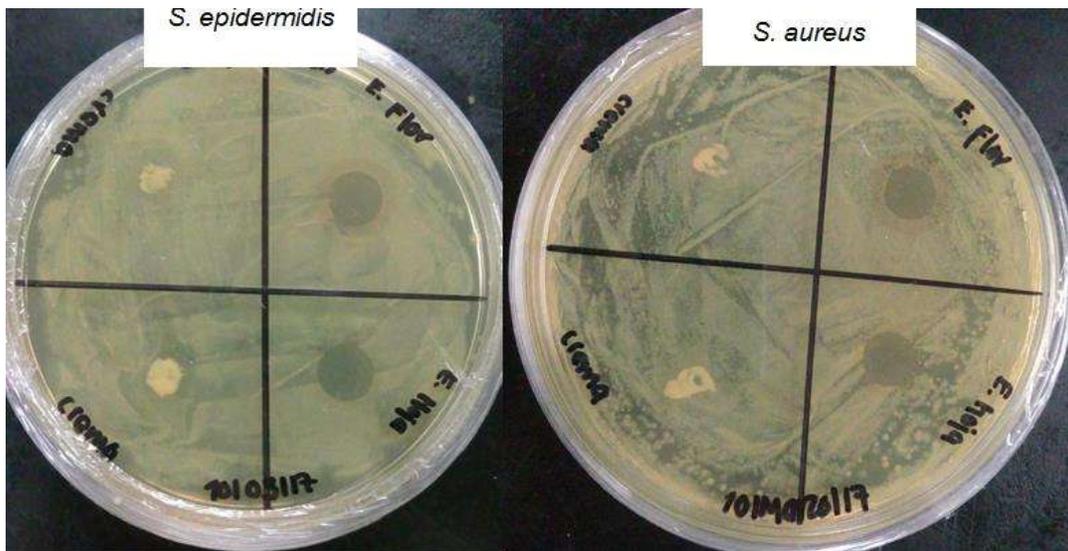


Figura 10. Efecto de los extractos etanólicos de la hoja y flor de *C. citrinus* sobre el crecimiento de las dos bacterias Gram positivas: *Staphylococcus epidermidis* v *Staphylococcus aureus*.

La flora cutánea está conformada por bacterias, hongos y parásitos y se divide en 2 grupos: la flora residente y la flora transitoria, teniendo *S. epidermidis* en flora residente y *S. aureus* en flora transitoria (Delgadillo, 2002), es por eso que se realizó la comparación con una porción de crema, apreciando en la Figura 11, que la crema de flor presenta un ligero halo de inhibición solo en *S. epidermidis* indicativo de que la crema no afectará la flora normal de la piel.

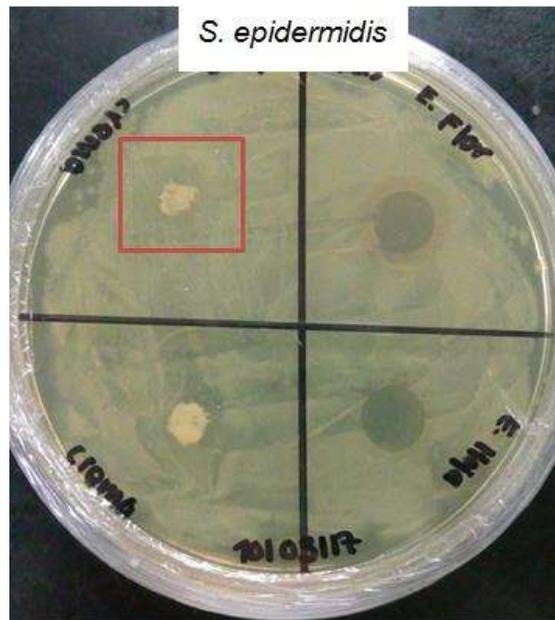


Figura 11. Efecto de la crema de flor de *C. citrinus* sobre el crecimiento de la bacteria Gram positiva: *Staphylococcus epidermidis*.

Las emulsiones, en especial las O/W, tienen un importante riesgo de contaminación microbiológica; esta contaminación puede provenir de las materias primas más susceptibles a contaminarse, como el agua o algunos extractos vegetales o de los envases que pueden favorecerla. Por este motivo se deben realizar controles microbiológicos, para asegurar que no se produce la contaminación ni que los conservantes pueden ser inhibidos por la acción de los emulgentes empleados (Mujica *et al.*, 2010). En la Figura 12 puede observarse que no hay presencia de crecimiento bacteriano en la crema debido a las propiedades antibacterianas de los extractos utilizados, cabe mencionar que la formulación utilizada no contiene ningún conservante, uno de los más frecuentemente usado es el nipagín (parahidroxibenzoato de metilo ó metilparaben ó E-218). Los ésteres del ácido p-hidroxibenzoico, presentan propiedades conservantes, su modo de acción es sobre la membrana del microorganismo.



Figura 12. Crema sin presencia de crecimiento bacteriano debido a las propiedades antibacterianas de los extractos.

6.6. Caracterización del producto final

Una vez terminada la crema con poder antioxidante se valoraron algunas propiedades, entre ellas están: las propiedades organolépticas, fisicoquímicas y de estabilidad. Las características organolépticas proporcionan una primera impresión de la calidad del producto, deben presentar aspecto homogéneo, color y olor agradable o por lo menos aceptable y textura suave luego de la aplicación vía tópica (Isla, 2005). En el Cuadro 5 se presentan los resultados de las propiedades organolépticas y fisicoquímicas.

Cuadro 5. Propiedades organolépticas y fisicoquímicas de la crema.

Muestra	Color	Brillo	Olor	Apariencia	Textura	Consistencia	pH
Fórmula 8	verde	presenta	Cítrico	homogénea	suave	cremosa	5.1
Fórmula 4	sui géneris	presenta	Cítrico	homogénea	suave	cremosa	5.1

Cabe mencionar que el color y el olor (Figura 13) viene dado por los extractos de la planta de *C. citrinus*.



Figura 13. Color del producto terminado. Crema de hoja (izquierda) y crema de flor (derecha).

Las pruebas de estabilidad indican la preservación de sus propiedades físicas y químicas a través del tiempo (Mujica *et al.*, 2010). La centrifugación es una prueba que indica si hay separación de fases (Figura 14), en la que se aprecia que la prueba de centrifugación es negativa, ya que no presenta separación de fases, es decir que sus propiedades se han mantenido.



Figura 14. Prueba de estabilización: centrifugación.

6.7. Aceptación del producto terminado

Durante el día la piel se enfrenta a las agresiones ambientales como la radiación ultravioleta y contaminación, que alteran el funcionamiento celular, para lo cual es necesario utilizar productos que hidraten y lubriquen con activos que arrastran moléculas de agua al interior de la epidermis, y emolientes que fortalecen la capa lipídica, a fin de que la piel pueda retener mejor la humedad y disminuya su evaporación. Sin embargo, es en la noche cuando la piel se recupera. Al dormir los músculos se relajan, la sangre llega al cerebro con mayor fluidez, el sistema inmunológico se fortalece y las células se regeneran más rápido. Es por ello, que las cremas destinadas a las horas de sueño se basan en activos capaces de potenciar la regeneración celular y reactivar procesos biológicos esenciales como la reparación de las defensas, para construir una barrera frente al exterior (Mujica *et al.*, 2010). En este trabajo para conocer la aceptación del producto, las muestras de crema fueron probadas en 13 personas de diferente sexo (8 mujeres y 5 hombres), comprendidas en diferentes edades, a quienes se les recomendó utilizar la crema durante un mes aplicando de día y de noche en la piel limpia y seca. Posteriormente las personas voluntarias dieron su testimonio que el producto cumplía con las propiedades organolépticas descritas, enfocándose en que el aspecto y la consistencia es muy buena. Algunas personas opinaron que la textura que se siente al utilizar la crema es muy suave, incluso al momento de remover la crema con agua, la suavidad y protección en la piel continúan. Hay personas que afirman haber conseguido mejoras en el aspecto de la piel, tanto en cara como en manos.

7. CONCLUSIÓN

Los extractos hexánicos de flor de *Callistemon citrinus* presentó tanto mayor actividad antioxidante como contenido de fenoles y flavonoides que la hoja de *C. citrinus*.

Los extractos etanólicos de flor de *C. citrinus* presentaron mayor capacidad antioxidante que la hoja, aunque el extracto de hoja presentó mayor cantidad de flavonoides.

Se logró formular y elaborar la crema a base de los dos diferentes extractos de *Callistemon citrinus*, con poder antioxidante, protegiendo la piel, dejando una sensación de frescura y suavidad tanto en manos como en cutis.

8. LITERATURA CITADA

- Acosta, G. J. (2008). *Alcaloides y compuestos nitrogenados. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín.*
- Ahmed, F., y Rahman, M. S. (2016). Preliminary assessment of free radical scavenging, thrombolytic and membrane stabilizing capabilities of organic fractions of *Callistemon citrinus* (Curtis.) Skeels leaves. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16, 247
- Álvarez, R. G. (2012). Plantas medicinales en una aldea del estado de Tabasco, México. *Fitotecnia mexicana*, 35(1).
- Álvarez, S., Navarro, A., Nicolás, E., y Sánchez-Blanco, M. J. (2011). Transpiration, photosynthetic responses, tissue water relations and dry mass partitioning in *Callistemon* plants during drought conditions. *Scientia Horticulturae*, 129(2) 306-312.
- Aranberri, B. B., Fletcher, P. (2006). Elaboracion y caracterizacion de emulsiones estabilizadas por polimeros y agentes tensioactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 7(3).
- Avello, M., y Suwalsky, M. (2006). Radicales libres; antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, 161-172.
- Azcón, J. B., y Talón, M. (1993). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. McGraw-Hil Interamericana de España.
- Balasundram, N., Sundram, K., y Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potencial uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
- Bhushan, B., y Bansal, S. S. (2015). Anti-diabetic potenciales of *Clerodendrum inerme*, *Jasminum mesnyi* Hance and *Callistemon citrinus* on nicotinamide-

- streptozotocin induced type 2 diabetic rats. *International Journal of Phytomedicine*, 7(6), 136-141.
- Cano, E., Ortiz, A. C., y Cobos, M. C. (2009). Flora medicinal utilizada en las enfermedades de la piel y en belleza . *Boletín. Instituto de Estudios Giennenses*, 200.
- Cid Estrada, E. (2014). Determinación de la capacidad antioxidante en *Callistemon citrinus*, *Hibiscus rosa-sinensis* y *Plumbago auriculata*. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo (UMSNH). Morelia, Michoacan. México. 62 pp.
- Cifuentes, M. C., Maldonado, M. P., y Castaño, A. M. (2013). Actividad antibacteriana de los aceites obtenidos de *Ocimum basilicum* L. var. cinammom, *O. album*, *O. thyrsoflorum*, para uso potencial en fitocosmética. *Investigaciones Andina*, 15(27), 134.
- Coronado H, Marta, Vega y León, Salvador, Gutiérrez T, Rey, Vázquez F, Marcela, & Radilla V, Claudia. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 42(2), 206-212.
- Delgadillo, V. S. (Enero-Abril de 2002). Flora cutánea como protección y barrera de la piel normal. *Rev Cent Dermatol Pascua*, 11(1).
- Kuskoski E. Marta, A. G. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology (Campinas)*, 25(4).
- García, A. Á., y Carril, E. P.-U. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. *Reduca*, 2(3), 119-145.
- García, J. E., Hernández, B. C., Gilberto Robles Arellano, J. Z., Rocha, A. L., y Verduzco, J. E. (2012). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*(39), 29-44.

- Garcia, J. R., Rosa, L. A., Duenez, B. H., Barrios, A. G., Diaz, J. A., Aguilar, G. A., y Parrilla, S. R. (2011). Cuantificación de polifenoles y capacidad antioxidante en duraznos comercializados en Ciudad Juárez, México. *Tecnociencia Chihuahua*, 5(2).
- González, G. L. (2006). *Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Goyal, P. K., Jain, R., Jain, S., y Sharma, A. (2012). A review on biological and phytochemical investigation of plant genus Callistimon. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*.
- Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M. Á., y Zarzosa-Norabuena, J. P.-P. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horiz Med*, 15(1), 57-60.
- Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Medicina Militar*, 31(2), 33-126.
- Haque, E., Sultana, A., Shibib, B. A., y Islam, M. (2012). Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Callistemon citrinus (curtis) Skeels. Dhaka, Bangladesh.
- Higuero, S. C. (2004). Procedimientos normalizados de trabajo– pn/1/ff/002/00 elaboracion de emulsiones. *Offarm*, 23(4).
- Isla, I. S. (2005). Elaboración de una crema para uso tópico a base de Urtica dioica L. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 47(2).
- Jadoon, S., Karim, S., Asad, M. H., Akram, M. R., Khan, A. K., Malik y A. Murtaza G. (2015). Anti-Aging Potencial of Phytoextract loaded-Pharmaceutical Creams for Human Skin Cell Longevity. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 17.
- Jamzad, M., Kazembakloo, A., y Rostami, A. D.-T. (2014). Essential oil composition and antioxidant activity of hydromethanolic extract from the

- flowers, leaves and stems of *Callistemon citrinus* (curtis) Skeels. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 5(4), 308-312.
- Jauregui, A. M., Ramos-Escudero, D. F., y Castañeda, C. A.-O. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73(3).
- Jiménez-Arellanes, M. A., García-Martínez, I., y Rojas-Tomé, S. (2014). Potencial biológico de especies medicinales del género *Cnidocolus* (Euphorbiaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45(4).
- Hernández Díaz, Lizet y Rodríguez Jorge, Mayra (2001). Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 6(2), 44-47
- Kumar, D., Sukapaka, M., Babu, G. D., y Padwad, Y. (2015). Chemical Composition and In vitro Cytotoxicity of Essential Oils from Leaves and Flowers of *Callistemon citrinus* from Western Himalayas. *PLoS ONE*, 10(8).
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Parrilla, M. C., y Fett, A. M. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Food Science and Technology (Campinas)*, 24(4), 691-693.
- López Argelia L., A. Carlos Fernando, Lazarova, Z., Bañuelos, Rómulo V. y Sánchez Sergio Hugo R. (2012). Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. *ANACEM*, 6(1).
- López Mejía A. (2015). Estudio farmacológico de los extractos de hoja y flor de *Callistemon citrinus*. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Morelia, Michoacan, México. 67 pp.
- Mabhiza, D., Chitemerere, T., y Mukanganyama, S. (2016). Antibacterial Properties of Alkaloid Extracts from *Callistemon citrinus* and *Vernonia*

adoensis against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 7 pp.

Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Caracas: Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.

Martínez, E. E. (2011). Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica*, 3(1), 25-49.

Mujica, V., Delgado, M., Ramírez, M., Velásquez, I., Pérez, C., y Rodríguez-Corella, M. (2010). Formulación de un producto cosmético con propiedades antiarrugas a partir del aceite de semilla de merey (*Anacardium Occidentale* L). *Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Central de Venezuela*, 25(2), 119-131.

Munir, H., y Sarfraz, R. A. (2014). Medical Attributes of *Aerva javanica* Native to Pothohar Plateau. *Pakistan Journal of life and Social Sciences*, 12(2), 80-86.

Nadinic, D. J. (2009). Fitocosméticos. La búsqueda de fitoingredientes está orientada a obtener beneficios adicionales en la actividad cosmética. *Safybi*, 56-57.

Oyedeeji, O. O., Lawal, O. A., Shode, F. O., y Oyedeeji, A. O. (2009). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Callistemon citrinus* and *Callistemon viminalis* from South Africa. *Molecules*, 14(6).

Paniagua, M. V., Gómez, B. P., y Pérez, R. C. (2004). El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias* 75.

Pérez-Alonso, N., y Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Bioteconología Vegetal*, 11(4), 195-211.

Pérez González, J. (2016). Determinación de la participación de los fenoles en la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de flor y hoja de *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels. Tesis de licenciatura. Facultad de

- Biología. Universidad Michoacan de San Nicolás de Hidalgo . Morelia, Michoacan, México. 44 pp.
- Petronilho, S., Rocha, S., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., y Rios-Chavez, P. (2013). Assessment of the terpenic profile of *Callistemon citrinus* (curtis) Skeels from Mexico. *Industrial Crops and Products*, 46, 369-379.
- Ramos, G. I., y Pérez, D. A. (2010). Antioxidantes en dermatología. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 8(4), 272-277.
- Romo, A. R. (2006). *Química de la Flora Mexicana*. México: Investigaciones en el Instituto de química UNAM.
- Sampath, S., Kalimuthu, B., Veeramani, V., Janardhanam, S., y Chellan, M. A. (2016). Evaluation of total antioxidant and free radical scavenging activities of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels extracts by biochemical and Electron Paramagnetic Resonance analyses. *Royal Society of Chemistry Advances* , 15.
- Santos, H. D. (2010). Emulsiones cosméticas. *Cosméticos & Tecnología Latinoamérica*, 1.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H., y Rocha-Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Serrano, M. N. (2012). *Tecnología farmacéutica*. España: Editorial Club Universitario.
- Shaha, A., y Salunkhe, V. R. (2014). Development and validation of a high performance thin layer chromatographic method for determination of 1, 8- Cineole in *Callistemon citrinus*. *Pharmacognosy Research*, 6(2), 143-147.
- Shrestha, S., Poudel, A., Satyal, P., Dosoky, N. S., y Setzer, B. K. (2015). Chemical composition and biological activity of the leaf essential oil of

- Callistemon citrinus from Nepal. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 3(1), 29-33.
- Shrestha, S., Poudel, A., Satyal, P., Dosoky, N. S., Chhetri, B. K., y Setzer, W. N. (2015). Chemical composition and biological activity of the leaf essential oil of Callistemon citrinus from Nepal. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 2(5), 29-33.
- Singh, S. D. (2012). Therapeutic potentials of Callistemon lanceolatus DC. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, 1(2).
- Solari, S. G., Vilchez, J. B., Vivar, J. L., Hermosilla, N. B., Galán, C. C., y Arredondo, M. R. (2011). Astaxantina: antioxidante de origen natural con variadas aplicaciones en cosmética. *BIOFARBO*, 19(2), 6-12.
- Trueba, G. P. (2003). los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1).
- Verpoorte, R., y Alferman, A. W. (2000). *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Wink, M. (1999). Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. In: Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in Biotechnology. *Ann Plant Rev*(3), 1-16.
- Zandi-Sohani, N., Hojjati, M., y Carbonell-Barrachina, A. A. (2012). Volatile Composition of the Essential Oil of Callistemon citrinus Leaves from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(5), 703-707.

ANEXOS

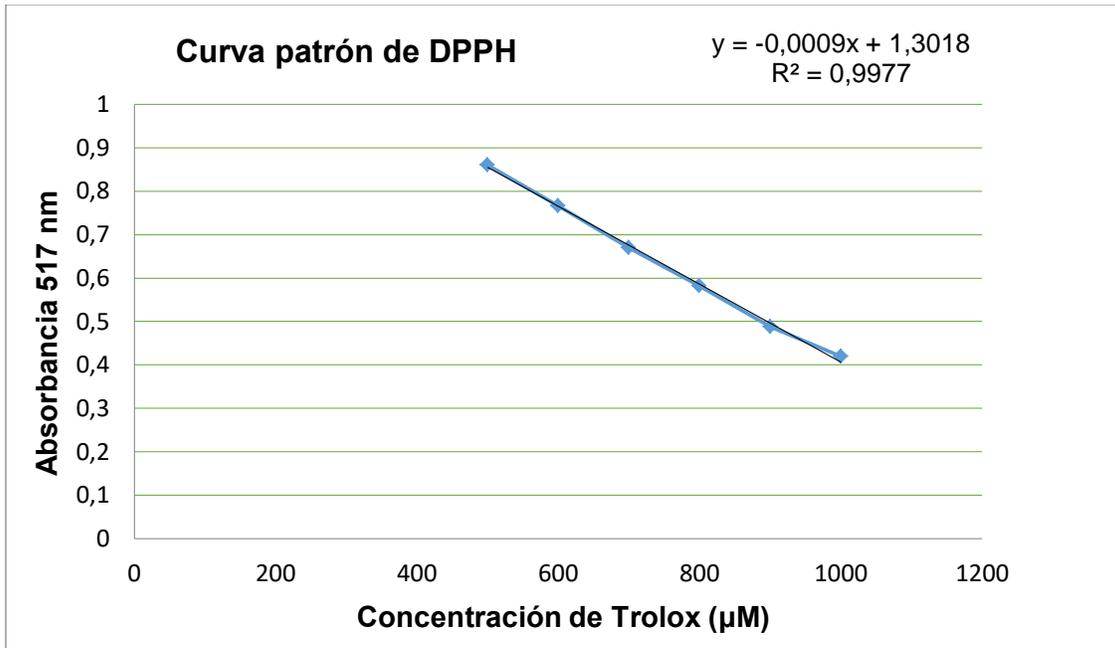


Figura 15. Curva patrón del trolox para la técnica DPPH.

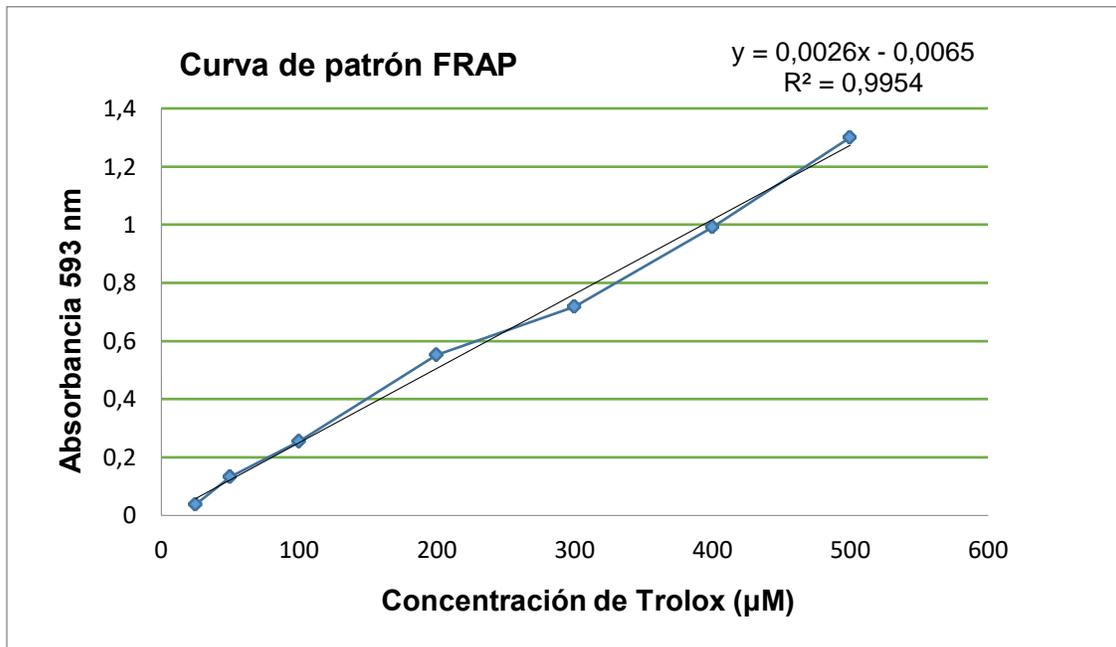


Figura 16. Curva patrón del trolox para la técnica FRAP.

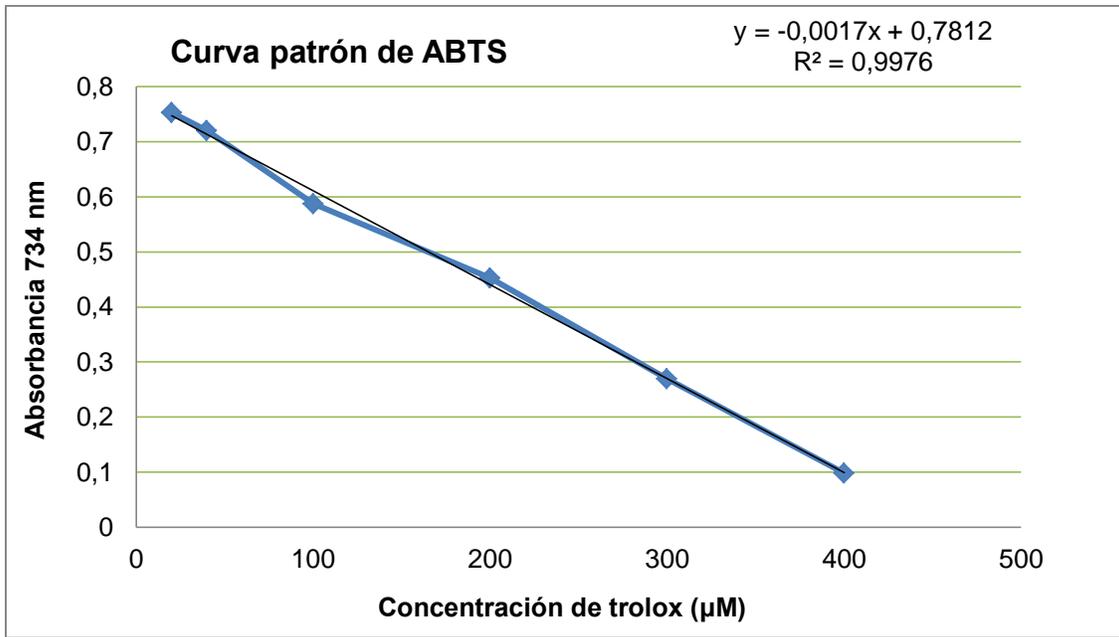


Figura 17. Curva patrón del trolox para la técnica ABTS.

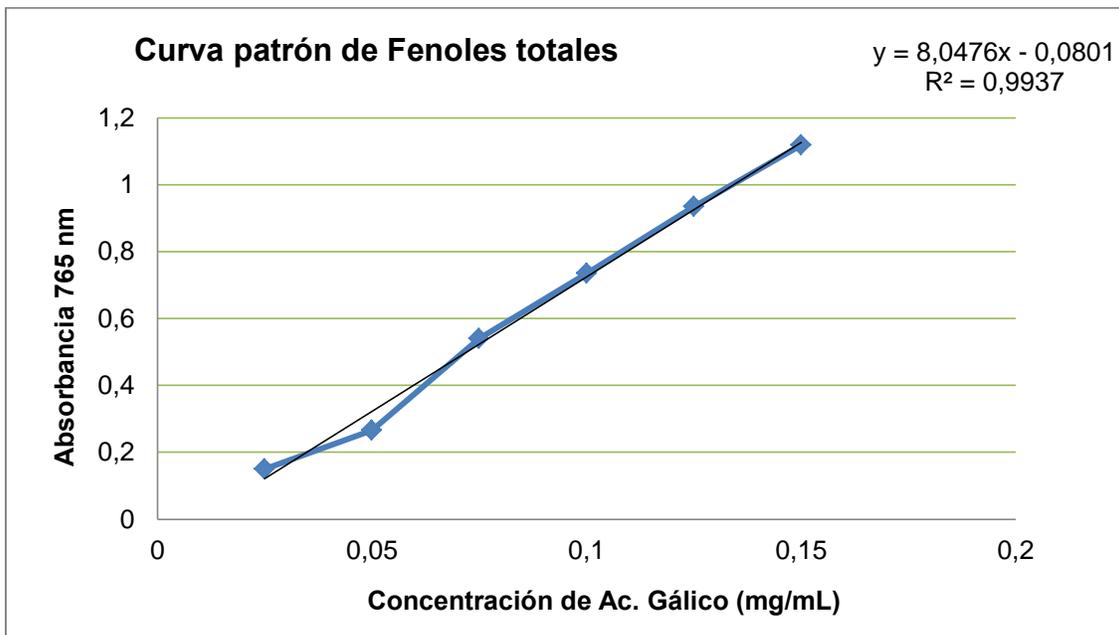


Figura 18. Curva patrón del ácido gálico para la determinar fenoles.

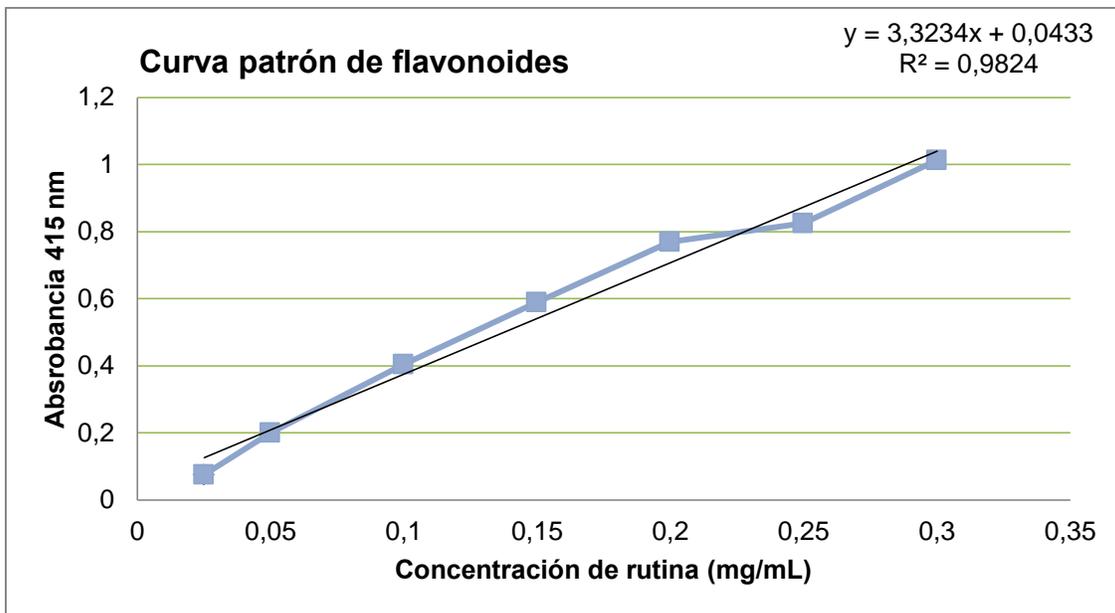


Figura 19. Curva patrón de rutina para determinar flavonoides.