



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA
QUÍMICA

Profesor(es) patrocinante(s):

Katherina Fernández Elgueta.
Miguel Pereira Soto.

Comisión:

Alfredo Gordon S.
Regis Teixeira M.

**“ESTUDIO CINÉTICO DE LA EXTRACCIÓN DE
COMPUESTOS FENÓLICOS EN CORTEZA DE
EUCALYPTUS NITENS Y *EUCALYPTUS GLOBULUS*
Y SU EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA”**

POR NICOLÁS FERNANDO GONZÁLEZ SILVA

Tesis presentada a la facultad de ingeniería de la Universidad de
Concepción para optar al grado de Magíster en ciencias de la ingeniería con
mención en Ingeniería Química

Diciembre 2017
Concepción, Chile

© 2017 Nicolás Fernando González Silva

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o
procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

Resumen

Las industrias forestales generan grandes cantidades de residuos, particularmente corteza, a causa de sus procesos industriales. La gran mayoría de estas industrias queman la corteza produciendo energía. Sin embargo, este proceso de combustión es de baja eficiencia y dañino para los equipos utilizados, debido a la gran cantidad de resinas que posee la corteza. Las especies *Eucalyptus globulus* (*E. globulus*) y *Eucalyptus nitens* (*E. nitens*), han cobrado gran importancia en Chile, abarcando el 33% de las plantaciones forestales totales del país en el año 2014. De éstas, se pueden extraer compuestos de alto valor agregado a partir de sus desechos, y con ello, aprovechar las propiedades antioxidantes de estos compuestos para formular un producto a escala laboratorio que posteriormente podría ser escalado a nivel industrial, utilizando un modo de extracción batch, siendo éste el más utilizado a escala laboratorio e industrial por su bajo costo energético.

El objetivo de este trabajo fue obtener extractos ricos en componentes fenólicos provenientes de la corteza de *E. nitens* y *E. globulus*, formulando la cinética de extracción y evaluando la resistencia que le confieren estos extractos a la degradación de madera de pino impregnada, atacada por hongos de pudrición.

Se muestrearon cortezas de árboles *E. nitens* y *E. globulus* de entre 10-12 años, del predio Los Castaños de Forestal Comaco. Se extrayeron componentes hidrofílicos de la corteza, mediante extracciones con metanol/agua según un diseño Box-Behnken con 3 factores: temperatura, razón sólido/líquido y concentración de metanol, siendo las respuestas rendimiento, fenoles totales y capacidad antioxidante. Con el óptimo del diseño se determinó y modeló la cinética de extracción de compuestos fenólicos a tres temperaturas para ambas especies. Se obtuvo el óptimo del diseño experimental a la mayor razón sólido/líquido (1:60), a una concentración del 51% de metanol en agua para ambas especies y a una temperatura de 46 y 53°C para *E. globulus* y *E. nitens*, respectivamente. Para ambas especies las etapas gobernantes en el proceso de extracción fueron identificadas como un proceso de difusión rápida o lavado y un proceso de difusión lenta.

El modelo de difusión de Fick extendido a dos fases extractivas representó exitosamente la cinética de extracción de los compuestos fenólicos desde la corteza de eucaliptus a diferentes temperaturas consiguiendo valores de la desviación porcentual absoluta promedio menores al 6% para ambas especies. Tanto para *E. nitens* como *E. globulus*, la etapa gobernada por el proceso de lavado obtuvo coeficientes de difusión efectivos de mayor orden que la etapa gobernada por el proceso de difusión para las tres temperaturas en estudio.

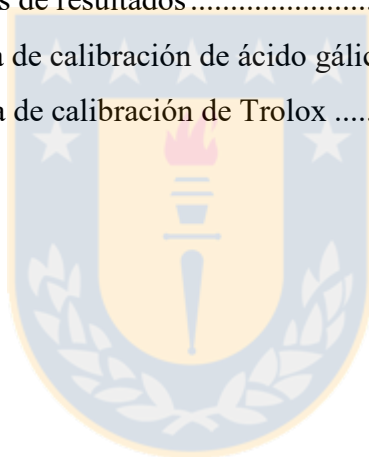
Se realizaron dos ensayos antifúngicos: la determinación de la concentración mínima inhibitoria, en la cual se determinó la concentración de extracto a la cual se inhibe parcial o completamente una especie fúngica; y el ensayo de pérdida de masa, donde se probó el extracto sobre madera de pino y se evaluó si éste inhibió el crecimiento de la especie fúngica sobre el sustrato (madera de pino). Se validó el uso del extracto de la corteza de eucaliptus para ambas especies, como posible antifúngico para el hongo *Trametes versicolor*, obteniendo resultados de inhibición en los ensayos de concentración mínima inhibitoria y pérdida de masa en madera de pino. Para este último, los resultados visuales y cuantitativos fueron similares a los obtenidos para el tratamiento con el producto antifúngico comercial (ketoconazol). Para estudios futuros se recomienda un estudio económico y medio ambiental para un posible reemplazo del antifúngico comercial o una combinación entre el antifúngico comercial y el extracto obtenido en este trabajo el cual pudiese presentar mejoras en la capacidad antifúngica.

Tabla de Contenido

Resumen.....	ii
Tabla de Contenido	iv
Índice de Tablas	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Ecuaciones.....	xi
Nomenclatura y abreviaciones	xii
1 Introducción.....	1
2 Hipótesis	3
3 Objetivos.....	4
3.1 Objetivo general	4
3.2 Objetivos específicos.....	4
4 Antecedentes generales.....	5
4.1 Situación nacional del eucaliptus	5
4.2 Corteza.....	7
4.2.1 Composición de la corteza	8
4.2.2 Molienda de la corteza	9
4.2.3 Características de los extraíbles y el proceso de extracción de la corteza	10
4.2.4 Composición química del extracto hidrofílico de la corteza.....	14
4.2.5 Potencialidades del extracto hidrofílico de eucaliptus	19
4.3 Variables que afectan el rendimiento de extracción.....	20
4.4 Modelos matemáticos de la cinética de extracción	22
4.4.1 Modelo de difusión unidimensional no estacionario (M1)	23
4.4.2 Modelo de difusión unidimensional no estacionario con balance del solvente (M2).....	25
4.4.3 Modelo extendido para dos fases de extracción (M3)	26

4.4.4	Modelo de ley de velocidad (M4)	27
4.4.5	Constantes cinéticas de los modelos	28
4.5	Análisis realizados a la corteza	31
4.5.1	Fenoles totales	31
4.5.2	Capacidad antioxidante	32
4.5.3	Ensayos antifúngicos	33
5	Materiales y métodos	39
5.1	Obtención de muestras	39
5.2	Pretratamiento y caracterización de las muestras	40
5.3	Extracción hidrofílica	42
5.4	Diseño de experimentos	44
5.5	Determinación de la cinética del proceso de extracción hidrofílica	46
5.5.1	Modelación de la cinética de extracción	47
5.6	Análisis de los extractos	48
5.6.1	Fenoles totales	48
5.6.2	Capacidad antioxidante	50
5.7	Ensayo de degradación de madera por medio de hongos de pudrición	51
5.7.1	Ensayo de concentración mínima de inhibición	51
5.7.2	Ensayo definitivo de degradación de madera de pino por medio de hongos de pudrición	52
5.8	Análisis estadístico	54
6	Resultados y discusión	55
6.1	Ensayos preliminares	55
6.1.1	Caracterización de la corteza molida	55
6.1.2	Cinética de extracción	57
6.2	Diseño de experimentos	60
6.2.1	Validación del modelo del diseño de experimentos	71
6.3	Cinética de extracción	72
6.3.1	Modelación de la cinética de extracción	75

6.4	Ensayos antifúngicos	92
6.4.1	Ensayo de concentración mínima inhibitoria.....	92
6.4.2	Ensayo de degradación de madera por medio de hongos de pudrición	98
7	Conclusiones.....	106
8	Bibliografía	107
9	Anexos	115
9.1	Anexo A: Muestreo de árboles.....	115
A.1.	Protocolo de muestreo.....	115
A.2.	Hojas de muestreo.....	117
9.2	Anexo B: Tablas de resultados.....	120
9.3	Anexo C: Curva de calibración de ácido gálico	121
9.4	Anexo D: Curva de calibración de Trolox	122



Índice de Tablas

Tabla 1: Composición típica de la corteza de <i>E. globulus</i>	9
Tabla 2: Rendimiento de extracción lipofílica en Soxhlet para corteza de <i>E. globulus</i> para diferentes tamaños de partícula	10
Tabla 3: Rendimientos de extracción lipofílica en Soxhlet para corteza de distintas especies de eucaliptus	12
Tabla 4: Rendimientos de extracción lipofílica en Soxhlet para corteza de <i>E. globulus</i> de diferentes zonas del árbol	13
Tabla 5: Rendimientos de extracción hidrofílica para corteza de distintas especies de eucaliptus.....	14
Tabla 6: Compuestos fenólicos reportados en el extracto hidrofílico de la corteza de <i>E. globulus</i> para metanol/agua 50/50 v/v	17
Tabla 7: Constantes cinéticas de los modelos matemáticos encontrados en la literatura	29
Tabla 8: Fenoles totales para distintas especies de eucaliptus, usando metanol/agua 50/50 v/v para la extracción	31
Tabla 9: Actividad antioxidante para distintas especies de eucaliptus por el método DPPH	33
Tabla 10: Factores y niveles para el diseño de experimentos	45
Tabla 11: Coeficientes de los modelos y parámetros estadísticos	66
Tabla 12: Óptimos del diseño experimental para <i>E. nitens</i> y <i>E. globulus</i>	68
Tabla 13: Valores predichos y experimentales de las respuestas óptimas obtenidas del modelo experimental.....	71
Tabla 14: Ajuste y parámetros del modelo de la ley de Fick para la cinética de extracción	78
Tabla 15: Ajuste y parámetros del modelo de la ley de Fick con balance de solvente para la cinética de extracción	82
Tabla 16: Ajuste y parámetros del modelo de la ley de Fick de dos fases para la cinética de extracción	84
Tabla 17: Ajuste y parámetros del modelo de ley de velocidad para la cinética de extracción	87

Tabla 18: Resumen de MAPD's de los modelos para <i>E. nitens</i> y <i>E. globulus</i> a las diferentes temperaturas	90
Tabla 19: Resumen de constantes cinéticas para <i>E. nitens</i> y <i>E. globulus</i> a las diferentes temperaturas	91
Tabla 20: Efecto causado por el extracto hidrofílico de la corteza de distintos árboles sobre la especie fúngica <i>T. versicolor</i>	92
Tabla 21: Efecto causado por el extracto hidrofílico de la corteza de distintos árboles sobre la especie fúngica <i>G. australe</i>	94
Tabla 22: Efecto causado por el extracto hidrofílico de la corteza de distintos árboles sobre la especie fúngica <i>P. ostreatus</i>	95
Tabla 23: Diámetros de halos de inhibición para la especie <i>T. versicolor</i>	98
Tabla 24: Condiciones del extracto utilizado en el ensayo de degradación de madera de pino.....	99
Tabla 25: Efecto causado por el extracto hidrofílico de la corteza de distintos árboles sobre la especie fúngica <i>T. versicolor</i> con tiempo de incubación de 30 días.....	100
Tabla 26: Efecto causado por el extracto hidrofílico de la corteza de distintos árboles sobre la especie fúngica <i>T. versicolor</i> con tiempo de incubación de 30 días.....	102
Tabla 27: Mediciones en terreno para Árbol 1 – <i>E. nitens</i> , <i>E. globulus</i>	117
Tabla 28: Mediciones en terreno para Árbol 2 – <i>E. nitens</i> , <i>E. globulus</i>	118
Tabla 29: Mediciones en terreno para Árbol 3 – <i>E. nitens</i> , <i>E. globulus</i>	119
Tabla 30: Valores de concentración de equilibrio a distintos tamaños de partícula	120

Índice de Figuras

Figura 1: Inventario de plantaciones forestales por especie	6
Figura 2: Especies de eucaliptus	7
Figura 3: Estructuras de los compuestos fenólicos reportados en la corteza de <i>E. globulus</i>	16
Figura 4: Curva de extracción batch típica de compuestos provenientes de plantas	22
Figura 5: Halo de inhibición en discos de MGM agar con voriconazol para <i>A. terreus</i>	34
Figura 6: Representación de los métodos de inoculación de sustrato	38
Figura 7: Curva de cinética de extracción a diferentes tamaños de partícula para <i>E. nitens</i>	58
Figura 8: Curva de cinética de extracción a diferentes tamaños de partícula para <i>E. globulus</i>	59
Figura 9: Superficies de respuesta para rendimiento (%) obtenido en la especie <i>E. nitens</i>	61
Figura 10: Superficies de respuesta para el rendimiento (%) obtenido en la especie <i>E. globulus</i>	62
Figura 11: Superficies de respuesta para fenoles totales en la especie <i>E. nitens</i>	63
Figura 12: Superficies de respuesta para fenoles totales en la especie <i>E. globulus</i>	64
Figura 13: Función de deseabilidad para el diseño experimental de la especie <i>E. nitens</i>	67
Figura 14: Función de deseabilidad para el diseño experimental de la especie <i>E. globulus</i>	67
Figura 15: Relación entre los fenoles totales y la capacidad antioxidante DPPH en <i>E. nitens</i>	69
Figura 16: Relación entre los fenoles totales y la capacidad antioxidante DPPH en <i>E. globulus</i>	70
Figura 17: Curva de extracción a distintas temperaturas para <i>E. nitens</i>	72
Figura 18: Curva de extracción a distintas temperaturas para <i>E. globulus</i>	73
Figura 19: Cinética de extracción ajustada por el modelo de Fick para <i>E. nitens</i>	76
Figura 20: Cinética de extracción ajustada al modelo de Fick para <i>E. globulus</i>	76

Figura 21: Cinética de extracción ajustada al modelo de Fick con balance de solvente para <i>E. nitens</i>	79
Figura 22: Cinética de extracción ajustada al modelo de Fick con balance de solvente para <i>E. globulus</i>	80
Figura 23: Cinética de extracción ajustada al modelo de Fick de dos fases para <i>E. nitens</i>	83
Figura 24: Cinética de extracción ajustada al modelo de Fick de dos fases para <i>E. globulus</i>	84
Figura 25: Ajuste del modelo de ley de velocidad para la cinética de extracción en <i>E. nitens</i>	88
Figura 26: Ajuste del modelo de ley de velocidad para la cinética de extracción en <i>E. globulus</i>	88
Figura 27: Pérdida de pesos de las muestras después de la exposición del hongo para 30 y 60 días.	104
Figura 28: Esquema explicativo de corte.....	116
Figura 29: Curva de calibración para absorbancia medida en fenoles totales	121
Figura 30: Curva de calibración para determinación de capacidad antioxidante (DPPH)	122

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1: Balance diferencial de masa a una partícula sólida.....	23
Ecuación 2: Solución analítica del balance diferencial de masa a la partícula sólida	24
Ecuación 3: Solución truncada del balance de masa de la partícula esférica	24
Ecuación 4: Balance de masa de la partícula sólida en coordenadas esféricas.....	25
Ecuación 5: Balance de masa del solvente.....	26
Ecuación 6: Solución extendida para las dos fases de extracción por el modelo de Fick	26
Ecuación 7: Modelo de ley de velocidad para orden 2	27
Ecuación 8: Solución de la ecuación de la ley de velocidad de orden 2	27
Ecuación 9: Cálculo de la retención del conversante absorbido por el bloque.....	35
Ecuación 10: Cálculo de pérdida de masa del bloque de madera atacado por el hongo.	37
Ecuación 11: Contenido de agua porcentual en base seca	40
Ecuación 12: Distribución del tamaño de partículas.....	41
Ecuación 13: Rendimiento de extracción en base seca.....	43
Ecuación 14: Polinomio de segundo orden para ajuste del diseño experimental	45
Ecuación 15: Función de deseabilidad definida para cada respuesta del diseño experimental.....	46
Ecuación 16: Desviación porcentual absoluta promedio	48
Ecuación 17: Absorbancia de la muestra para medición de FT.....	49
Ecuación 18: Relación de la curva de calibración para la obtención de la concentración de FT	49
Ecuación 19: Relación de la capacidad antioxidante con la absorbancia de la muestra.	50

Nomenclatura y abreviaciones

Símbolo	Definición	Unidades
C_l	Concentración de soluto en el líquido	kg/m ³
$C_{l,\infty}, C_{eq}$	Concentración de soluto en el líquido en el equilibrio	kg/m ³
C_s	Concentración de soluto en el sólido	kg/m ³
\overline{C}_s	Concentración promedio de soluto en el sólido	kg/m ³
$C_{s,0}$	Concentración de soluto inicial en el sólido	kg/m ³
D_{eff}	Coeficiente de difusión efectivo	m ² /min
d	Tamaño de partícula	mm
E	Rendimiento de extracción de la corteza en base seca	g extracto/g corteza seca
FT	Fenoles totales	mg GAE/g corteza seca
f	Parámetro que diferencia entre la etapa de lavado y la difusiva	adim
f_1, f_2	Fracciones de soluto extraído en la fase de lavado y difusión	adim
GAE	Equivalentes de ácido gálico	mg GAE/g corteza seca
H	Altura comercial del árbol	m

Hu	Fracción de humedad en la corteza	g agua/g corteza seca
IC ₅₀	Concentración media inhibitoria	μg/mL
k	Constante cinética de extracción	m ³ /min kg
m _e	Masa de extracto obtenida	g extracto
m _f	Masa final de la corteza luego del proceso de secado a 105°C	g corteza seca
m _{i,h}	Masa de corteza húmeda alimentada al extractor	g corteza húmeda
m _{i,s}	Masa de corteza seca alimentada al extractor	g corteza seca
n	Orden de la ley de velocidad	adim
p	Significancia estadística	%
P _i	Masa retenida en el tamiz “i”	g
r	Variable de la coordenada radial	m
R	Radio de una partícula esférica	m
R _e	Retención de la madera	kg/m ³
t	Variable tiempo	s
T _i	Fracción retenida en el tamiz “i”	adim

T ₁	Peso inicial del bloque después del tratamiento impregnativo	g
T ₂	Peso inicial del bloque antes del tratamiento impregnativo	g
T ₃	Peso de bloque+preservante remanente luego del acondicionamiento y antes de la exposición fúngica	g
T ₄	Peso del bloque después del test antifúngico y después del acondicionamiento final	g
V	Volumen del bloque	cm ³
V _l	Volumen del líquido	m ³
V _s	Volumen del sólido	m ³
W ₁	Pérdida de masa porcentual	%

1 Introducción

Las especies de eucaliptus están jugando un rol cada vez más importante en la producción de madera y pulpa en el mundo y son la mayor fuente de fibra en Europa, Sudáfrica, Japón y Sudamérica. Según la FAO (2017) (Food and Agriculture Organization) en el año 2000, las especies de eucaliptus cubrieron 17,9 millones ha en el mundo. Específicamente en Chile, el instituto forestal (INFOR, 2016) reportó que aproximadamente el 32% de los árboles plantados en Chile pertenecían a eucaliptus, con 774.000 ha, siendo la especie *Pinus radiata* (*P. radiata*) la que posee la mayor tasa de plantación con 1.400.259 ha (58,4%). Las actividades industriales desarrolladas en la región del Biobío utilizan la mayoría de los árboles cosechados en las plantaciones forestales del país con un 74% (8.933.000 m³ ssc) de las especies de eucaliptus y un 52% de la especie *P. radiata*.

Estas industrias generan grandes cantidades de residuos provenientes de la biomasa, particularmente corteza, la cual en la mayoría de los casos es quemada para producir energía. Sin embargo, este proceso posee una baja eficiencia debido al alto contenido de resinas que este residuo posee, siendo dañino para los equipos utilizados para su combustión (Back, 2000). Es por esta razón que la explotación de subproductos derivados de la industria forestal es uno de los ejemplos más exitosos de la biorefinería (H.-J. Huang, Ramaswamy, Tschirner, & Ramarao, 2008; Kamm, Kamm, Schmidt, Hirth, & Schulze, 2008), este concepto puede dar lugar a la generación de productos valiosos a partir de la corteza, por ejemplo la explotación de compuestos de bajo peso molecular con propiedades antioxidantes y anticancerígenas como el β -sitosterol, lignanos y ácidos triterpénicos.

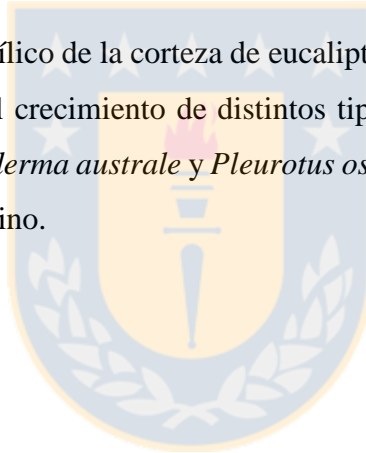
La explotación de algunos de estos subproductos, es una estrategia que ya está siendo implementada en algunas industrias extranjeras de celulosa (Fernandes & Cabral, 2007). Miranda, Gominho, Mirra, and Pereira (2013) encontraron que la corteza de *E. globulus* poseía aproximadamente un 62,6 % de holocelulosa, 34,1 % de lignina y 6,5% de

extraíbles. Wegener (1984) reportó que la corteza poseía grandes cantidades de extraíbles incluyendo compuestos lipofílicos y polifenólicos. Por una parte, algunos de estos compuestos lipofílicos son beneficiosos para la salud y objetos de demanda por parte de las industrias de la alimentación, cosmética y farmacológicas, gracias a sus propiedades antimicrobianas, antihiper glucémicas, antiinflamatorias y antitumorales, entre otras (Braga, Ayres-Saraiva, Gattass, & Capella, 2007; Horiuchi et al., 2007; Marquez-Martin, De La Puerta, Fernandez-Arche, Ruiz-Gutierrez, & Yaqoob, 2006; Sato et al., 2007). Por otra parte, los compuestos polifenólicos pueden tener potenciales aplicaciones; por ejemplo, como sustituto de fenoles en la formulación de adhesivos para derivados de la madera, como sustituto del cromo en el curtido de cuero y como fuente de compuestos antioxidantes (Vázquez, González-Alvarez, Santos, Freire, & Antorrena, 2009).

En este estudio, se determinó la cinética del proceso de extracción hidrofílica de componentes fenólicos desde la corteza de *E. globulus* y *E. nitens* y se caracterizó su contenido fenólico y capacidad antioxidante. A su vez, el extracto hidrofílico fue validado como posible antifúngico para la inhibición del crecimiento de hongos en la madera de pino.

2 Hipótesis

- Es posible modelar la cinética de la extracción hidrofílica de corteza de *E. nitens* y *E. globulus* a través de modelos matemáticos teóricos, mediante balances de materia en un sistema batch. Los parámetros cinéticos obtenidos permitirán comparar la tasa de extracción de ambas variedades y con extraíbles de cortezas de otras especies.
- El extracto hidrofílico de la corteza de eucaliptus ejercerá una inhibición parcial o completa sobre el crecimiento de distintos tipos de especies fúngicas: *Trametes versicolor*, *Ganoderma australe* y *Pleurotus ostreatus*, que podrían estar presentes en la madera de pino.



3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Obtener extractos ricos en componentes fenólicos provenientes de la corteza de *E. nitens* y *E. globulus*, formulando la cinética de extracción y evaluando la resistencia que le confieren estos extractos a la degradación de madera de pino impregnada atacada por hongos de pudrición.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de las variables: temperatura, razón sólido/líquido y concentración de metanol sobre la extracción de la corteza de *E. nitens* y *E. globulus*, manteniendo un tiempo de extracción constante.
- Modelar la cinética de la extracción hidrofílica de la corteza de *E. nitens* y *E. globulus* a diferentes temperaturas basándose en fundamentos teóricos de difusión. Comparar los parámetros cinéticos para ambas variedades de árboles.
- Comparar la protección a la degradación de la madera de pino impregnada en extracto hidrofílico, por medio de hongos de pudrición de lento, mediano y rápido crecimiento, en busca de validar su uso.

4 Antecedentes generales

En esta sección se presentan antecedentes bibliográficos relevantes a este trabajo. En primer lugar, se describe la situación del eucaliptus en Chile y las especies de importancia a nivel industrial. En segunda instancia, se indaga sobre las características y composición de la corteza, sus extraíbles, y las potencialidades de uso de los extractos que se pueden obtener de ellos. Luego, se presentan modelos cinéticos utilizados en la extracción de componentes de distintos materiales celulósicos y constantes cinéticas obtenidas de la literatura. Por último, se presenta información acerca de los análisis realizados a los extractos post-extracción.

4.1 Situación nacional del eucaliptus

Chile posee en total 2.396.562 hectáreas de plantaciones forestales (INFOR, 2016). En cuanto a eucaliptus, son de importancia a nivel industrial las especies: *E. globulus*, *E. nitens* y *E. regnans*, de las cuales las dos primeras ocupan el 33,1 % (ver figura 1) del inventario de plantaciones forestales según INFOR (2016). La región del Biobío posee 923.506 hectáreas de plantaciones forestales, de las cuales, el 34,6 % de ellas (319.533 hectáreas) corresponden a plantaciones de eucaliptus. Esta región posee la mayor cantidad de eucaliptus plantados a lo largo de Chile con un 40% de las plantaciones forestales de eucaliptus en el país .

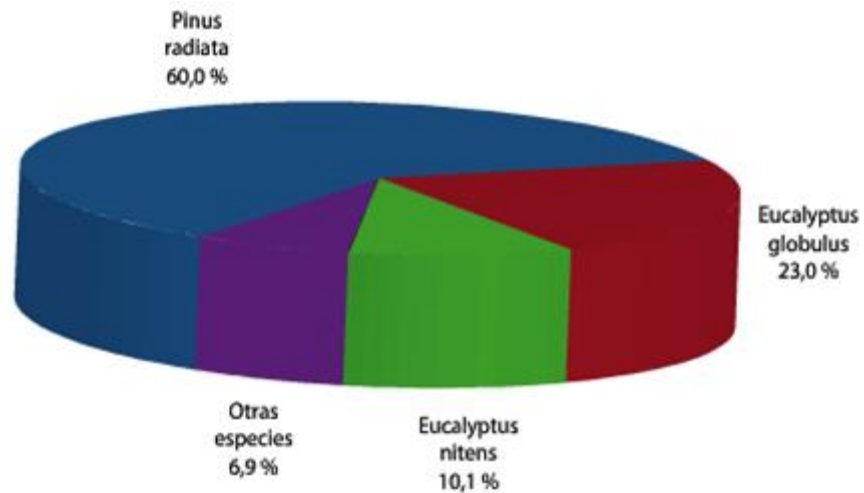


Figura 1: Inventario de plantaciones forestales por especie

Fuente: INFOR. (2016) extraída de
http://wef.infor.cl/sector_forestal/sectorforestal.php

La especie *E. globulus* posee fibra corta lo que la hace muy solicitada en la industria de la celulosa. Estos árboles pueden alcanzar 60 m de altura y su corteza es de color blanquecina, la cual se desprende fácilmente en tiras en los ejemplares adultos. Prefiere los climas húmedos y sin heladas. Sus limitaciones térmicas le obligan a una distribución más bien costera y en Chile se encuentra principalmente en la zona centro-sur de la Región del Biobío.

La especie *E. nitens* ha cobrado gran importancia en Chile debido a su excelente desarrollo, ya que es la especie de más rápido crecimiento en el país, además de presentar una gran resistencia al frío. Hoy en día ocupa el segundo lugar en importancia industrial después del *E. globulus*. Se encuentra en una distribución muy discontinua, por lo que posee una gran variabilidad genética. Se desarrolla en climas templados en altura, con temperaturas no muy altas en verano e inviernos fríos, con muchas heladas y presencia de nieve, por lo que en Chile es plantada en el Valle Central y la Precordillera Andina.

La especie *E. regnans* crece entre 70 y 90 m con un tronco recto grisáceo, de corteza lisa excepto en los primeros 5 a 15 m, donde presenta rugosidad. Se encuentra en áreas montañosas frescas, superando los 1000 m sobre el nivel del mar, en suelo profundo con alta pluviosidad (Pacific-Forest, 2012).

Las distintas especies pueden ser observadas en las imágenes presentadas en la figura 2.

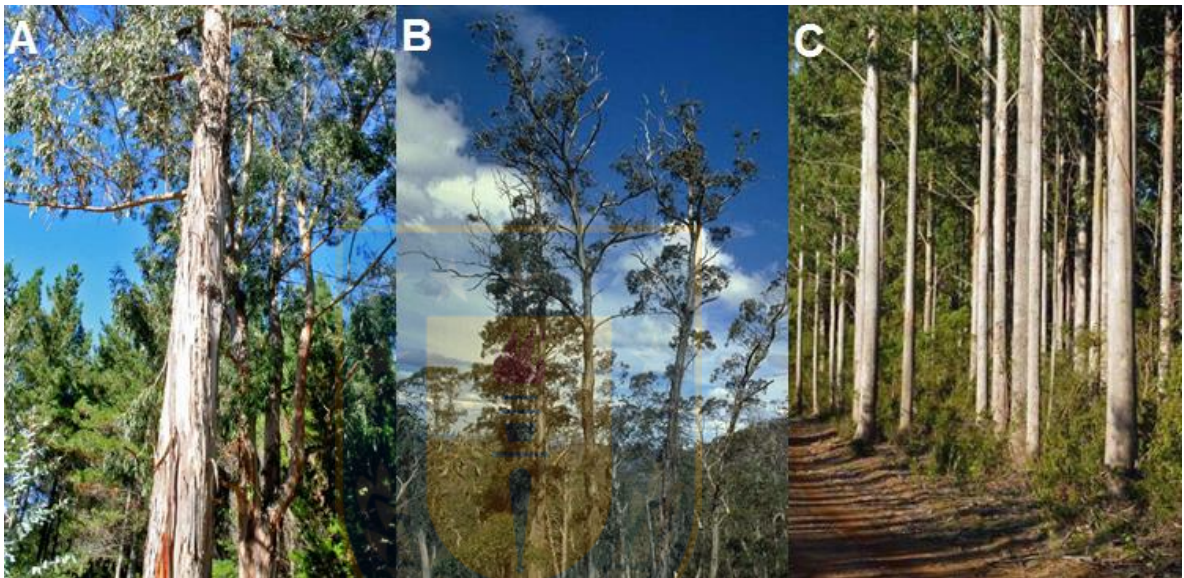


Figura 2: Especies de eucaliptus: *E. globulus* (A), *E. nitens* (B), *E. regnans* (C)

Fuente: Pacific Forest. (2012) extraída de <http://woodexportchile.com/es/especies-madera>

4.2 Corteza

La corteza es la capa externa del “cambium” que rodea el tallo, ramas y raíces. Posee alrededor de 10-15% del peso total del árbol, dependiendo de la especie y las condiciones de crecimiento. A pesar de los extensos estudios dirigidos, por un lado, a explorar nuevas fibras naturales para el desarrollo de materiales y aplicaciones (Muñoz, Ballerini, & Gacitúa, 2013) y por otro lado, al descubrimiento de compuestos químicos que se puedan extraer; sólo una pequeña fracción de la corteza producida en el mundo se utiliza hoy en

día como materia prima para la producción de productos de alto valor agregado (Río, 2013).

Se ha estudiado una gran variedad de especies de eucaliptus y sus compuestos extraíbles, como por ejemplo los ácidos triterpénicos, los cuales son utilizados en la industria farmacológica al poseer potenciales efectos bioactivos (Domingues, Sousa, Freire, Silvestre, & Neto, 2010). A su vez, los compuestos polifenólicos también son estudiados debido a sus propiedades antioxidantes, antitumorales y antimicrobianas, antifúngicas, entre otras (Inês Mota et al., 2012), motivo por el cual en este trabajo se estudió su capacidad antifúngica.

4.2.1 Composición de la corteza

La composición de la corteza determina las propiedades que son importantes en vista de su utilización. La corteza posee un comportamiento distinto en cuanto a hinchazón, es menos anisotrópica, posee coeficientes de transferencia de calor ligeramente más bajos y tiene propiedades mecánicas mucho más débiles que la madera (Feldman, 1985). La composición varía entre las diferentes especies de árboles y depende de los elementos morfológicos involucrados. Muchos de los componentes que posee la madera también están presentes en la corteza, aunque en proporciones distintas. Típicamente la corteza posee mayor contenido de constituyentes solubles (extractivos) tales como pectina, compuestos fenólicos y suberina. El contenido de minerales en la corteza también es mucho mayor que en la madera. Por un lado, la fracción de fibra es químicamente similar a la de las fibras de madera y consiste de celulosa, hemicelulosa y ligninas. Por otro lado, las paredes de las células de corcho están impregnadas con suberina, mientras que los polifenoles se concentran en la fracción fina (Sjöström, 1993). En la tabla 1 se muestra la composición de *E. globulus* reportada por Inês Mota et al. (2012) y Miranda et al. (2013). En cuanto a las diferencias de composición entre árboles de la misma especie, cada árbol posee un fenotipo único, por lo que la variable genética y la variable ambiente afectan la

variabilidad de la composición de la corteza de eucaliptus. Otro factor de importancia es la edad del árbol, la cual varía la composición química de la corteza (Rodríguez S, 1994). Se reporta que desde una cierta edad del árbol, los componentes de la corteza de *E. nitens* no varían (Geldres, Gerding, & Schlatter, 2006). El origen geográfico es un factor clave en la composición de la corteza debido al clima y tipo de suelo en el cual esté plantado (fuente de nutrientes, luz solar, competencia entre la población, entre otros).

Tabla 1: Composición típica de la corteza de *E. globulus*

Composición	Cantidad (% m/m) (Inês Mota et al., 2012)	Cantidad (% m/m) (Miranda et al., 2013)
Extraíbles	5,71	6,5
Lignina	34,1	34,1
Holocelulosa	72	62,6

Fuente: Inês Mota et al. (2012); Miranda et al. (2013)

4.2.2 Molienda de la corteza

Miranda et al. (2013) demostraron que el fraccionamiento de la muestra es usado para seleccionar un enriquecimiento selectivo de componentes específicos. La fracción fina de la corteza es rica en materiales solubles ($d < 2$ mm aproximadamente). Con el aumento del tamaño de partícula, el contenido de extraíbles comienza a decrecer y el contenido de

holocelulosa a aumentar, siendo las fracciones gruesas apropiadas para usos que involucren carbohidratos.

El tamaño de partícula de la corteza de *E. globulus* es un factor que influye en el rendimiento, ya sea, usando un solvente polar o apolar. En la tabla 2 se muestran las diferencias en rendimiento de extracción reportadas por Miranda et al. (2013), usando diclorometano como solvente.

Tabla 2: Rendimiento de extracción lipofílica en Soxhlet para corteza de *E. globulus* para diferentes tamaños de partícula

Tamaño de partícula (mm)	Rendimiento de extracción (%)
< 0,180	11,0
0,250 – 0,450	6,2
> 2	5,5

Fuente: Miranda et al. (2013)

4.2.3 Características de los extraíbles y el proceso de extracción de la corteza

Las condiciones de operación de la extracción: tiempo de extracción, polaridad del solvente, concentración del solvente, temperatura y razón sólido/líquido, son factores determinantes en el rendimiento de extracción para la corteza de eucalipto (Inês Mota et al., 2012; Vázquez et al., 2009).

Dos tipos de extractos han sido estudiados ampliamente en la literatura, el extracto lipofílico y el extracto hidrofílico. En este trabajo se estudió la extracción hidrofílica, obteniendo extractos ricos en componentes fenólicos.

Para la corteza de las especies: *E. globulus*, *E. maidenii*, *E. grandis* y *E. urograndis*, exceptuando *E. nitens* (del cual no existe información de extracción hidrofílica), se utiliza un agitador, en la mayoría de los casos, de tipo orbital operado por 24 h, posteriormente filtrando la suspensión obtenida, removiendo el solvente por evaporación a baja presión y liofilizando los extractos. Los solventes más utilizados son: metanol, etanol, agua y razones alcohol/agua en distintas proporciones volumétricas, siendo, la más usada, metanol/agua al 50/50 v/v, la cual, extrae una mayor cantidad de componentes fenólicos en comparación con los demás solventes (S. A. O. Santos, Freire, Domingues, Silvestre, & Neto, 2011). Se reporta una razón sólido/líquido de 1/15 w/w para *E. globulus* (Vázquez et al., 2008; Vázquez et al., 2009). Santos et al. (2011) utilizaron una razón sólido/líquido de 1/100 m/v, operando el agitador a temperatura ambiente.

En cuanto a la extracción lipofílica, la corteza de eucaliptus, en la mayoría de las especies estudiadas en la literatura, es más rica en componentes solubles en la capa externa que en la interna (Domingues et al., 2011), como se observa en la tabla 3. A su vez, la corteza externa de las especies plantadas en zonas templadas y mediterráneas (*E. globulus* y *E. nitens*) es más rica en extractivos lipofílicos que las especies de zonas sub-tropical y tropical (*E. grandis* y *E. urograndis*) (Domingues et al., 2011).

Tabla 3: Rendimientos de extracción lipofílica en Soxhlet para corteza de distintas especies de eucalipto

Especie	Rendimiento de extracción (%)	
	Corteza interna	Corteza externa
<i>E. nitens</i>	0,3	3,3
<i>E. globulus</i>	0,5	3,9
<i>E. urograndis</i>	0,3	1,7
<i>E. grandis</i>	0,5	1,3
<i>E. maidenii</i>	2,6	6,1

Fuente: Domingues et al. (2011)

El origen de la corteza también es un factor significativo. Entre la proveniente del tronco, de la capa superficial del tronco, capa superficial de las ramas y pelaje, se obtienen diferentes rendimientos para la extracción lipofílica de corteza de *E. globulus*, obteniendo rendimientos más altos en las capas superficiales de la corteza, como se muestra en los datos presentados por Domingues et al. (2010) en la tabla 4. A pesar de que no se ha estudiado el efecto de la especie, la capa interna/externa de la corteza y el origen de la corteza en la extracción hidrofílica, este comportamiento debiese ser similar al de la extracción lipofílica, poseyendo rendimientos de extracción distintos.

Tabla 4: Rendimientos de extracción lipofílica en Soxhlet para corteza de *E. globulus* de diferentes zonas del árbol

Muestra	Rendimiento de extracción (%)
Corteza total del tronco	0,9
Pelaje del tronco	2,1
Capa superficial de la corteza del tronco	5,2
Capa superficial de la corteza de las ramas	18,1

Fuente: Domingues et al. (2010)

Como se dijo anteriormente, no existe información acerca de extracción hidrofílica en la literatura para *E. nitens*. Resultados de rendimientos de extracción hidrofílica para otras especies de eucaliptus fueron reportados por S. A. O. Santos et al. (2012) y presentados en la tabla 5.

Tabla 5: Rendimientos de extracción hidrofílica para corteza de distintas especies de eucaliptus

Especie	Rendimiento de extracción (%)
<i>E. globulus</i>	9,28
<i>E. grandis</i>	10,54
<i>E. urograndis</i>	15,18
<i>E. maidenii</i>	13,23

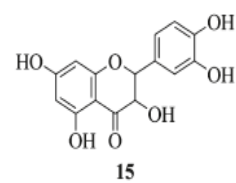
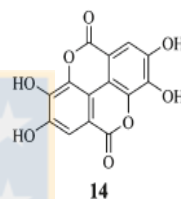
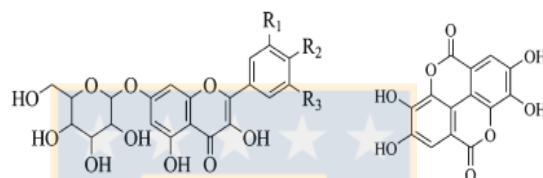
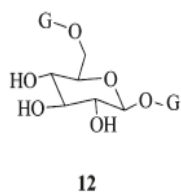
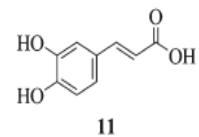
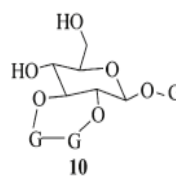
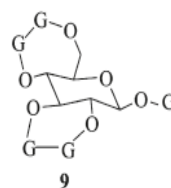
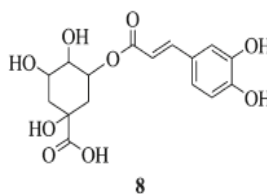
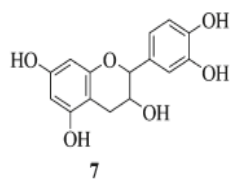
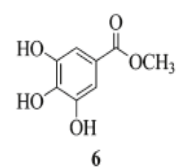
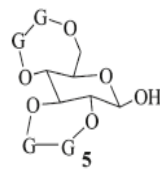
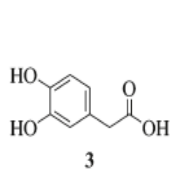
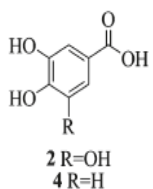
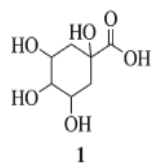
Fuente: S. A. O. Santos et al. (2012)

4.2.4 Composición química del extracto hidrofílico de la corteza

La fracción hidrofílica de la corteza de *E. globulus* consiste en grandes cantidades de constituyentes fenólicos (S. A. O. Santos et al., 2011) y cantidades menores de compuestos solubles de carbohidratos, proteínas, vitaminas, etc, (Sjöström, 1993).

El análisis HPLC-UV ha sido utilizado ampliamente en la literatura para la identificación y cuantificación de los componentes de la corteza de eucaliptus para distintas especies (S. A. O. Santos et al., 2011).

En la literatura, a diferencia de los extractos lipofílicos, no existe información acerca de los extractos hidrofílicos para *E. nitens*. Santos et al. (2011) reportaron las estructuras de compuestos fenólicos y su composición en el extracto hidrofílico de *E. globulus* para corteza extraída con metanol/agua 50/50 v/v, presentados en la figura 3 y tabla 6, respectivamente. En el estudio de estos autores, los componentes de mayor concentración para *E. globulus* fueron: digaloilglucosa (17,77 mg/g extracto); catequina (14,23 mg/g extracto) y ácido clorogénico (13,36 mg/g extracto).



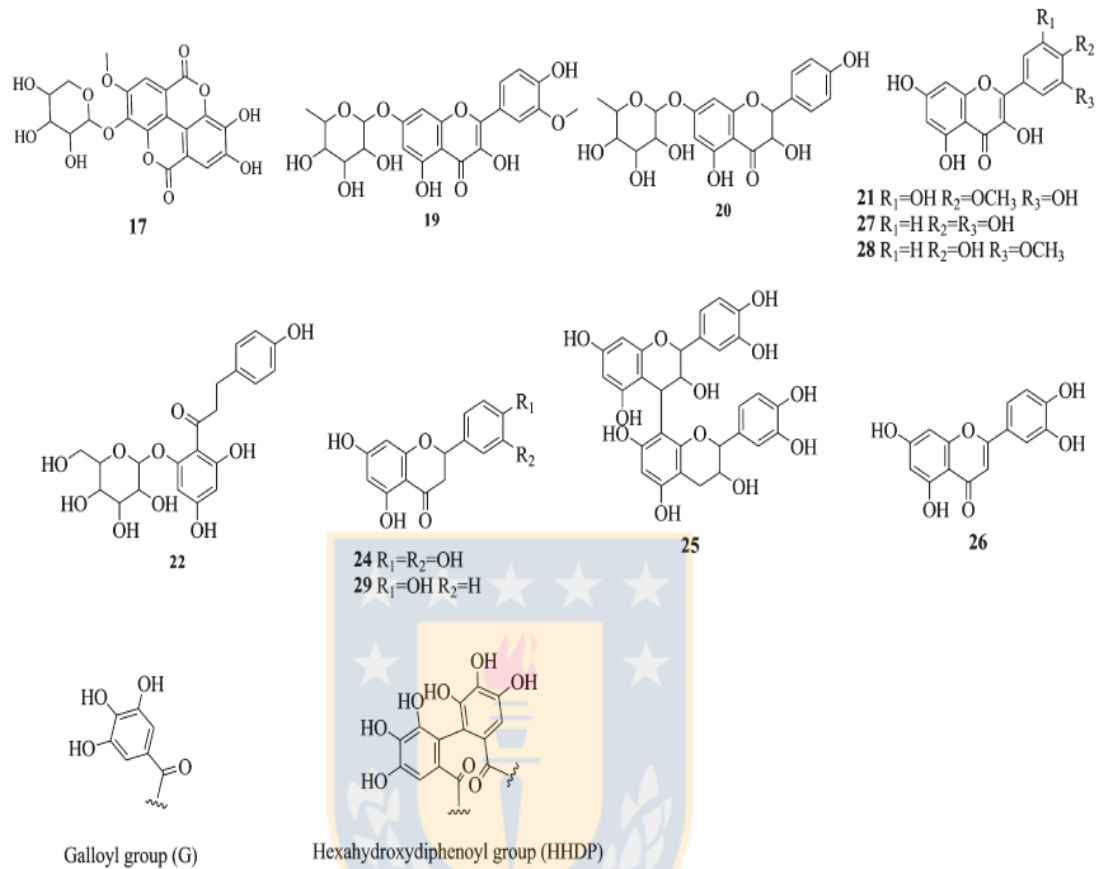


Figura 3: Estructuras de los compuestos fenólicos reportados en la corteza de *E. globulus*

Fuente: S. A. O. Santos et al. (2011)

Tabla 6: Compuestos fenólicos reportados en el extracto hidrofílico de la corteza de *E. globulus* para metanol/agua 50/50 v/v

N°	Compuestos detectados	Composición (mg/g de extracto)	Composición (mg/kg de corteza seca)
1	Ácido quínico ^a	1,50	139,51
2	Ácido gálico ^a	8,83	819,48
3	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético ^a	-	-
4	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico (Ácido protocatequínico) ^b	2,09	194,14
5	bis-hexahidroxidifenoil(HHDP)- glucose ^a	1,02	94,30
6	Galato de metilo ^a	1,50	139,25
7	Catequina ^c	14,23	1320,59
8	Ácido clorogénico ^d	13,36	1239,46
9	galoil- bis-HHDP-glucose ^a	4,85	450,37
10	galoil-HHDP-glucose ^a	6,86	637,04
11	Ácido cafeico ^e	-	.
12	Digaloilglucose ^a	17,77	1648,91
13	isoramnetina—hexosídeo ^f	1,08	99,89
14	Ácido elágico ^g	5,08	471,04

15	Taxifolina ^h	7,78	721,58
16	quercetina-hexosídeo ^f	0,63	58,77
17	ácido metil-eláigicopentosídeo ^g	Tr	Tr
18	miricetina-ramnosídeo ^f	0,14	13,31
19	isoramnetina-ramnosídeo ^f	10,00	927,64
20	Aromadetrina-ramnosídeo ^h	0,79	73,52
21	Mearnsetina ^f	0,38	35,30
22	Floridzina ^h	0,75	69,89
23	mearnsetina-hexosídeo ^f	1,30	121,12
24	Eriodictiol ^h	7,91 ⁱ	733,86 ^j
25	proantocianidina B ^h	-	-
26	Luteolina ^f	3,66 ^j	340,00 ^j
27	Quercetina ^f	-	-
28	Isoramnetina ^f	4,65	431,63
29	Naringenina ^h	0,76	70,92

Curva de calibración usada: ^a ácido gálico; ^b ácido protocatequínico; ^c catequina; ^d ácido clorogénico; ^e ácido cafeíco; ^f quercetina; ^g ácido eláigico; ^h naringenina; ⁱ Tr, trazas; ^j Suma del contenido fenólico por superposición parcial.

Fuente: S. A. O. Santos et al. (2011)

4.2.5 Potencialidades del extracto hidrofílico de eucaliptus

Como se dijo en la sección 4.2.1, la corteza del árbol, particular compuesto residual obtenido a partir de los procesos de generación de pulpa, ha sido aprovechada en la actualidad como combustible para la generación de energía, este proceso no resulta ser eficiente, debido a la gran cantidad de compuestos resiníferos que esta contiene.

Martínez (2014) indicó que el contenido de extraíbles en la corteza es más alto que en la madera, por lo que un potencial uso para la generación de nuevos productos es de alto interés. Dos tipos de extractos han sido principalmente estudiados en la literatura: lipofílicos e hidrofílicos. Siendo estos últimos los estudiados en este trabajo, los cuales, fueron ricos en componentes fenólicos, y a su vez, poseyeron la capacidad de inhibir especies fúngicas como se presentará en la sección 6.4.

De acuerdo a la especie a partir de la cual se obtiene la corteza, se ha conseguido la extracción de diversos compuestos: ácido elálgico, derivados metílicos y glicosílicos de éste, ácido gálico, ácido cafeico, catequina, quercetina, taxifolina y epicatequina forman una parte de la gran variedad de productos que pueden ser obtenidos a partir un proceso extractivo de carácter hidrofílico (S. A. O. Santos et al., 2011).

El interés en este tipo de compuestos se basa en diversas propiedades bioactivas que han demostrado poseer: capacidades antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas y antibacterianas, entre otras (Hou, Liu, Yang, Lin, & Sun, 2000), potencial que se ha atribuido a las propiedades antioxidantes que estos compuestos poseen (Vázquez et al., 2008).

Yi et al. (2016) probaron los efectos de extracto de pino, cuya composición principal constaba de catequina y taxifolina, sobre células cancerígenas de colon humano, comprobando el decrecimiento en la viabilidad celular y por tanto, su efecto antitumoral. Esto es reafirmado con estudios que han reportado la potente actividad antioxidante causada por la taxifolina (Bakalivanova & Kaloyanov, 2012). La taxifolina posee propiedades anticancerígenas, alterando la expresión de varios genes, incluyendo las que

codifican enzimas de desintoxicación, proteínas, reguladoras de ciclo celular, factores de crecimiento y proteínas de reparación del ADN. Se informó que la taxifolina regula el alza de las enzimas de fase II de desintoxicación y regula a la baja de la fase I de desintoxicación enzimática (Lee, Cha, Selenge, Solongo, & Nho, 2007). También ésta inhibe mutaciones inducidas por la bencidina (cáncer de vejiga humana) (Makena, Pierce, Chung, & Sinclair, 2009). Existe una fuerte correlación ($r^2 = 0,93$) entre los efectivos antiproliferativos de la taxifolina en células de cáncer de mamas (Rogovskii et al., 2010). También, este compuesto inhibe la melanogénesis celular tan eficazmente como la arbutina (agente utilizado en cosméticos), siendo la arbutina y quercetina muy mutagénicos, cancerígenos y tóxicos (An, Kim, Kim, & Boo, 2008).

El ácido cafeico ha demostrado poseer una actividad anticancerígena importante contra el crecimiento de diferentes líneas celulares cancerígenas pulmonares. Además, posee un efecto citotóxico importante sobre células cancerígenas cervicales humanas (Li et al., 2012).

Se ha reportado, además, el gran poder antioxidante de la epicatequina, la cual ha demostrado generar mejoras en la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina II (ECA), que regula procesos vaso constrictivos. Compuestos galoilados también han demostrado provocar efectos inhibidores de la ECA, sin embargo, a altas concentraciones éstas provocan un efecto pro-oxidante (Godoy, Roedel, & Fernández, 2012).

4.3 Variables que afectan el rendimiento de extracción

Son muchas las variables que influyen en el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos y que se deben considerar al momento de optimizar los procesos de extracción. Entre ellas, las más estudiadas en la extracción de corteza son: tiempo de extracción, solvente a utilizar, concentración de solvente (razón volumétrica alcohol/agua), temperatura, razón sólido/líquido, método de extracción, tamaño de partícula, presión, presencia de luz, entre otras. En este trabajo se estudió el efecto del tamaño de partícula

en el ensayo preliminar de cinética de extracción (sección 6.1.3), los factores temperatura, razón sólido/líquido y concentración de metanol/agua en el diseño de experimentos (sección 6.2), y por último, la temperatura en la cinética de extracción (sección 6.3).

Brusotti, Ngueyem, Biesuz, and Caccialanza (2010) reportaron que el tamaño de partícula posee una influencia significativa sobre el rendimiento de extracción, poseyendo las partículas más pequeñas mayores rendimientos de extracción que las de mayor tamaño. A pesar de esto, se ha reportado que la trituración fina no es eficaz, debido a la tendencia de la corteza a formar una masa densa que posee una interacción débil con el solvente (Pinelo, Sineiro, & Núñez, 2006). Por lo que se hace interesante variar el tamaño de partícula para concluir el efecto que posee sobre el rendimiento de extracción de la corteza y su contenido fenólico.

Se ha demostrado que la temperatura también afecta al rendimiento final de una extracción, ya que, produce una reducción de la viscosidad del solvente, resultando en una mayor cantidad de componentes solubilizados. Wright (2015) atribuyó que el aumento de temperatura incrementa la difusión de los componentes en la extracción, debilitando las interacciones proteicas-fenólicas y polisacáridas-fenólicas.

El tiempo de extracción y la razón sólido/líquido fueron parámetros importantes en el proceso de extracción y que influyeron sobre su rendimiento. A su vez, son necesarios para modelar la cinética y el equilibrio del proceso de extracción de un sistema batch.

Es de conocimiento que para un sistema batch, el solvente metanol/agua en una razón de 50:50 v/v es la que obtiene un mayor rendimiento de extracción de compuestos fenólicos de la corteza de eucaliptus (S. A. O. Santos et al., 2011). Por tanto, las variables más significativas y que fueron estudiadas en este trabajo, son: tiempo de extracción, razón sólido/líquido, temperatura y concentración de metanol.

4.4 Modelos matemáticos de la cinética de extracción

Existe en la literatura un gran número de aproximaciones empíricas encontrados para la extracción sólido/líquido, las cuales, son insuficientes para comprender el mecanismo de extracción, debido a que su aplicabilidad está limitada al mismo procedimiento y equipamiento, siendo válidos sólo en los niveles sometidos por el experimentador.

La curva de rendimiento vs tiempo para una extracción sólido/líquido utilizando materiales lignocelulósicos de distintas especies de plantas: madera, corteza, hojas, entre otras, consisten normalmente de dos etapas de extracción, una etapa extractiva rápida, denominada etapa de lavado, y una etapa extractiva lenta, llamada etapa difusiva (Chan, Yusoff, & Ngoh, 2014), ilustradas en la figura 4.

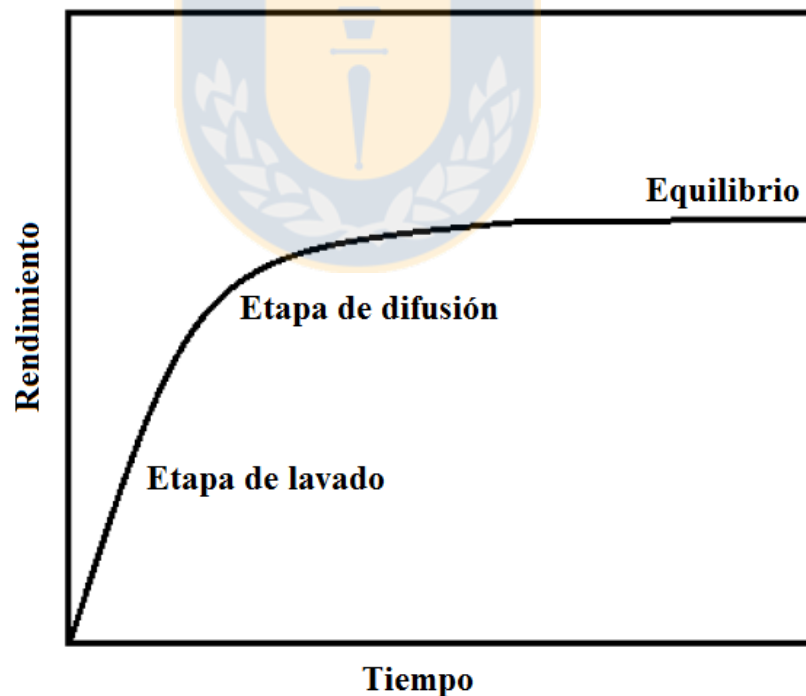


Figura 4: Curva de extracción batch típica de compuestos provenientes de plantas.
Fuente: Chan et al. (2014), modificada al español.

Los modelos que se presentan a continuación corresponden a tres modelos fenomenológicos: el modelo de difusión unidimensional no estacionario (M1), modelo de difusión unidimensional no estacionario con balance de solvente (M2) y el modelo extendido a dos fases de extracción (M3); y adicionalmente se presenta una aproximación empírica basada en una cinética de segundo orden (M4). Estos modelos son los más utilizados en la literatura en cuanto a la extracción de materiales lignocelulósicos (corteza, madera, hojas, etc) y alimentos (piel y semilla de uva, granos de café, frutos de los árboles, entre otros) y fueron estudiados en este trabajo para determinar cuál representa mejor la cinética de la extracción de la corteza de *E. nitens* y *E. globulus*. Cabe destacar que la modelación de la cinética de extracción de corteza de eucalipto no ha sido estudiada en la literatura.

4.4.1 Modelo de difusión unidimensional no estacionario (M1)

El modelo más simple se obtiene aplicando un balance de masa a una partícula sólida, suponiendo que: no existe generación ni consumo de masa, la velocidad de difusión de masa puede ser evaluada a través de la ley de Fick (mediante el uso de un coeficiente de difusión efectivo constante), las partículas sólidas poseen geometría esférica y la transferencia de masa es unidimensional en la dirección radial.

$$\frac{\partial C_s}{\partial t} = D_{eff} \left(\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C_s}{\partial r} \right) \right)$$

Ecuación 1: Balance diferencial de masa a una partícula sólida (Crank, 1975)

Con las siguientes condiciones de contorno e inicial:

$$t=0, C_s=C_{s,0} \forall r$$

$$t>0, C_s=C_{s,i}=0 \quad r=R$$

$$t>0, \frac{\partial C_s}{\partial r} = 0 \quad r=0$$

Donde $C_{s,0}$ es la concentración inicial de soluto en la partícula, $C_{s,i}$ es la concentración en la interfase de la partícula, D_{eff} es el coeficiente de difusión efectivo y R es el radio de la partícula.

Al suponer que la resistencia a la transferencia de masa externa es despreciable (no hay efectos convectivos), la ecuación 1 puede ser resuelta analíticamente (ver ecuación 2).

$$\frac{C_s - C_{s,0}}{C_{s,i} - C_{s,0}} = 1 + \left[\frac{2R}{\pi r} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n} \sin \frac{\pi n r}{R} \exp \left\{ -\frac{D_{eff} n^2 \pi^2 t}{R^2} \right\} \right]$$

Ecuación 2: Solución analítica del balance diferencial de masa a la partícula sólida (Crank, 1975)

Simplificando la ecuación anterior, al ser sólo el primer término de la serie significativo (número de Fourier de transferencia de masa mayor a 0,2), y además modificando la ecuación para expresarla en términos de la concentración de soluto en el solvente, se obtiene la ecuación 3.

$$\ln \left(\frac{C_{l,\infty} - C_l}{C_{l,\infty}} \right) = -0,498 - \frac{9,87 D_{eff} t}{R^2}$$

Ecuación 3: Solución truncada del balance de masa de la partícula esférica (Crank, 1975)

En la ecuación 3, C_1 es la concentración del soluto en el solvente a tiempo t , $C_{1,\infty}$ es la concentración del soluto en el solvente a dilución infinita, y nuevamente, D_{eff} es el coeficiente de difusión efectivo y R es el radio de la partícula esférica (Crank, 1975; Spiro & Selwood, 1984). El ajuste de los datos experimentales a este modelo y su discusión se presenta en la sección 6.3.1.1.

4.4.2 Modelo de difusión unidimensional no estacionario con balance del solvente (M2)

Las suposiciones para este modelo son las mismas que las del primer modelo (M1). Las partículas sólidas se suponen esféricas con un radio R único, el coeficiente de difusión es constante a través de la extracción y la concentración varía sólo con respecto al radio de la partícula sobre el tiempo. Además, el solvente se asume perfectamente mezclado, lo cual se puede obtener manteniendo una alta agitación en el sistema batch (coeficiente de transferencia de masa externo tiende a infinito).

El balance para la partícula sólida es presentado en la siguiente ecuación para coordenadas esféricas:

$$\frac{\partial C_s}{\partial t} = D_{eff} \left(\frac{\partial^2 C_s}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_s}{\partial r} \right)$$

Ecuación 4: Balance de masa de la partícula sólida en coordenadas esféricas

El balance de masa para el solvente está dado por la ecuación 5.

$$\frac{\partial C_l}{\partial t} = -\frac{V_s}{V_l} \frac{d\bar{C}_l}{dt} ; \bar{C}_l = \frac{3}{R^3} \int_0^R C_l(r) r^2 dr$$

Ecuación 5: Balance de masa del solvente (R. Wongkittipong, 2004)

En la ecuación anterior, V_s y V_l son los volúmenes de la fase sólida y la fase líquida respectivamente y \bar{C}_l es la concentración promedio de la fase sólida a tiempo t .

Las condiciones iniciales y de frontera son:

$$t=0, C_s=C_{s,0} \quad \forall r$$

$$t=0, C_l=0$$

$$t>0, C_s(r=R) = C_l$$

$$t>0, dC_s/dr = 0 \text{ en } r=R$$

Las ecuaciones 4 y 5 se deben resolver en forma simultánea a través del método de Crank-Nicholson (Wright, 2015) por medio de un programa computacional, en este caso se utilizó Matlab 2010a. La modelación con este ajuste se presenta en la sección 6.3.1.2.

4.4.3 Modelo extendido para dos fases de extracción (M3)

La solución de la ecuación 1 ha sido expandida en la literatura a dos etapas de extracción: el lavado y la difusión (ver figura 4) (Hojnik, Škerget, & Knez, 2008). Para partículas sólidas esféricas la solución es la presentada en la ecuación 6.

$$\frac{C_{l,\infty} - C_l}{C_{l,\infty}} = \frac{6}{\pi} \left[f_1 \exp\left(\frac{-\pi^2 D_{eff,1} t}{R^2}\right) + f_2 \exp\left(\frac{-\pi^2 D_{eff,2} t}{R^2}\right) \right]$$

Ecuación 6: Solución extendida para las dos fases de extracción por el modelo de Fick (Hojnik et al., 2008)

Donde $D_{eff,1}$ y $D_{eff,2}$ son los coeficientes de difusión efectivos de las etapas de lavado y difusión, respectivamente. Siendo f_1 y f_2 las fracciones de soluto extraído en la etapa de lavado y difusión. Los datos experimentales fueron modelados a través de la ecuación 6 y se presentan en la la sección 6.3.1.3.

4.4.4 Modelo de ley de velocidad (M4)

La extracción de compuestos obtenidos desde materiales naturales, como corteza y hojas ha sido también modelada de forma exitosa aplicando una cinética de segundo orden a la concentración de solvente (Qu, Pan, & Ma, 2010; Rakotondramasy-Rabesiaka, Havet, Porte, & Fauduet, 2009; Zhou, Wang, Sha, Xu, & Xiao, 2013), como se indica en la ecuación 7, donde k es la constante cinética de extracción.

$$\frac{dC_l}{dt} = k(C_l - C_{l,\infty})^2$$

Ecuación 7: Modelo de ley de velocidad para orden 2

El modelo asume que la extracción procede producto de la difusión de los extractos a través del material y en la solución, y que la concentración de solvente tiende a ser constante y saturado bajo las mismas condiciones. Además, en el solvente se asume un mezclado perfecto y se tiene una concentración uniforme a tiempo “t”.

La solución de la ecuación se obtiene por simple integración, obteniendo la ecuación 8.

$$\frac{t}{c} = \frac{1}{kc_{\infty}^2} + \frac{t}{c_{\infty}}$$

Ecuación 8: Solución de la ecuación de la ley de velocidad de orden 2

Este modelo difiere de los demás, debido a que es adaptado a una ley de velocidad. El parámetro k no posee un significado físico real, por lo que este modelo no debería ser usado para escalamiento del proceso y el estudio de diseño de equipos. El ajuste de los datos experimentales con la ecuación 8 se presenta en la sección 6.3.1.4.

4.4.5 Constantes cinéticas de los modelos

En la literatura no existe abundante información acerca de la modelación de la extracción hidrofílica de la corteza de árboles. Uno de los pocos reportes es el de Wright (2015), el cual efectuó la modelación matemática de la extracción de corteza de *Pinus contorta* en un sistema batch, utilizando los modelos descritos en la sección 4.4. En la tabla 7 se muestran las constantes cinéticas encontradas en la literatura para extracciones de corteza de árboles para los distintos modelos mencionados en las secciones anteriores, los cuales fueron utilizados en este estudio y discutidos en la sección 6.3.1.5.

Wright (2015) también estudió el efecto de la temperatura y la razón líquido/sólido sobre la cinética de extracción en corteza de *Pinus contorta*. Por un lado, al aumentar la temperatura la difusión de los compuestos fenólicos desde la corteza al solvente se produce más rápidamente. A 60°C y 80°C el equilibrio fue encontrado después de 2 h y a 100°C el equilibrio se alcanzó en 1 h. Por otro lado, al aumentar la razón líquido/sólido al igual que con la temperatura, el rendimiento de extracción final y la velocidad de extracción aumentó. Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se esperó que a valores altos de temperatura la curva de extracción poseyera una pendiente mayor, y a su vez, se obtuviera también un coeficiente de difusión mayor, alcanzando el equilibrio en menos tiempo.

Tabla 7: Constantes cinéticas de los modelos matemáticos encontrados en la literatura

Modelo cinético	Corteza extraída	Solvente utilizado	Condiciones de operación batch ^a	Parámetros cinéticos obtenidos	Cita bibliográfica
M1	<i>Pinus contorta</i>	1 % p/p NaOH	T = 60°C R = 8:1 mL/g	$D_{\text{eff}}/R^2 = 5,72 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $c_{\infty} = 35,99 \text{ kg/m}^3$	Wright (2015)
M1	<i>Pinus contorta</i>	1 % p/p NaOH	T = 60°C R = 10:1 mL/g	$D_{\text{eff}}/R^2 = 3,77 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $c_{\infty} = 32,75 \text{ kg/m}^3$	Wright (2015)
M1	<i>Pinus contorta</i>	1 % p/p NaOH	T = 60°C R = 12:1 mL/g	$D_{\text{eff}}/R^2 = 5,93 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $c_{\infty} = 28,13 \text{ kg/m}^3$	Wright (2015)
M2	<i>Pinus contorta</i>	1 % p/p NaOH	T = 60°C R = 8:1 mL/g	$D_{\text{eff}} = 2,13 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ $C_0 = 107,24 \text{ kg/m}^3$	Wright (2015)
M2	<i>Pinus contorta</i>	1 % p/p NaOH	T = 60°C R = 10:1 mL/g	$D_{\text{eff}} = 0,95 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ $C_0 = 117,61 \text{ kg/m}^3$	Wright (2015)
M2	<i>Pinus contorta</i>	1 % p/p NaOH	T = 60°C R = 12:1 mL/g	$D_{\text{eff}} = 1,09 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ $C_0 = 118,70 \text{ kg/m}^3$	Wright (2015)
M2	<i>Quercus frainetto</i>	Agua	T = 20 °C R = 15:1 mL/g	$D_{\text{eff}} = 2,4 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ c_{∞} no reportado	Simeonov, Tsibranska, and Minchev (1999)
M3	<i>Pinus contorta</i>	1 % p/p NaOH	T = 60°C R = 8:1 mL/g	$D_{\text{eff},1}/R^2 = 15,26 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ $D_{\text{eff},2}/R^2 = 3,68 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $f_1 = 1,15; f_2 = 0,35$ $c_{\infty} = 35,99 \text{ kg/m}^3$	Wright (2015)

M3	<i>Pinus contorta</i>	1 % p/p NaOH	T = 60°C R = 10:1 mL/g	$D_{\text{eff},1}/R^2 = 5,44 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ $D_{\text{eff},2}/R^2 = 2,50 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $f_1 = 0,31; f_2 = 0,42$ $c_{\infty} = 32,75 \text{ kg/m}^3$	Wright (2015)
M3	<i>Pinus contorta</i>	1 % p/p NaOH	T = 60°C R = 12:1 mL/g	$D_{\text{eff},1}/R^2 = 3,04 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ $D_{\text{eff},2}/R^2 = 0,79 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $f_1 = 0,55; f_2 = 0,25$ $c_{\infty} = 28,13 \text{ kg/m}^3$	Wright (2015)
M4	<i>Pinus contorta</i>	1 % p/p NaOH	T = 60°C R = 8:1 mL/g	$k = 10,39 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{kg min}$ $c_{\infty} = 36,23 \text{ kg/m}^3$	Wright (2015)
M4	<i>Pinus contorta</i>	1 % p/p NaOH	T = 60°C R = 10:1 mL/g	$k = 7,20 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{kg min}$ $c_{\infty} = 33,07 \text{ kg/m}^3$	Wright (2015)
M4	<i>Pinus contorta</i>	1 % p/p NaOH	T = 60°C R = 12:1 mL/g	$k = 8,34 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{kg min}$ $c_{\infty} = 28,24 \text{ kg/m}^3$	Wright (2015)
M4	<i>Picea abies</i>	Etanol-Agua 70% v/v	T = 45°C R = 10:1 mL/g	$k = 0,0051 \text{ g/mg GAE min}$ $c_{\infty} = 28,24 \text{ mg GAE/g}$	Lazar, Talmaciu, Volf, and Popa (2016)

^a T: Temperatura de operación (°C); R= razón líquido/sólido (mL/g)
Fuente: Simeonov et al. (1999); Wright. (2015); Lazar et al. (2016)

4.5 Análisis realizados a la corteza

4.5.1 Fenoles totales

En la literatura no se dispone de valores de fenoles totales para la especie *E. nitens*, sin embargo, existe información para otras especies de eucaliptus (ver tabla 8). Para su medición se usa el método Folin-Ciocalteu, expresando la cantidad de fenoles totales como equivalentes de ácido gálico (GAE).

Tabla 8: Fenoles totales para distintas especies de eucaliptus, usando metanol/agua 50/50 v/v para la extracción

Especie de eucaliptus	Fenoles totales (g GAE/g extracto)	Fenoles totales (mg GAE/g corteza seca)
<i>E. globulus</i> Vázquez et al. (2008)	0,223	-
<i>E. globulus</i> S. A. O. Santos et al. (2011)	0,413	38,4
<i>E. grandis</i> S. A. O. Santos et al. (2012)	0,385	40,64
<i>E. urograndis</i> S. A. O. Santos et al. (2012)	0,346	56,92
<i>E. maidenii</i> S. A. O. Santos et al. (2012)	0,203	26,97

Fuente: Vázquez et al. (2008); S. A. O. Santos et al. (2011); S. A. O. Santos et al. (2012)

4.5.2 Capacidad antioxidante

Los análisis para determinar la capacidad antioxidante de una muestra pueden dividirse en dos categorías: basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) o basados en la reacción por transferencia de electrones (ET). La mayoría de los ensayos basados en HAT monitorean una reacción cinética competitiva y generalmente están compuestos de un generador de radical libre sintético, una prueba molecular oxidable y un antioxidante. Los ensayos ET involucran una reacción redox, con el oxidante como un indicador del punto final de reacción. Los ensayos basados en HAT y ET fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libres, en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra (D. Huang, Ou, & Prior, 2005).

Uno de los ensayos de ET más usados es el método DPPH y así también, comprende uno de los métodos más comunes para la medición de la capacidad antioxidante (Sharma & Bhat, 2009). Es estable, debido a la deslocalización del electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo que la molécula no se dimeriza y ésta intensifica el color violeta típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Por tanto, cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato, cuya capacidad antioxidante se desea medir, y el cual puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. Este cambio se puede observar a través de un espectrofotómetro. La mayoría de los estudios están basados en un tiempo de reacción de 20-30 minutos (Río, 2013)

El valor de la capacidad antioxidante muchas veces se reporta como un índice IC_{50} (concentración máxima de la media inhibitoria) que corresponde al valor de la concentración a la cual se obtiene la mitad de la capacidad inhibitoria máxima, este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición versus la concentración del extracto (S. A. O. Santos et al., 2012).

Se presenta en la tabla 9 la capacidad antioxidante reportada por S. A. O. Santos et al. (2012) mediante el método de DPPH para extractos hidrofílicos de la corteza de distintas especies de eucaliptus.

Tabla 9: Actividad antioxidante para distintas especies de eucaliptus por el método DPPH

Especie	Capacidad antioxidante DPPH	
	IC ₅₀ (µg/ml)	(mg AAE/ g corteza seca)
<i>E. grandis</i>	6,26 ± 0,19	36,73 ± 0,89
<i>E. urograndis</i>	6,14 ± 0,21	53,18 ± 1,80
<i>E. maidenii</i>	8,24 ± 0,26	34,54 ± 1,12

Fuente: S. A. O. Santos et al. (2012)

4.5.3 Ensayos antifúngicos

Una de las evaluaciones preliminares para la medición del poder antifúngico de un extracto proveniente de hojas o corteza, es el ensayo de concentración mínima de inhibición (IMC, por sus siglas en inglés). Este ensayo, es usado ampliamente en la literatura por ser un procedimiento simple y a corto plazo. Se denomina concentración mínima inhibitoria a la mínima concentración de un químico (en este caso, el extracto de la corteza) que previene el crecimiento visible de una bacteria u hongo. El ensayo consta de incubar placas que posean la especie fúngica inoculada en un medio de cultivo (dependiente de la especie fúngica, normalmente Agar). En la placa se dispone de discos de difusión que pueden ser hechos en papel filtro u otro material, los cuales están impregnados en una solución del extracto a distintas concentraciones dadas por el experimentador (Bauer, Kirby, Sherris, & Turck, 1966). El tiempo de experimentación depende de la velocidad con la que el hongo crece en la placa. Al término de la experimentación, se debió haber formado un halo de inhibición si se obtiene que el

extracto es inhibitorio del crecimiento de hongos (ver figura 5). Donde, bajos IMCs indican un diámetro del halo de inhibición muy pequeño o nulo (Espinel-Ingroff et al., 2007). Para evaluar el efecto verdadero del extracto sobre la inhibición del hongo se utilizan blancos negativos (solvente de dilución del extracto), blancos neutros (sin inyección) y blancos positivos (antifúngico comercial) (P. Vedhanarayanan 2015). En cuanto a la metodología del estudio se presenta en la sección 5.8.1 y sus resultados y discusión en la sección 6.4.1.

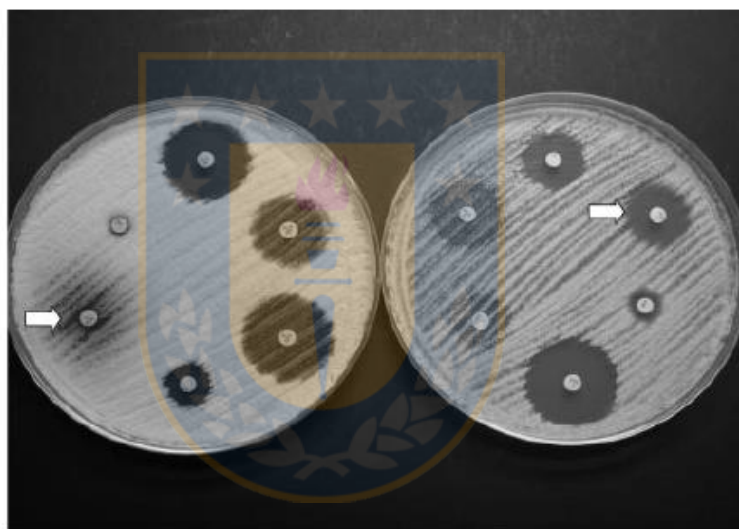


Figura 5: Halo de inhibición en discos de MGM agar con voriconazol para *A. terreus*.
Fuente: Espinel-Ingroff et al. (2007)

Un estudio más complejo para especies fúngicas es el ensayo de pudrición, el cual usa la pérdida de masa de un sustrato. En este caso se usó madera de pino recubierta de extracto hidrofílico como medición del poder antifúngico del extracto.

Winandy (1993) demostró la relación existente entre la degradación de los componentes de la hemicelulosa (arabinosa y la galactosa) y la pérdida de resistencia mecánica de la madera. Las pruebas estándar de desintegración, en su mayoría siguen la norma EN 113 o ASTM D2017 y usan la pérdida de peso como la pérdida de resistencia mecánica de la

madera (S. F. Curling, Clausen, & Winandy, 2002). Por tanto, el fracaso de la protección del extracto hidrofílico sobre el sustrato (madera de pino) queda evidenciada por la pérdida de masa de los bloques de madera tratados con el extracto (ASTM, 2007).

En la mayoría de los ensayos de este tipo, la madera utilizada como sustrato es la madera de pino debido a su gran utilidad en la industria de la madera. Ésta debe ser cortada en forma de cubo y estar libre de nudos, daños y defectos, por último, estar seca al aire libre (S. F. Curling et al., 2002). Las botellas de cultivo pueden ser cilíndricas o cuadradas, siendo la elección realizada por conveniencia del experimentador. En este caso se utilizaron placas cerradas.

Se deben formar las soluciones del extracto a gradientes de concentración apropiados, si el conservante es soluble en agua se deben formar las soluciones en este solvente. Las diluciones son necesarias para proveer una distribución uniforme de conservante a retenciones suficientemente bajas para permitir el ataque de hongos y determinar los valores umbrales para la especie fúngica. Se recomienda ejecutar una prueba preliminar para localizar un umbral aproximado y luego realizar el ensayo a concentraciones dentro de un intervalo del umbral encontrado.

Para obtener la cantidad de conservante retenido en la muestra se utilizó la ecuación 9.

$$R_e = \frac{(T_2 - T_1) * C * 10}{V}$$

Ecuación 9: Cálculo de la retención del conservante absorbido por el bloque (ASTM, 2017)

Donde:

$T_2 - T_1$: es la masa absorbida por el bloque en gramos (peso inicial del bloque antes del tratamiento de impregnación menos el peso inicial del bloque después del tratamiento de impregnación) (g)

C: es la masa de conservante por 100 g de solución tratada (g)

V: es el volumen del bloque (cm^3)

R_e : es la retención de la madera (kg/m^3)

Luego de la impregnación, se deben acondicionar los bloques a las condiciones de humedad y temperatura de la sala de experimentación por el tiempo necesario hasta que el peso de los bloques no varíe con el tiempo.

En cuanto a la inoculación de la especie fúngica en el sustrato impregnado, puede ser realizada por 2 métodos: inoculación directa y por “feeder strip” (ver figura 6). Por un lado, en la inoculación directa como su nombre lo dice, el sustrato es inoculado directamente con una suspensión del hongo. Por otro lado, el método por “feeder strip” implica pre-inocular la especie fúngica en un sustrato más pequeño del mismo material o un papel para asegurar que el hongo crezca posteriormente en el sustrato.

Los medios de cultivo más utilizados son: tierra, vermiculita y mezcla entre tierra/vermiculita. Mientras que los tiempos de exposición utilizados dependen de la velocidad de crecimiento del hongo en el sustrato; en este trabajo se utilizaron 2 tiempos de cultivo, 30 y 60 días.

Los cultivos son incubados a temperatura ambiente (25°C a 27°C aproximadamente) y a una humedad relativa entre 65 y 75%. La medición de la pérdida de masa se realizó a tiempo cero (antes de la incubación), y a los plazos de 30 y 60 días, donde los bloques fueron removidos de su contenedor y limpiados del hongo adherido. Para un correcto

pesaje, los bloques fueron secados al aire para disminuir la humedad de ellos y fueron pesados a 23°C y 65% de humedad relativa (acondicionamiento final) (ASTM, 2007).

La pérdida de masa del bloque se calculó a través de la siguiente ecuación:

$$W_l = 100 * \frac{T_3 - T_4}{T_3}$$

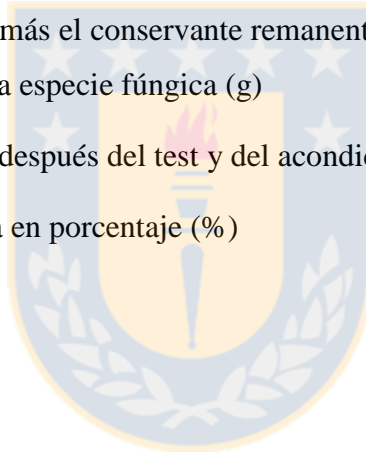
Ecuación 10: Cálculo de pérdida de masa del bloque de madera atacado por el hongo

Donde:

T₃: es el peso del bloque más el conservante remanente después del acondicionamiento y antes de la exposición a la especie fúngica (g)

T₄: es el peso del bloque después del test y del acondicionamiento final (g)

W_l: es la pérdida de masa en porcentaje (%)



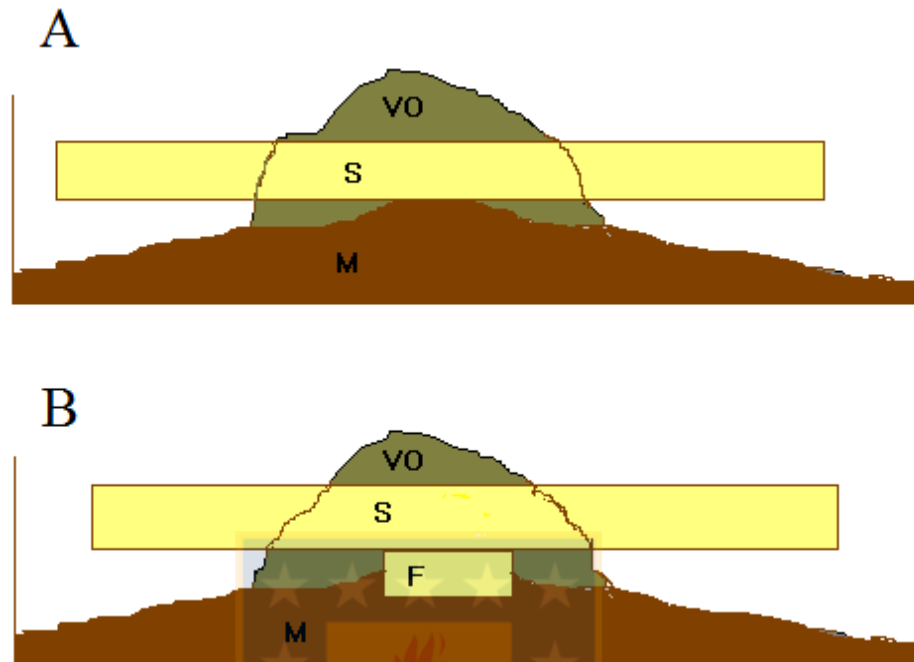


Figura 6: Representación de los métodos de inoculación de sustrato. (A) Inoculación directa (B) Inoculación por “feeder strip”. (VO: Capa de vermiculita, S: Muestra o sustrato, F: Feeder strip, M: Medio).

Fuente: S. Curling, Winandy, Clausen, and Preservation (2000)

Cabe destacar que no se encontraron ensayos antifúngicos con impregnación de extracto de eucalipto en la literatura, representando un aporte a la búsqueda de antifúngicos eficaces provenientes de fuentes naturales. La metodología del ensayo se presenta en la sección 5.8.2 y los resultados del mismo en la sección 6.4.2.

5 Materiales y métodos

En este capítulo se presenta el procedimiento llevado cabo en el laboratorio. En primer lugar, se describe la obtención de las muestras de corteza entregadas por Forestal Comaco. En segundo lugar, se expone el pretratamiento que se realizó a la corteza previa a la extracción con solvente. En tercer lugar se presenta la forma en que se llevaron a cabo las extracciones hidrofílicas, para posteriormente detallar el diseño de experimentos y la determinación de la cinética y su modelación. En cuarta instancia, se presentan las normas en que se basaron los ensayos antifúngicos. Por último, se señala el análisis estadístico llevado a cabo para los resultados obtenidos.

5.1 Obtención de muestras

Se utilizaron muestras de corteza de *E. nitens* y *E. globulus* de edades entre 10-12 años, las cuales fueron cosechadas en Diciembre 17, 2015 del predio Los Castaños FCSA de la empresa Forestal Comaco S.A (Concepción, Región del Biobío, Chile).

Se muestrearon 3 árboles de alturas similares por especie ($34,6 \pm 2,52$ m) y elegidos aleatoriamente (muestras representativas de la población) dentro del predio, realizando 5 cortes equidistantes a lo largo de la altura comercial total del árbol. El detalle, tanto el protocolo de muestreo entregado a Forestal Comaco y las hojas de identificación de los árboles con los datos medidos en terreno, se entregan en el Anexo A1 y A2.

Para el estudio de este trabajo, tanto para el ensayo antifúngico en madera de pino como para las extracciones con solvente, las cortezas de los cortes de los tres árboles analizados(por especie) fueron mezcladas, representando la corteza de los árboles completos. Estas cortezas fueron almacenadas en bolsas selladas, obteniendo 2 muestras: *E. nitens* y *E. globulus*.

5.2 Pretratamiento y caracterización de las muestras

El desprendimiento de la corteza se realizó manualmente para las dos especies de eucaliptus, en un tiempo no superior a 3 días.

Se realizó un pequeño corte perpendicular a la superficie expuesta de la rodela mediante un hacha para mayor facilidad del desprendimiento de ésta. La madera separada de la corteza fue almacenada en una cámara fría (4°C) para futuros estudios.

Las cortezas obtenidas fueron secadas a temperatura ambiente durante el tiempo necesario (no constante) para que éstas llegasen a la humedad de equilibrio con el aire ambiente. Se dejaron secar muestras por triplicado en placas Petri y se registró su peso diariamente hasta que éste no variara significativamente, o en su defecto, aumentara a causa de la humedad relativa del aire.

Se pesó en una placa Petri una pequeña cantidad de la muestra (1 g) en una balanza Precisa 40SM-200A, luego ésta se introdujo en un horno a 104°C por un tiempo de 2 a 5 h, y finalmente, las muestras fueron introducidas en un desecador por 20 min, para luego pesar nuevamente las muestras. Se calculó la humedad de equilibrio por medio de la norma 176/1.Of2003 del (Chile) (2003) mediante el método de secado en estufa. Las mediciones de humedad de ambas muestras de corteza (*E. nitens* y *E. globulus*) fueron realizadas en triplicado y expresadas en base seca por medio de la ecuación 11.

$$\%Hu = \frac{m_i - m_f}{m_f} * 100$$

Ecuación 11: Contenido de agua porcentual en base seca

Donde,

m_i : masa inicial de la muestra (g de corteza húmeda)

m_f : masa final de la muestra (g de corteza seca)

%Hu: porcentaje de humedad de la muestra en base seca (% g agua/ g corteza seca)

Las cortezas fueron cortadas manualmente en pequeños trozos para disminuir el tamaño de éstas y no causar daño alguno al molino. Luego se introdujeron en un molino con un tamiz de 2 mm.

Todas las muestras se guardaron en bolsas cerradas.

Las muestras obtenidas del molino se tamizaron en un tamizador con agitación orbital. Los tamices utilizados fueron de 2,0 mm; 1,0 mm; 0,85 mm; 0,60 mm; 0,35 mm y 0,08 mm. El objetivo de tamizar fue confirmar que las partículas obtenidas tuvieran tamaños menores a 2 mm (tamiz del molino) y para caracterizar las muestras.

El porcentaje en peso de un cierto rango de diámetro de partícula, fue obtenido mediante la ecuación 12, y cada una de las masas retenidas en los tamices fueron pesadas en una balanza.

$$\%T_i = \frac{P_i}{\sum_1^4 P_i} * 100$$

Ecuación 12: Distribución del tamaño de partículas

Donde,

P_i : masa retenida en el tamiz “i” (g) con $i=1,2,3,4$

$\sum_1^4 P_i$: masa total suministrada al tamizador (g)

$\%T_i$: porcentaje en peso de la masa retenida en un cierto tamiz “i” sobre la masa total (g/g)

El tamaño medio de partícula fue determinado por la media aritmética de los pesos de las muestras retenidas entre los tamices utilizados (ponderación).

Las densidades de las cortezas molidas de cada especie fueron determinadas por el método de compresión mecánica, introduciendo una muestra de la corteza molida en una prensa. La tableta formada fue pesada y medida (altura y diámetro para el cálculo del volumen (Saldarriaga, Pablos, Aguayo, Aguado, & Olazar, 2014)).

El tamaño de poros de la corteza molida y el área de distribución de poros fueron medidos por adsorción con N_2 a $-192^\circ C$ (Sample Degas System, Micromeritics, Flowprep 060) para ambas especies de eucaliptus. La corteza en polvo fue previamente multiextraída y limpiada al vacío. El análisis semi-cuantitativo basado en el gráfico-t fue utilizado para el estudio de la distribución de microporos. El tamaño de poro de la corteza se calculó por el método de Barrett, Joyner, and Halenda (1951) (método BJH).

La humedad de equilibrio de las muestras molidas fue obtenida nuevamente mediante el procedimiento de la sección 5.2.2 para ambas especies de eucaliptus.

5.3 Extracción hidrofílica

Cada una de estas muestras de corteza fue suspendida en una mezcla metanol/agua (v/v) usando matraces Erlenmeyer de 80 mL de capacidad. Los matraces se introdujeron en un agitador orbital Bench Top Incubator NBL-205 a una razón líquido/sólido, concentración de metanol, temperatura y tiempo dado por los experimentos de las secciones 5.5 y 5.6,

bajo agitación constante de 200 rpm, para asegurar una mezcla homogénea en el solvente. En cuanto al volumen de solvente, éste fue estabilizado a la temperatura escogida durante 15 minutos en el matraz Erlenmeyer (sellado) introducido en el agitador orbital, para luego, agregar 1 gramo de corteza e iniciar la extracción.

Terminada la extracción, la suspensión fue filtrada al vacío para obtener los extractos de la muestra con el solvente libre de restos de corteza. Los extractos hidrosolubles fueron destilados en un rotavapor a 30°C y 6,5 rpm para eliminar el metanol. Finalmente, el extracto remanente fue congelado (12 horas de refrigeración a -4°C) y, posteriormente, la muestra fue liofilizada (Labconco, Alemania). Los extractos fueron almacenados en frascos ámbar en una sala refrigerada a -4°C.

De la extracción descrita se obtuvo un extracto rico en compuestos hidrosolubles (en forma de polvillo).

El rendimiento de extracción definido en base seca se obtuvo dividiendo la masa de extracto (m_e) por la masa de corteza alimentada en base seca ($m_{i,s}$). Definiendo H_u como la fracción de humedad en base seca (g agua/g corteza seca), siendo $(1+H_u)$ la masa de corteza húmeda dividida en la masa de corteza seca (g corteza húmeda/g corteza seca). Posteriormente, la masa de corteza alimentada en base seca ($m_{i,s}$) se definió en función de la masa de corteza alimentada en base húmeda ($m_{i,h}$) dividiendo $m_{i,h}$ en $(1+H_u)$. Por lo tanto, el rendimiento en base seca se definió como se indica en la ecuación 13.

$$\%E = \frac{m_e}{m_{i,s}} = \frac{m_e}{m_{i,h}} * (1 + H_u)$$

Ecuación 13: Rendimiento de extracción en base seca

5.4 Diseño de experimentos

En la literatura se ha estudiado ampliamente el efecto de los factores que influyen sobre el rendimiento de extracción, cantidad de fenoles totales y la capacidad antioxidante de distintos tipos de corteza (Wright. 2015), por tanto, no fue necesario realizar pruebas secuenciales o de diseño de cribado, para el diagnóstico de factores significativos. Lo anterior, justificó la elección de un diseño Box-Behnken en desmedro de un diseño central compuesto con el objetivo de disminuir costos de solvente y a su vez, evitar posibles restricciones del proceso de extracción por condiciones límite de temperatura en el equipo (Heath Rushing, 2013).

Se realizó un diseño Box-Behnken con 3 puntos centrales y 1 réplica. Los factores a estudiar fueron la razón líquido/sólido (mL de solvente por gramo de corteza seca), la concentración de metanol (%) y la temperatura (°C) (la especificación de los niveles se observa en la tabla 10). En cuanto al tiempo de extracción, este fue fijado en 24 h para asegurar una condición de equilibrio.

Las respuestas a medir fueron el rendimiento de extracción, obtenido por medio de la ecuación 13, la cantidad de fenoles totales, determinados por el método Folin-Ciocalteu (Jerez, Selga, Sineiro, Torres, & Núñez, 2007), y la capacidad antioxidante, medida por el método DPPH (Ku & Mun, 2008)(ver sección 5.4.3 y 5.4.4, respectivamente). El diseño fue realizado para *E. nitens* y *E. globulus*.

Para mayor información sobre la extracción hidrofílica ver sección 5.4.

Tabla 10: Factores y niveles para el diseño de experimentos

Factor	Nivel		
	-1	0	1
Razón líquido/sólido (mL/g)	10:1	35:1	60:1
Concentración de metanol (%)	33,3	50	66,6
Temperatura (°C)	30	45	60

Fuente: Elaboración propia

Los resultados fueron ajustados a un polinomio de segundo orden, como se observa en la ecuación 14.

$$Y_i = a_0 + \sum_{i=1}^3 a_i x_i + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=2, j>1}^3 a_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^3 a_{ii} x_i^2$$

Ecuación 14: Polinomio de segundo orden para ajuste del diseño experimental

Donde, Y_i representa la variable dependiente y x_i y x_j son las variables independientes codificadas entre -1 y 1, a_0 es la constante del modelo, a_i , a_{ij} y a_{ii} son los coeficientes del modelo para interacciones lineales y cuadráticas de las variables independientes.

Para la optimización de múltiples respuestas, una alternativa es analizar cada respuesta de manera separada como menciona Chiao Chih Hua (2001). Esto no es muy satisfactorio cuando las respuestas están correlacionadas. Para abordar esta situación se ha propuesto la técnica de función de deseabilidad. La función de deseabilidad propone convertir el problema de múltiples respuestas, en un problema de una sola respuesta.

Se definió una función de deseabilidad para cada variable dependiente. La función de deseabilidad “d” es definida en la escala de 0 a 1 y se expresa para maximizar las respuestas (ecuación 15).

$$d = \begin{cases} 0; & y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^r; & L \leq y \leq T \\ 1; & y > T \end{cases}$$

Ecuación 15: Función de deseabilidad definida para cada respuesta del diseño experimental

Donde y es el valor predictivo de las variables respuestas, L es un valor donde la respuesta es completamente inaceptable, T es un valor donde la función de deseabilidad es un máximo, y el parámetro “r” es la forma de la función de deseabilidad.

Para combinar la deseabilidad de las tres respuestas, se formuló una función de deseabilidad compuesta. Cada variable fue considerada con la misma importancia y por lo tanto, la función de deseabilidad compuesta se calculó como la media geométrica entre las deseabilidades, la filosofía fundamental de utilizar la media geométrica tiene profundas implicaciones en la calidad, esto es, si una o más de las medidas de deseabilidad individual es inadecuada (deseabilidad cercana a cero), entonces el producto completo se vuelve inaceptable, sin importar las deseabilidades de las restantes, siendo fuertemente influenciado por las características de las respuestas con deseabilidades bajas (Limón, Rodríguez, Sánchez, & Tlapa, 2012).

5.5 Determinación de la cinética del proceso de extracción hidrofílica

Se realizó un ensayo preliminar para evaluar la influencia del tamaño de partícula en la cinética de extracción de compuestos fenólicos. Este se llevó a cabo a una temperatura de 50°C, concentración de metanol/agua de 50:50 v/v y razón sólido/líquido de 1:60. Los

rangos de tamaños de partícula a evaluar fueron 0,08-0,35/0,35-0,60/0,60-0,85/0,85-1 mm. El ensayo fue realizado mediante extracciones destructivas, en triplicado, a siete tiempos determinados: 1, 5, 15, 90, 720, 900 y 1440 min. El procedimiento se realizó para las dos especies de eucaliptus.

Para el ensayo definitivo, se determinó la cinética de extracción de compuestos fenólicos a tres temperaturas: 30, 60°C y la temperatura óptima de cada especie de eucaliptus, realizando ensayos destructivos a siete tiempos: 1, 2, 5, 10, 20, 40, 75, 120 min para ambas especies. Un último tiempo se utilizó para asegurar la concentración de equilibrio, el cual fue de 240 min. Las extracciones se realizaron según el procedimiento detallado en la sección 5.4, utilizando la razón sólido/líquido y concentración de metanol óptimas obtenidas del diseño de experimentos (sección 5.5) a un tamaño de partícula menor a 0,60 mm. El procedimiento se realizó del mismo modo para ambas especies (*E. nitens* y *E. globulus*) y por triplicado para cada ensayo destructivo.

A los extractos obtenidos, tanto del ensayo preliminar como el definitivo, se les determinó el rendimiento de extracción (ecuación 13) y la concentración de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (sección 5.7.1). En cuanto al ensayo definitivo, se realizó la modelación de la desorción de los compuestos fenólicos desde la corteza de *E. nitens* y *E. globulus*, obteniendo las constantes cinéticas de los modelos descritos en la sección 4.4.

5.5.1 Modelación de la cinética de extracción

La modelación se realizó a través del software Matlab 2010a y Microsoft Excel 2013, mientras que para la validación de los modelos descritos en la sección 4.4 se utilizó la desviación porcentual absoluta promedio (MAPD), dada en la ecuación 16. El tratamiento de los datos se realizó mediante análisis estadístico (ver sección 5.9).

$$MAPD (\%) = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{\hat{y}_i - y_i}{y_i} \right|$$

Ecuación 16: Desviación porcentual absoluta promedio

Donde N es el número de valores experimentales, \hat{y}_i es el valor predicho por el modelo, y y_i es el valor experimental.

5.6 Análisis de los extractos

5.6.1 Fenoles totales

Se determinó la concentración de fenoles totales de las muestras extraídas a través del método de Folin-Ciocalteu (Jerez et al., 2007). Se preparó una solución madre de cada muestra con 0,01 g de extracto en 10 mL de agua MilliQ (concentración 1 g/L), y posteriormente se realizó una dilución con factor 10, tomando 1 mL de la solución madre y aforando hasta 10 mL con agua MilliQ. Luego, se introdujeron 0,25 mL de la solución diluida del extracto en un tubo de ensayo y se agregaron 1,25 mL de solución de Folin 1/10 v/v (preparada mezclando 10 mL de Folin-Ciocalteu con 100 mL de agua MilliQ), se agitó por 3 segundos y se agregó 1,0 mL de solución de carbonato de sodio 7,5% p/v (preparada disolviendo 3,75 g y enrasando a 50 mL con agua MilliQ). La mezcla anterior se agitó por 3 segundos nuevamente. Enseguida se dejaron reaccionar las muestras tapadas con parafilm por 15 minutos a 45°C y posterior a este tiempo, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV (Techcomp, UV2300 Spectropotometer, China) a 765 nm, usando cubetas de vidrio.

Se preparó un blanco de la misma forma, pero en lugar de ocupar la solución diluida con extracto, se usaron 0,25 mL de agua MilliQ. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Finalmente la absorbancia de la muestra se calculó por medio de la ecuación 17.

$$A_{muestra} = A_{medida} - A_{blanco}$$

Ecuación 17: Absorbancia de la muestra para medición de FT

Donde

$A_{muestra}$: absorbancia del extracto de la corteza (adim)

A_{medida} : absorbancia de la muestra preparada (adim)

A_{blanco} : absorbancia del blanco (adim)

La concentración de fenoles totales se expresó en g GAE/g extracto utilizando la ecuación 18.

$$C_{fenoles} = \left(\frac{A_{muestra} - b}{a} \right) * \frac{D}{C_{muestra} * 1000}$$

Ecuación 18: Relación de la curva de calibración para la obtención de la concentración de FT

Donde,

$C_{fenoles}$: concentración de fenoles totales (g GAE/g extracto)

$A_{muestra}$: absorbancia del extracto (adm)

$C_{extracto}$: concentración del extracto (g/L)

D: factor de dilución, en este caso 10 (adm)

$a = 0,0116$; $b = 0$ (obtenidas de la curva de calibración, ver Anexo C)

5.6.2 Capacidad antioxidante

Se midió la capacidad antioxidante de las muestras de extractos hidrosolubles mediante el método de captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Ku & Mun, 2008) de la siguiente forma: se preparó una solución madre de Trolox 100 uM y se disolvieron 5 mg de Trolox en 50 mL de metanol. Luego, se preparó una curva de calibración (ver Anexo D) entre 0-60 uM de Trolox. Se preparó la solución DPPH 0,1 mM, disolviendo 0,0040g de DPPH en 100 mL de metanol (ambar). Para la muestra, se mezcló 1 mL de la solución anterior con 2 mL de solución DPPH. El blanco fue realizado mezclando 1 mL de metanol con 2 mL de solución DPPH y el control fue obtenido mezclando 1 mL de la solución anterior con 2 mL de metanol. Se incubaron por 30 minutos protegidos de la luz y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm.

Se preparó una muestra del extracto en metanol/agua; con concentración de 0,1 g/L (0,005 g de extracto en 50 mL de metanol) y 0,2 g/L (0,01 g de extracto en 50 mL de metanol). Luego, se calculó la capacidad antioxidante mediante la ecuación 19.

$$\%AA = \left[1 - \left(\frac{A_{medida} - A_{control}}{A_{blanco}} \right) \right] * 100$$

Ecuación 19: Relación de la capacidad antioxidante con la absorbancia de la muestra

Siendo:

% AA: actividad antioxidante (%)

$A_{muestra}$: absorbancia de la muestra (adim)

$A_{control}$: absorbancia del control (adim)

A_{blanco} : absorbancia del blanco (adim)

5.7 Ensayo de degradación de madera por medio de hongos de pudrición

En primer lugar se realizó un ensayo para analizar la inhibición del crecimiento de hongos que podría producir el extracto hidrofílico en placas con tres especies de hongos de pudrición: *Trametes versicolor* (*T. versicolor*), *Ganoderma australe* (*G. australe*) y *Pleurotus ostreatus* (*P. ostreatus*). El extracto hidrofílico se impregnó en papeles filtro en una solución del extracto en metanol a distintas concentraciones. Del resultado de este ensayo, se escogieron las especies de hongos en las cuales se observó una inhibición parcial o completa del crecimiento de éstos, para luego, realizar el ensayo definitivo con madera de pino impregnada en la solución de extracto hidrofílico, utilizando metanol como solvente.

Los ensayos fueron realizados con extracto hidrofílico de *E. nitens*, *E. globulus* y *P. radiata*.

5.7.1 Ensayo de concentración mínima de inhibición

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (IMC) necesaria para inhibir el crecimiento de diferentes tipos de hongos: *T. versicolor*, *P. ostreatus* y *G. australe*. Para esto se utilizó el método del halo de inhibición, resultado visual de la inhibición de las especies por el efecto del extracto usado (Bauer et al., 1966). Los extractos de corteza de *E. nitens* y *E. globulus* fueron utilizados y extracto de corteza de *P. radiata* también fue incorporado (debido a que esta especie es la de mayor importancia forestal en Chile) para comparar las capacidades antifúngicas de las diferentes especies de árboles.

Para este ensayo se generó una solución madre pesando 0,015 g del extracto hidrofílico de *E. nitens*, *E. globulus* y *P. radiata* en una balanza (Precisa 40SM-200A). Luego, se dispuso el extracto en un matraz aforado de 1 mL enrazando con metanol. Posteriormente, se diluyó la solución madre 3 veces, utilizando dilución en serie con un factor de dilución

1:1, obteniendo 4 soluciones por tipo de extracto y 24 en total (4 soluciones, 3 tipos de extracto y realizado en duplicado). Todo el material fue previamente esterilizado.

Fueron incubadas 81 placas Petri, utilizando como medio de cultivo Agar suplementado con antibióticos (estreptomicina y ampicilina, 1 mg/mL para ambos casos) y extracto de malta al 2 % p/p.

En cada placa se dispusieron 4 círculos de papel filtro de 6 mm de diámetro, que fueron ubicados en el borde exterior de la placa (lo más alejado entre ellas y a una distancia equidistante del centro de la placa). Cada conjunto de 27 placas fueron inyectadas, bajo campana y en presencia de mechero, con las 24 soluciones preparadas anteriormente, y además, un blanco negativo (sólo metanol), un blanco neutro (el cual no se inyectó) y un blanco positivo (anti-fúngico forestal). Cada solución se inyectó en cuadruplicado para cada placa, proceso que fue realizado para las tres especies de hongos. Los volúmenes de inyección fueron de 15 μ L, obteniendo concentraciones de extracto de 15, 7,5, 3,75, 1,875 μ g/ μ L dispuestas en las placas. Finalmente se dejaron las placas en un medio de cultivo a 24°C por un tiempo de 4, 7 y 14 días para *T. versicolor*, *P. ostreatus* y *G. australe*, respectivamente. El experimento de la sección siguiente fue desarrollado para las especies que obtuvieron resultados positivos en este ensayo.

5.7.2 Ensayo definitivo de degradación de madera de pino por medio de hongos de pudrición

Se llevó a cabo un ensayo de degradación de madera. Para esto, madera de pino fue impregnada con el extracto hidrofílico sobre las especies fúngicas usadas (ASTM, 2007). Un total de 33 probetas de madera de pino cepillado seco de 25x25x10 mm fueron cortadas. Las probetas se dejaron durante dos días en un horno a 24°C y 70% de humedad relativa, posteriormente se efectuó el primer pesaje.

Se prepararon cuatro soluciones con las que se impregnaron las probetas. Las tres primeras soluciones constaron de extracto hidrofílico de *E. nitens*, *E. globulus* (obtenidos en este

trabajo) y *P. radiata* (suministrado por la Unidad de Desarrollo Tecnológico de la Universidad de Concepción, Coronel, VIII región, Chile) en metanol a una concentración de 0,015 g/mL para ambos. La cuarta solución fue de ketoconazol en metanol a una concentración de 0,001 g/mL.

Para la impregnación se utilizaron 5 placas Petri previamente esterilizadas. En cada placa se depositaron 6 probetas de madera numeradas; 3 placas contuvieron las soluciones de extracto, 1 placa la solución de ketoconazol (blanco positivo) y otra, metanol (blanco negativo). Además, se dejaron 3 probetas a las cuales no se les aplicó ningún tratamiento (control neutro), para medir la variación de masa por efectos de la humedad ambiental.

Las 30 probetas de madera (sin los controles neutros) fueron sumergidas durante 24 horas en las soluciones, cerciorándose de que se encontraran completamente sumergidas, con el fin, de obtener una impregnación homogénea. Al término de 24 horas se retiraron las probetas de las placas y fueron pesadas. Luego, se dejaron secar a temperatura ambiente, mediante exposición superficial durante cinco días hasta que el metanol fue volatilizado y se llegó a un peso constante. Se pesaron las probetas nuevamente.

Un total de 33 placas Petri fueron preparadas utilizando como base vermiculita previamente humedecida con agua MilliQ como medio de cultivo. Se dispusieron las probetas en las placas (una probeta por placa) y se inocularon utilizando una rodela de 1 cm de diámetro de un cultivo del hongo por el método con feeder-strip (S. Curling et al., 2000). Finalmente, se etiquetaron según el tiempo de cultivo, donde, se retiraron la mitad de las placas a los 30 días y la otra mitad a los 60 días, con excepción de los controles neutrales, los cuales fueron retirados a los 60 días

Al momento de retirar las probetas en los tiempos indicados, se limpiaron suavemente las superficies atacadas por el hongo, para luego, ser pesadas nuevamente.

5.8 Análisis estadístico

Los análisis fueron realizados en triplicado. Los resultados fueron expresados como promedio \pm desviación estándar. Para los gráficos se usó nomenclatura en base a letras (letras distintas implica diferencia estadísticamente significativa).

Los análisis estadísticos del diseño de experimentos fueron realizados mediante análisis de la varianza (ANOVA) y superficie de respuesta en el software Statgraphics, que establece el coeficiente de determinación y ajustado (R^2).



6 Resultados y discusión

Este capítulo reporta los datos experimentales obtenidos y su respectivo análisis estadístico. En primera instancia, se informan los resultados del pretratamiento y caracterización de la corteza y los ensayos preliminares de cinética de extracción. Luego, se presentan los resultados del diseño de experimentos para ambas especies de árbol y la validación del modelo presentado. Posteriormente, se entregan los resultados de la cinética de extracción y la modelación con los distintos modelos presentados en la sección 4.4. Finalmente, se presentan los resultados del ensayo de concentración mínima inhibitoria y de degradación de madera de pino mediante hongos de pudrición.

6.1 Ensayos preliminares

6.1.1 Caracterización de la corteza molida

Las humedades finales en base seca para ambas especies fueron de:

- $10,2 \pm 0,205$ % para *E. nitens*
- $8,81 \pm 0,125$ % para *E. globulus*

F. A. Santos, Alban, Frankenberg, and Pires (2016) reportaron la humedad de corteza de eucaliptus cuya especie no fue identificada, obteniendo un valor en el rango del 11%, el cual fue concordante con los valores reportados en este estudio. Los rendimientos de extracción obtenidos en los ensayos posteriores fueron normalizados y expresados en base a corteza seca, considerando estos valores de humedad.

Se consiguió de la molienda un $97,5 \pm 2,57$ % en peso de corteza menor a 2 mm, por lo que se obtuvo una fracción fina, en un rango aceptable para obtener extractos enriquecidos en materiales solubles (Miranda et al., 2013). Se obtuvo un diámetro de partícula

ponderado entre 0,08 – 0,6 mm (tamaño utilizado en este trabajo) de $0,374 \pm 0,025$ mm, sin diferencias significativas entre ambas especies ($p < 0,05$). Para el tamaño de poros sí se obtuvieron diferencias con valores de:

- $7,0604 \pm 0,11215$ mm para *E. nitens*
- $5,0122 \pm 0,12154$ mm para *E. globulus*

Así, ambas especies se encontraron en el rango de mesoporos. El volumen de microporos resultó en un valor del área negativo, indicando la ausencia de este tipo de porosidad en ambas especies de eucaliptus. Kumar, Man, and Woo (2014) estudiaron la efectividad del uso de polvo de corteza de pino como biosorbente. Su caracterización indicó un tamaño de poro de 4.47 nm (para partículas de tamaño de 0.55-0.75 mm), similar a los valores obtenidos en este estudio para especies de eucaliptus. Estos autores también indicaron un poder biosorbente alto para la remoción de fenoles desde una solución acuosa, indicando que esto podría también extrapolarse a la corteza en estudio. F. A. Santos et al. (2016) caracterizaron corteza de eucaliptus molida de un tamaño de partícula menor a 0,25 mm para un potencial uso como biosorbente, obteniendo un tamaño de poro de 5,27 nm, resultado concordante con lo obtenido en este trabajo para ambas especies estudiadas.

Las densidades de las cortezas molidas para cada especie fueron determinadas experimentalmente obteniendo valores de:

- $242 \pm 10,2$ kg/m³ para *E. nitens*
- $267 \pm 4,80$ kg/m³ para *E. globulus*

Ambas densidades fueron utilizadas en la sección 6.3.1.2 para el cálculo del volumen de la partícula sólida (V_s) en el modelo de Fick con balance en el solvente (ver ecuación 5, sección 4.4.2). No se encontraron valores de densidad de la corteza molida en la literatura.

6.1.2 Cinética de extracción

Se realizaron ensayos de cinética de extracción a seis tiempos para las dos especies de árbol, determinando la concentración de fenoles totales en cada una de las muestras obtenidas. El porcentaje metanol/agua utilizado fue de 50:50 v/v, siendo el valor óptimo obtenido por S. A. O. Santos et al. (2011), la temperatura se fijó en 50°C y la razón sólido/líquido en 1:60 g/mL. El ensayo fue realizado con una agitación de 200 rpm para desprejar las limitaciones difusionales externas. El tamaño de partícula de la corteza se varió desde 0,08 a 1 mm para observar la variación en la curva de extracción y así, determinar el tamaño de partícula necesario para lograr disminuir las limitaciones difusionales internas, y a su vez, mediante la ruptura de las paredes celulares, que el compuesto activo sea completamente extraído. Las curvas de extracción de ambas especies se muestran en las figuras 7 y 8 para *E. nitens* y *E. globulus*, respectivamente.

En las figuras se observa que a menor tamaño de partícula se obtuvo un mayor rendimiento de extracción de compuestos fenólicos cuando se alcanzó al equilibrio. La velocidad de difusión (pendiente inicial de la curva) aumentó a mayor tamaño de partícula. Esto debido a que un menor tamaño de partícula incrementa la superficie de contacto entre las dos fases, reduciendo la distancia de difusión del soluto dentro del sólido (Franco, Pinelo, Sineiro, & Nunez, 2007), efecto confirmado por varios autores que han estudiado la extracción de compuestos extraídos desde matrices vegetales (Cacace & Mazza, 2003; Meyer, 2002).

Se observa que para un tamaño de partícula de 0,08-0,60 mm (tamaño de interés) no existió diferencia significativa en el rendimiento de extracción ($p < 0,05$) a partir de los 90 min aproximadamente para ambas especies, por lo tanto, para asegurar la condición de equilibrio en el estudio de cinética de extracción a distintas temperaturas se utilizó como tiempo de equilibrio un valor de 240 min. A tamaños de partícula de 0,60-0,85 mm y 0,85-1 mm se encontró una diferencia significativa ($p < 0,05$) para ambas especies. A un tamaño de partícula de 0,08-0,60 mm se extrajo todo el contenido fenólico de la matriz sólida porosa, y a su vez, se disminuyeron las limitaciones difusionales internas, por lo que, en

la experimentación de cinética de extracción posterior (sección 6.3) se utilizó este tamaño de partícula.

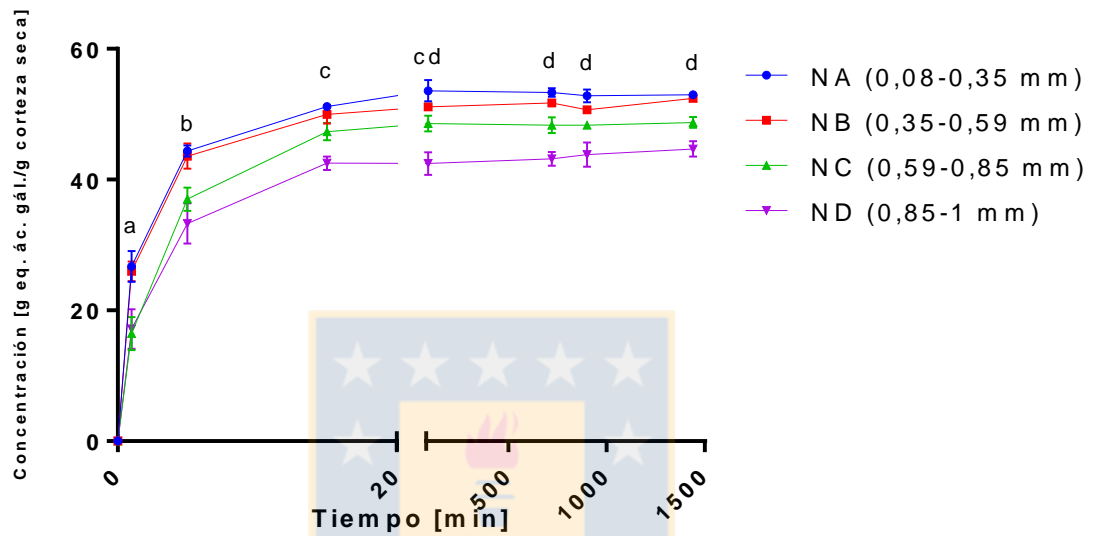


Figura 7: Curva de cinética de extracción a diferentes tamaños de partícula para *E. nitens*

Fuente: Elaboración propia

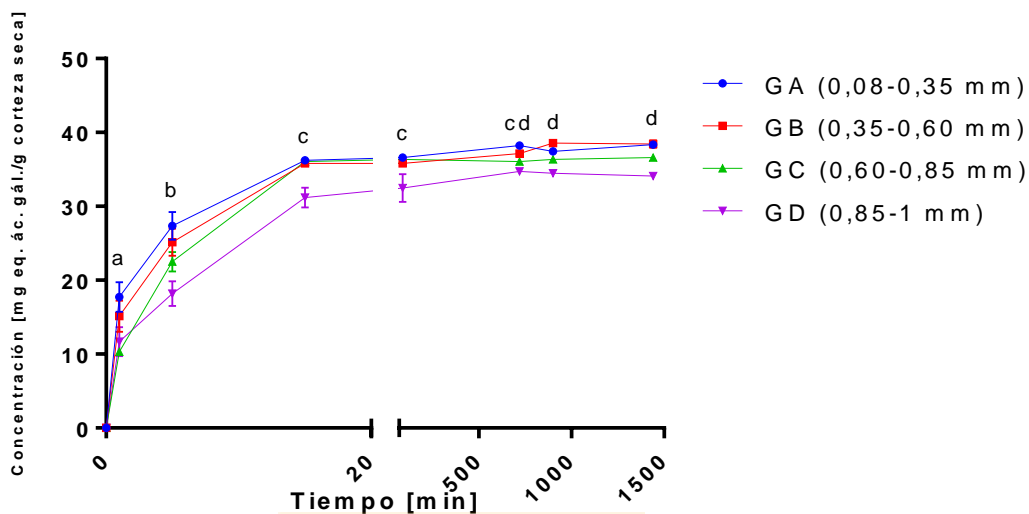


Figura 8: Curva de cinética de extracción a diferentes tamaños de partícula para *E. globulus*

Fuente: Elaboración propia

Los fenoles totales obtenidos en el equilibrio al tamaño de partícula de 0,08-0,60 fueron de $48,6 \pm 0,382$ mg GAE/g corteza seca para *E. nitens* y de $38,4 \pm 0,294$ mg GAE/g corteza seca para *E. globulus*. Los resultados de concentración de fenoles en el equilibrio para todos los tamaños de partícula se muestran en la tabla 30 del Anexo B.1.

Para la especie *E. globulus*, se reportó un valor de fenoles totales de $38,40 \pm 0,489$ mg GAE/g corteza seca por S. A. O. Santos et al. (2011), siendo un resultado similar al obtenido en este trabajo. Gutiérrez (2016) obtuvo un valor de $32,2 \pm 4,05$ mg GAE/g corteza seca para *E. globulus* a un tamaño de partícula menor a 2 mm, utilizando condiciones similares de concentración metanol/agua, temperatura y razón sólido/líquido.

Para *E. nitens* no se reportan resultados de rendimiento de extracción de compuestos fenólicos en la literatura. En estudios previos realizados se encontró un valor de $40,5 \pm 7,03$ mg GAE/g a un tamaño de partícula menor a 2 mm.

S. A. O. Santos et al. (2012) reportaron valores de fenoles totales para *E. globulus*, *E. grandis*, *E. urograndis* y *E. maidenii* obteniendo $38,40 \pm 0,489$; $40,64 \pm 1,16$; $56,92 \pm$

1,18; $26,97 \pm 0,58$ en mg GAE/g corteza seca, respectivamente, los cuales, se encuentran cercanos a los resultados obtenidos en este trabajo.

6.2 Diseño de experimentos

Las superficies de respuesta para el rendimiento se pueden observar en las figuras 9 y 10 para *E. nitens* y *E. globulus* respectivamente. Las superficies de respuesta para fenoles totales se muestran en la figura 11 para *E. nitens* y figura 12 para *E. globulus*.



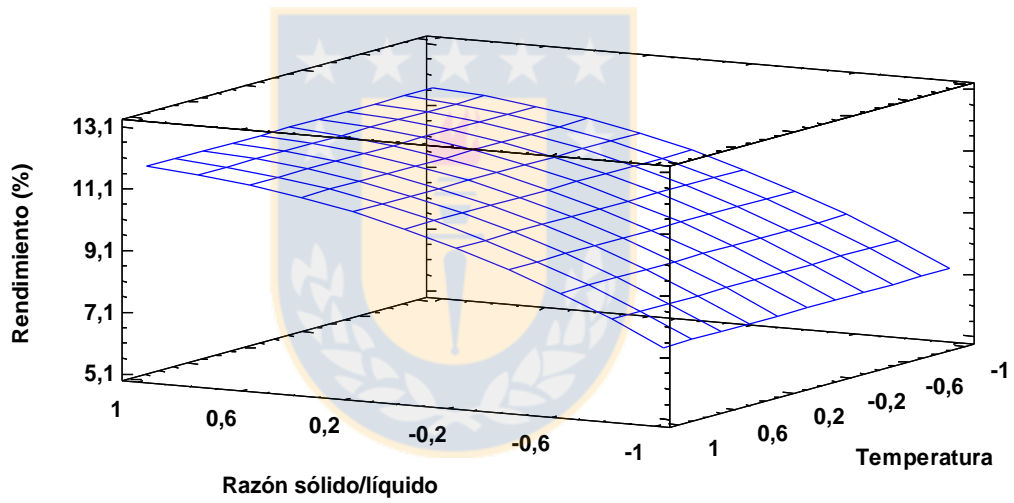
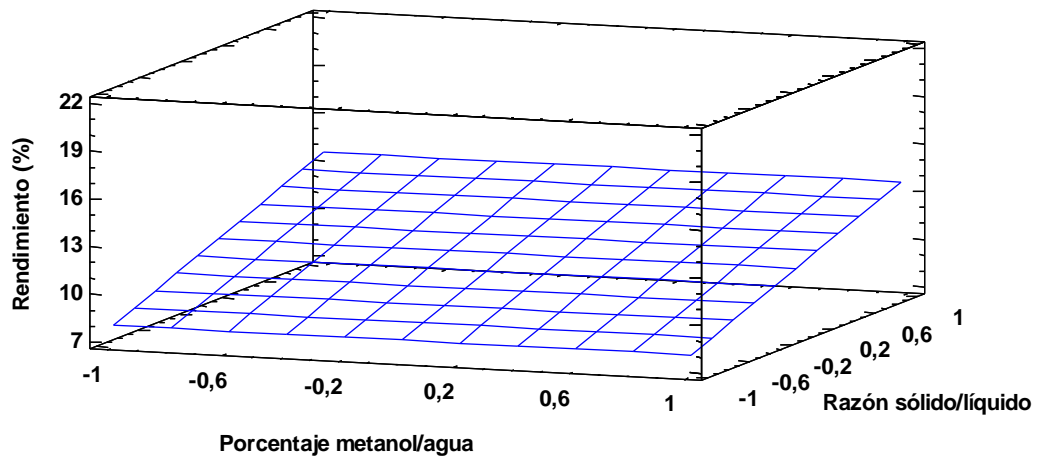


Figura 9: Superficies de respuesta para rendimiento (%) obtenido en la especie *E. nitens*

Fuente: Elaboración propia

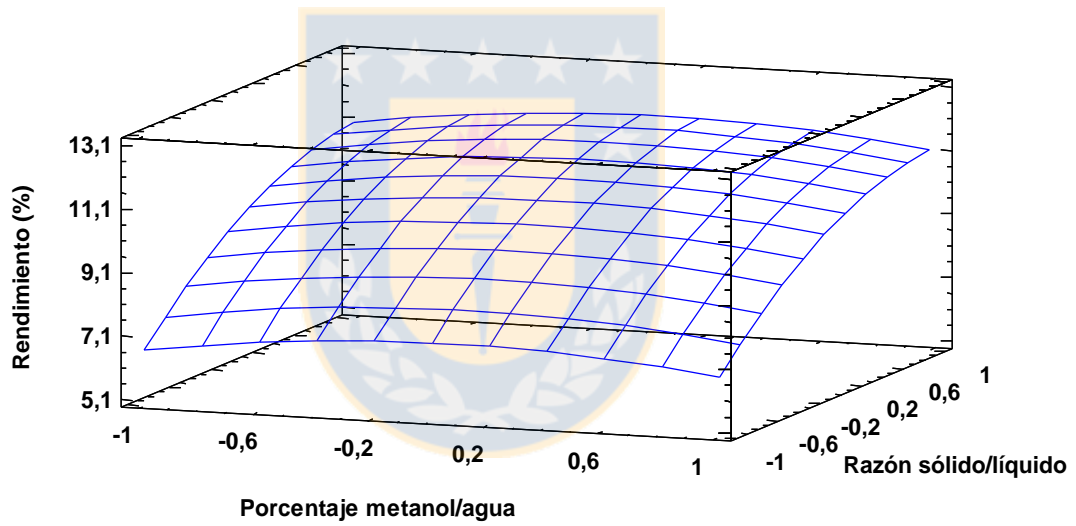
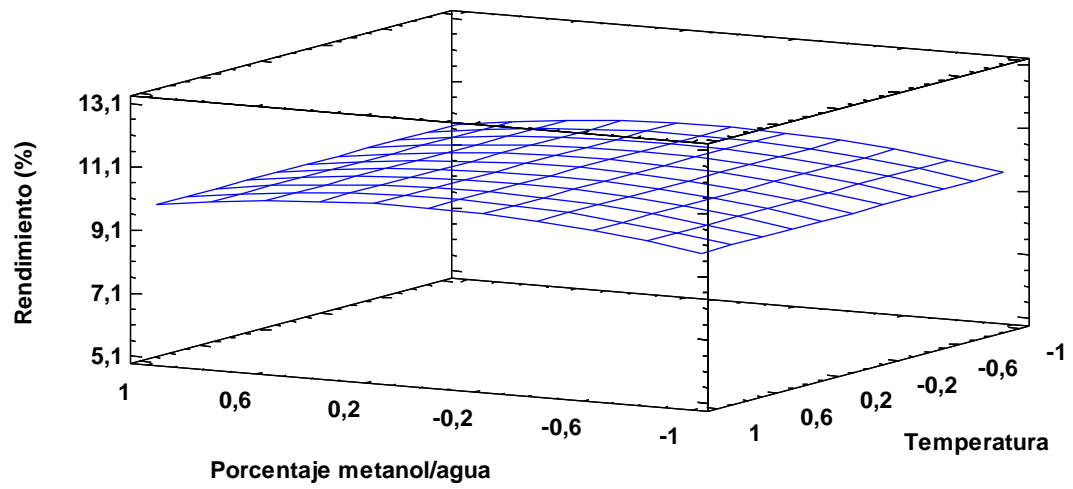


Figura 10: Superficies de respuesta para el rendimiento (%) obtenido en la especie *E. globulus*

Fuente: Elaboración propia

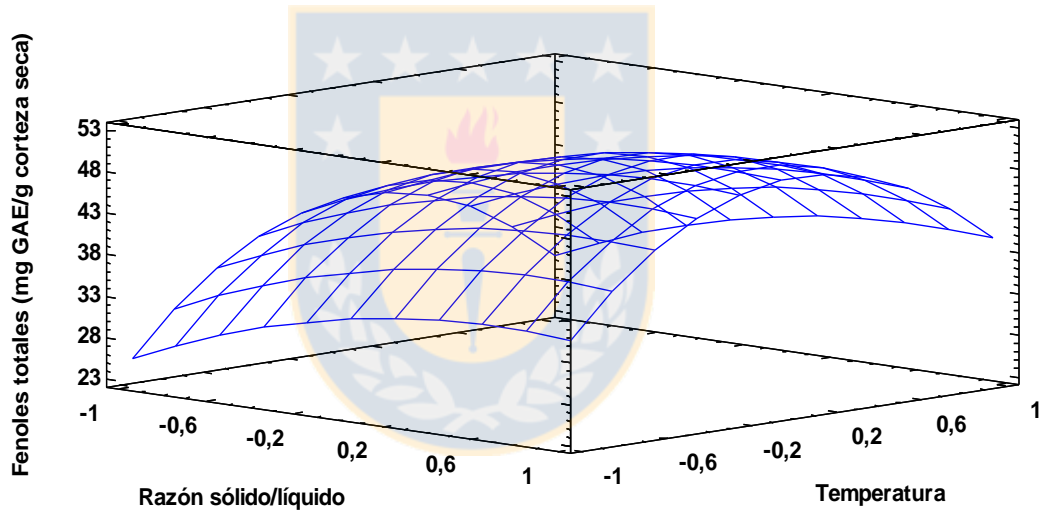
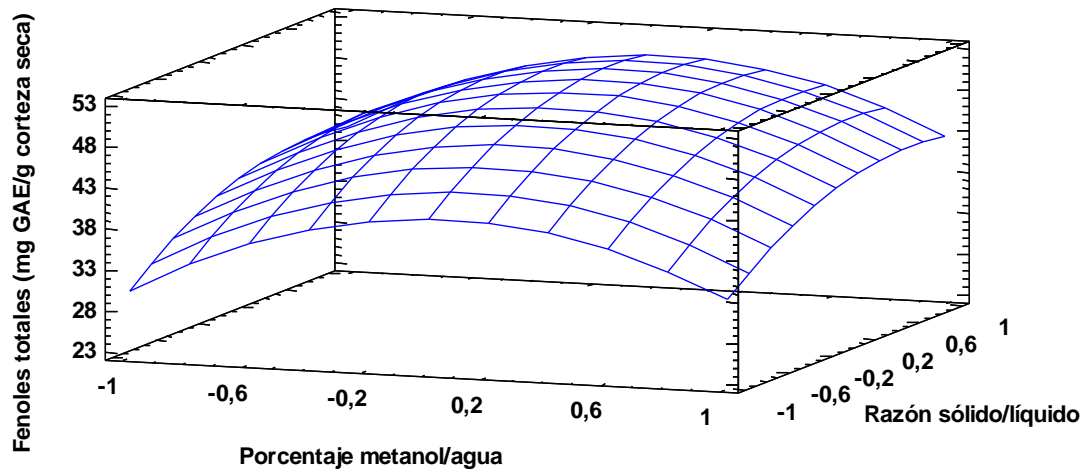


Figura 11: Superficies de respuesta para fenoles totales en la especie E. nitens
 Fuente: Elaboración propia

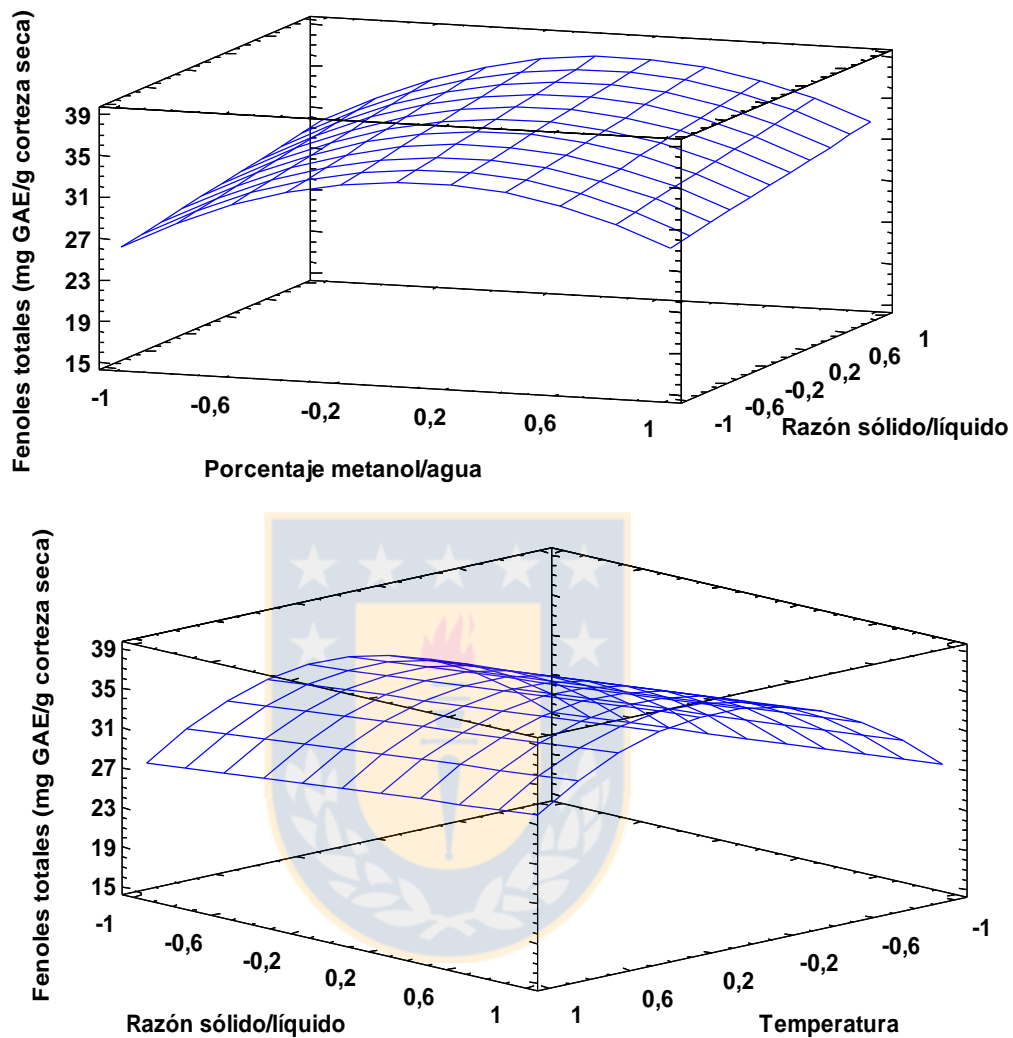


Figura 12: Superficies de respuesta para fenoles totales en la especie *E. globulus*

Fuente: Elaboración propia

Para la especie *E. globulus*, el rendimiento de extracción fue influenciado por la razón sólido/líquido y en menor medida por la concentración de metanol/agua. La respuesta fenoles totales y capacidad antioxidante, por su parte, fueron afectadas cuadráticamente por el porcentaje metanol/agua y la temperatura con respuestas máximas a temperaturas intermedias. Un comportamiento similar se obtuvo en las respuestas para la especie *E.*

nitens, con una influencia adicional de la temperatura sobre el rendimiento de extracción y la razón sólido/líquido sobre los fenoles totales y la capacidad antioxidante.

Estudios previos han reportado el hecho que valores de temperatura intermedios generen valores óptimos para la respuesta fenoles totales (I. Mota et al., 2013; Inês Mota et al., 2012). Esto es atribuido a la aceleración en la degradación de compuestos fenólicos cuando estos están sujetos a altas temperaturas en el proceso de extracción. Sin embargo, la respuesta rendimiento de extracción es favorecida a altas temperaturas, pero este hecho está asociado con una mayor producción de carbohidratos en estas condiciones, ya que a altas temperaturas se mejora la difusión del solvente en la matriz sólida y la solubilidad de los compuestos (fenólicos y no fenólicos) (Spigno, Tramelli, & De Faveri, 2007). La influencia de la concentración de solvente y la razón sólido/líquido sobre el rendimiento de extracción y los fenoles totales también han sido publicados por varios autores.

Inês Mota et al. (2012) reportaron un comportamiento similar para la extracción de corteza de *E. globulus* que la obtenida en este estudio para las respuestas de rendimiento y fenoles totales, obteniendo un óptimo a un porcentaje etanol/agua de 40% (valor intermedio del diseño). En cuanto a la influencia de la relación sólido/líquido sobre el rendimiento de extracción y los fenoles totales, las cantidades extraídas fueron mayores cuando se disminuyó la razón sólido/líquido, lo cual se debe a la saturación del solvente a una mayor razón sólido/líquido, causada por una mayor cantidad de sólidos que se utilizan para un mismo volumen de solvente. Derkyi Nana, Sekyere, Darkwa Nicholas, and Boakye Nana (2011), Kaiser et al. (2013) y Wright (2015) encontraron un comportamiento similar en otras especies de corteza.

Los coeficientes de los modelos obtenidos para las tres respuestas junto con su significancia son presentados en la tabla 11, de la cual, puede inferirse que los modelos predicen exitosamente los resultados experimentales para las variables dependientes en todos los casos, obteniendo coeficientes de correlación mayores a 0,82.

Tabla 11: Coeficientes de los modelos y parámetros estadísticos

<i>E. nitens</i>			
Respuesta	Modelo predictivo	R ²	Valor p (falta de ajuste)
Rendimiento	$10,8355 + 2,8874 * Y_2 + 2,9950 * Y_3 + 2,77064 * Y_3^2$	87,1%	0,0768
Fenoles totales	$49,3569 + 1,2952 * Y_1 + 4,8427 * Y_2 + 2,2341 * Y_3 - 9,2526 * Y_1^2 - 3,6062 * Y_2^2 - 13,1054 * Y_3^2$	89,0%	0,0732
Capacidad antioxidante	$44,791 + 1,72691 * Y_1 + 4,18802 * Y_2 + 1,94785 * Y_3 - 8,95713 * Y_1^2 - 2,8891 * Y_2^2 - 11,6913 * Y_3^2$	88,3%	0,1999
<i>E. globulus</i>			
Rendimiento	$10,4686 + 0,06386 * Y_1 + 2,2195 * Y_2 - 0,6651 * Y_1^2 - 0,9137 * Y_2^2$	90,1%	0,1613
Fenoles totales	$35,7235 + 1,4416 * Y_1 + 1,9714 * Y_2 + 1,9097 * Y_3 - 6,2715 * Y_1^2 - 8,1420 * Y_3^2$	82,4%	0,0501
Capacidad antioxidante	$32,4764 + 1,2905 * Y_1 + 1,7151 * Y_2 + 1,7678 * Y_3 - 5,7866 * Y_1^2 - 7,29193 * Y_3^2$	82,4%	0,2007

Nota: Y₁: Concentración metanol/agua (%); Y₂: Razón sólido/líquido (g/mL); Y₃: Temperatura (°C)

Los valores de las variables están especificados en sus unidades originales.

Fuente: Elaboración propia

La función de deseabilidad compuesta (tres respuestas) fue maximizada para ambas especies de eucaliptus para valores intermedios de temperatura y porcentaje metanol/agua (Figura 13 y 14).

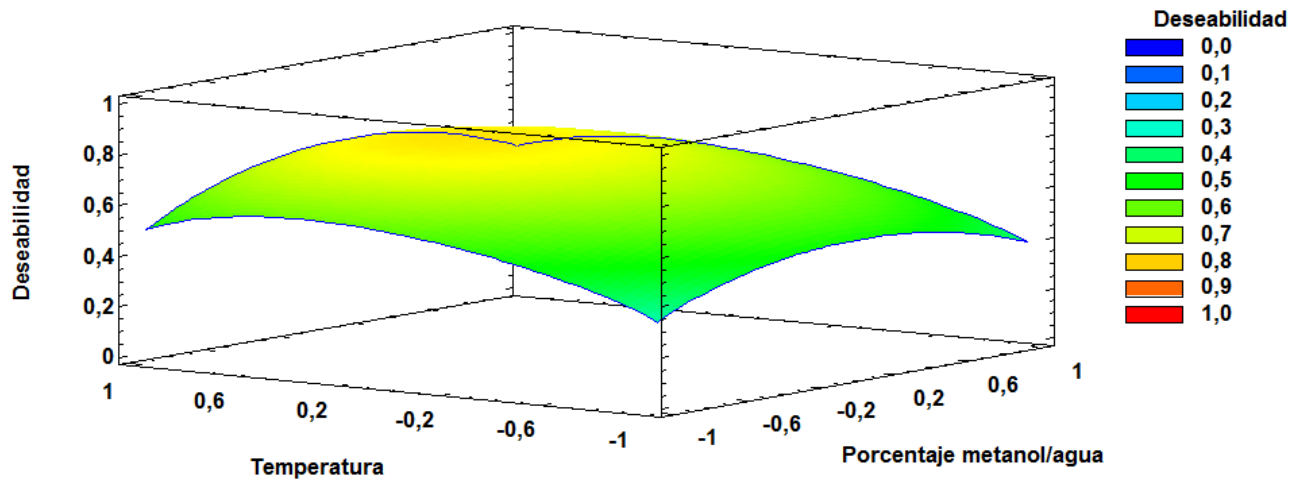


Figura 13: Función de deseabilidad para el diseño experimental de la especie *E. nitens*
Fuente: Elaboración propia

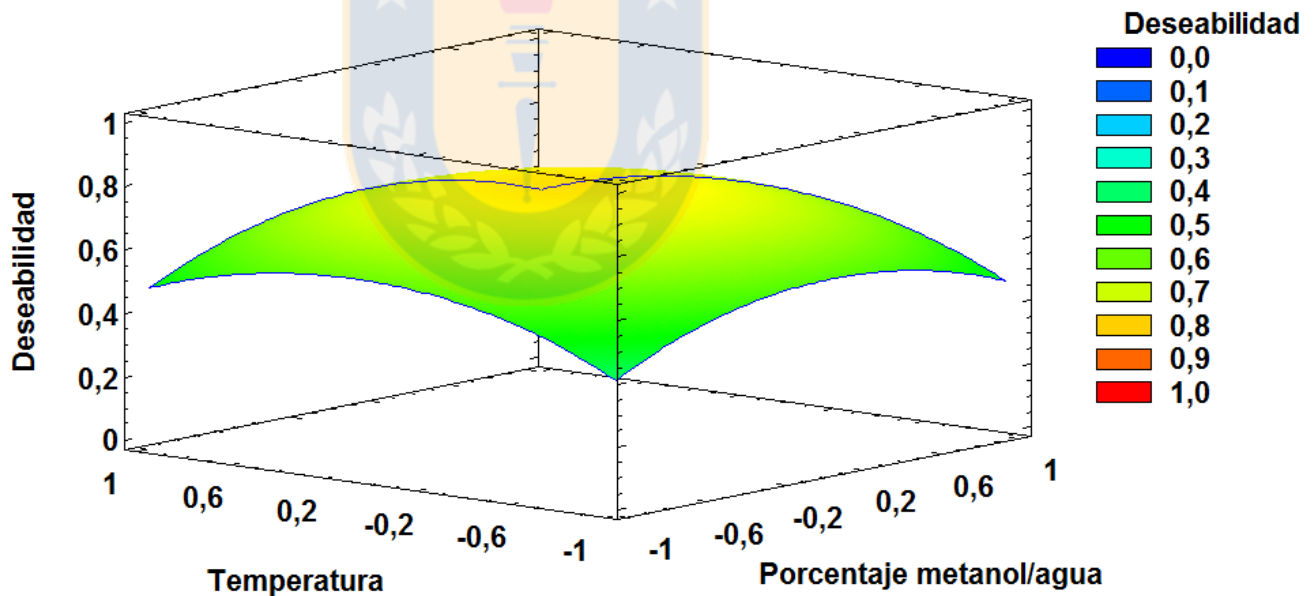


Figura 14: Función de deseabilidad para el diseño experimental de la especie *E. globulus*
Fuente: Elaboración propia

Las respuestas maximizadas obtenidas a temperaturas intermedias pueden ser explicadas por la influencia de la temperatura sobre el contenido fenólico. Las condiciones que

maximizan las respuestas en estudio fueron encontradas a una concentración de 51% (v/v) en metanol, una razón sólido/líquido de 1/60 g/mL para ambas especies y a una temperatura de 53°C y 46°C para *E. nitens* y *E. globulus* respectivamente. Bajo estas condiciones óptimas, es posible obtener un extracto enriquecido en polifenoles conteniendo 48,0 mg GAE/g corteza seca (o 43,8 mg AAE/g corteza seca) para *E. nitens* y 37,8 mg GAE/g corteza seca (o 34,3 mg AAE/g corteza seca) para *E. globulus*. Las respuestas optimizadas son presentadas en la tabla 12 para ambas especies.

Tabla 12: Óptimos del diseño experimental para *E. nitens* y *E. globulus*

Respuestas	Especie de árbol	
	<i>E. nitens</i>	<i>E. globulus</i>
Rendimiento (%)	16,1	11,7
Fenoles totales (mg GAE/g corteza seca)	48,0	37,8
Capacidad antioxidante (mg AAE/g corteza seca)	43,8	34,3

Fuente: Elaboración propia

Los resultados obtenidos para el rendimiento de extracción y los fenoles totales fueron cercanos a los obtenidos por S. A. O. Santos et al. (2011), que realizó una extracción batch de corteza de *E. globulus* utilizando como solvente metanol/agua a una razón sólido/líquido de 50/50 (v/v), obteniendo un rendimiento de 9,28 % y 38,4 mg GAE/g corteza seca de contenido fenólico. Posteriormente, S. A. O. Santos et al. (2012) realizaron una extracción batch para las especies *E. maidenii*, *E. grandis* y *E. urograndis*, utilizando el mismo solvente y esta vez cuantificando la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos, encontrando rendimientos de extracción en el rango de 10,54%-15,18%, contenidos fenólicos de 26,97-56,92 mg GAE/g corteza seca y capacidad antioxidante

entre 34,54-53,18 mg AAE/g corteza seca. Estos resultados fueron acordes con los obtenidos en el presente estudio para ambas especies de eucaliptus.

Este estudio también demostró una fuerte correlación lineal entre la cantidad de fenoles totales extraída y la capacidad antioxidante de los extractos medida por el método DPPH, obteniendo un r^2 de 0,968 y 0,944 para *E. nitens* y *E. globulus* respectivamente (Figuras 15 y 16).

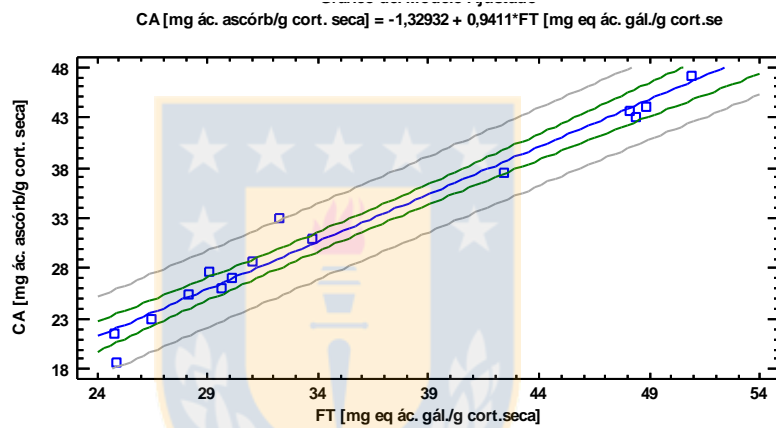


Figura 15: Relación entre los fenoles totales y la capacidad antioxidante DPPH en *E. nitens*

Fuente: Elaboración propia

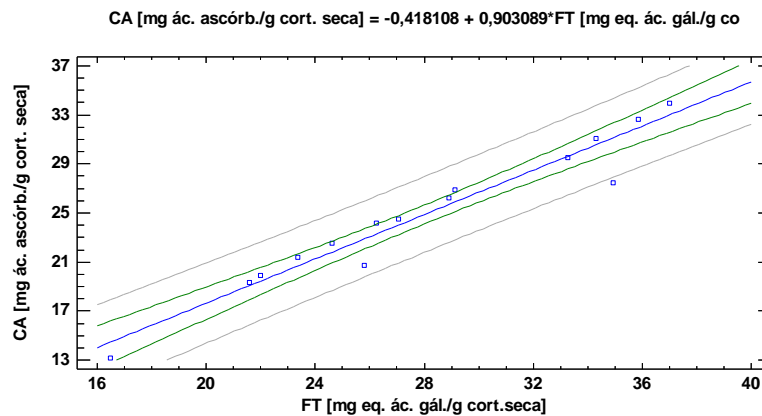


Figura 16: Relaci3n entre los fenoles totales y la capacidad antioxidante DPPH en *E. globulus*

Fuente: Elaboraci3n propia

Varios autores han reportado una relaci3n lineal entre estos dos factores utilizando varias metodologías de medici3n entre ellas la utilizada en este trabajo (Maksimovic, Malencic, & Kovacevic, 2005; Soong & Barlow, 2004; Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, & Hawkins Byrne, 2006; Velioglu, Mazza, Gao, & Oomah, 1998). Un caso particular se presenta en el estudio de Vázquez et al. (2009) utilizando corteza de *E. globulus*, el cual inform3 una correlaci3n lineal con un r^2 de 0,9614 entre ambas variables, utilizando el m3todo FRAP (reducci3n f3rrica / poder antioxidante). Adem3s, el reciente estudio de Jutakridsada, Iamamornphanth, Patikarnmonthon, and Kamwilaisak (2017) con corteza de *E. globulus* mostrando una correlaci3n entre FRAP y los fenoles totales y los resultados de FRAP y DPPH en t3rminos de capacidad antioxidante, lo cual es concordante con lo obtenido en este trabajo.

6.2.1 Validación del modelo del diseño de experimentos

La validación del modelo del diseño experimental se muestra en la tabla 13. Se realizaron los experimentos a las condiciones óptimas obtenidas de cada especie de árbol. Este ensayo se realizó por quintuplicado para cada especie. De la tabla, se observa que los valores predichos por el modelo se encuentran cercanos a los valores experimentales obtenidos para las tres respuestas: rendimiento, fenoles totales y capacidad antioxidante, validando el modelo obtenido anteriormente.

Tabla 13: Valores predichos y experimentales de las respuestas óptimas obtenidas del modelo experimental

Especie	Rendimiento (% g extracto/g corteza seca)			Fenoles totales (mg GAE/g corteza seca)			Capacidad antioxidante DPPH (mg AAE/g corteza seca)		
	Pre.	Exp.	ER (%)	Pre.	Exp.	ER (%)	Pre	Exp.	ER (%)
<i>E. nitens</i>	16,1	15,1 ± 1,03	6,33	48,0	46,7 ± 2,01	2,80	43,8	43,1 ± 1,22	1,71
<i>E. globulus</i>	11,7	10,4 ± 1,21	13,0	37,8	36,9 ± 1,26	2,68	34,3	35,0 ± 1,51	2,05

Nota: Pre: valor predicho; Exp: valor experimental y ER: error relativo

Fuente: Elaboración propia

6.3 Cinética de extracción

En las figuras 17 y 18 se muestran las curvas de extracción obtenidas para *E. nitens* y *E. globulus*, respectivamente a temperaturas de 30°C, 60°C y a la temperatura óptima de cada diseño experimental, obtenida anteriormente.

La razón sólido/líquido y el porcentaje de metanol/agua se mantuvieron a las condiciones óptimas del diseño de experimentos para cada especie, y un tamaño de partícula de 0,08-0,60 mm, obtenido en los ensayos preliminares (sección 6.1.3), el cual disminuyó las limitaciones difusionales internas y a su vez, aseguró que la extracción de los compuestos fenólicos fuese completa. Se despreciaron las limitaciones difusionales externas, al igual que en los ensayos preliminares utilizando una velocidad de agitación de 200 rpm.

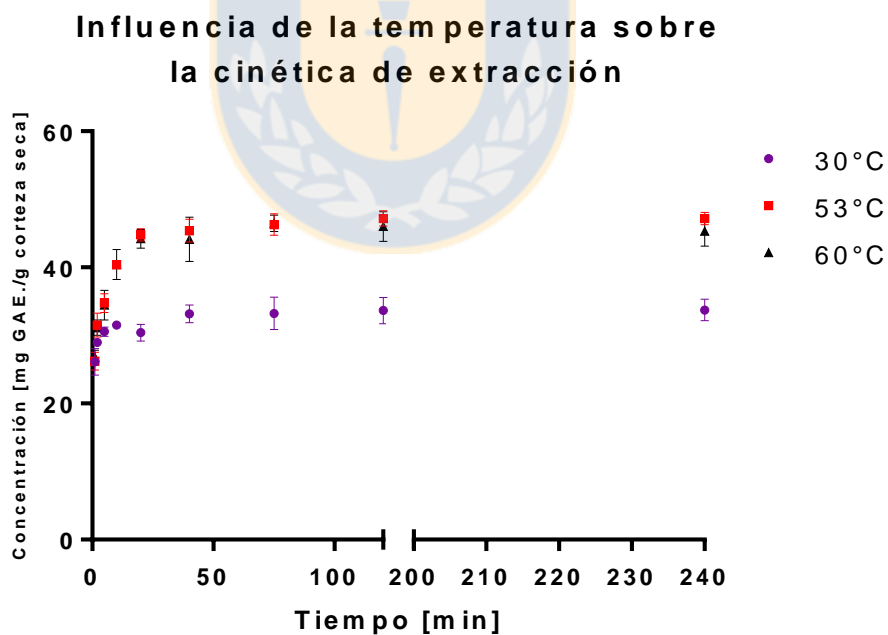


Figura 17: Curva de extracción a distintas temperaturas para *E. nitens*

Fuente: Elaboración propia

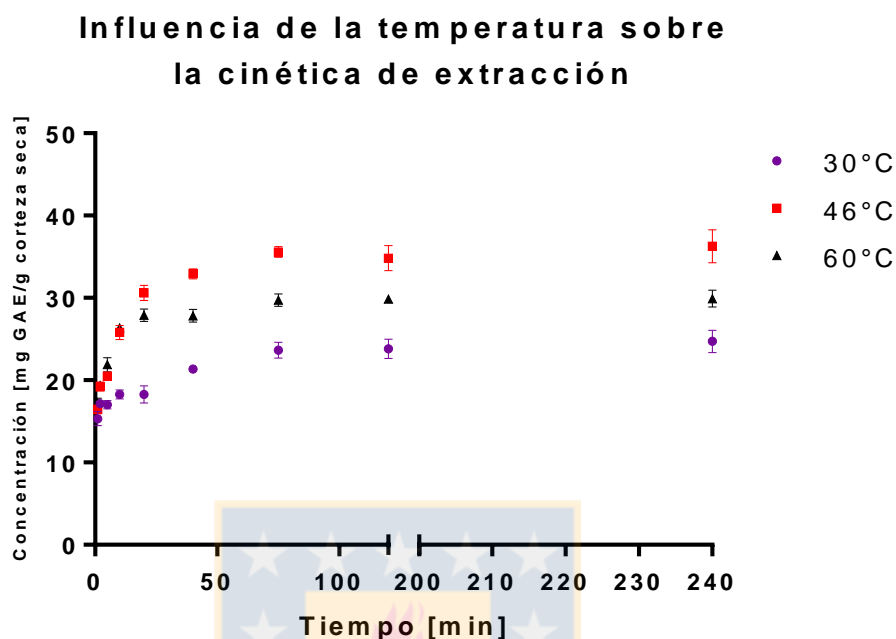


Figura 18: Curva de extracción a distintas temperaturas para *E. globulus*
Fuente: Elaboración propia

Las curvas de cinética de extracción, tanto para *E. nitens* como *E. globulus*, siguen la curvatura esperada de extracción de materiales lignocelulósicos (Wright, 2015) y por tanto todas estas curvas pueden ser descritas usando modelos matemáticos de transferencia de masa (Jokić et al., 2010).

Se observa, para todos los casos, que el inicio de la extracción se caracterizó por un aumento drástico en la concentración de fenoles en la fase líquida, denominada fase de difusión rápida o “washing”, la cual es debida a la gran cantidad de extracto que se encuentra en las capas superficiales de la corteza, a causa del daño mecánico en su etapa de molienda (Hojnik et al., 2008). Con el pasar del tiempo, sin embargo, la velocidad de extracción, caracterizada por la pendiente de las curvas, fue disminuyendo (fase de difusión lenta en el interior de las partículas sólidas) hasta llegar a una condición de saturación en donde no existió transferencia de soluto desde la fase sólida hacia el solvente líquido.

Esta condición es llamada equilibrio de extracción y fue obtenida para ambas especies aproximadamente a los 75 min.

En los cuales, no se observaron cambios significativos en la concentración de fenoles totales con un nivel de confianza del 95%. Las concentraciones de equilibrio para ambas especies resultaron ser mayores para una temperatura de 53°C para *E. nitens* y de 46°C para *E. globulus*. Con el incremento en la temperatura, un claro aumento en la velocidad de difusión y concentración de equilibrio fue obtenido para la especie *E. globulus*. En el caso de la especie *E. nitens*, se observó el mismo comportamiento cuando la temperatura aumentó de 30°C a 53°C, mientras que, cuando se incrementó la temperatura de 53°C a 60°C, la velocidad de difusión y la concentración de equilibrio disminuyeron. Se ha reportado que un aumento en la temperatura resulta, en la mayoría de los casos, en un incremento de la velocidad de difusión y solubilidad de los compuestos extraídos, por otro lado, debe tenerse en cuenta que algunas sustancias biológicamente activas son degradadas a altas temperaturas (Cacace & Mazza, 2003).

El aumento de la concentración de equilibrio con el incremento de temperatura es atribuido a la reducción de la viscosidad del solvente, resultando en una mejor capacidad de mojar la matriz vegetal y de solubilización de los compuestos activos, debilitando las interacciones fenol-proteína o fenol-polisacárido de la corteza y favoreciendo la difusión debido al ablandamiento del tejido vegetal, hasta un punto donde el aumento de temperatura llega a ser perjudicial para la extracción, degradando los fenoles en la matriz vegetal (Derkyi Nana et al., 2011; Inês Mota et al., 2012; Yang et al., 2009).

A continuación se presentan los cuatro modelos matemáticos usados para describir la cinética de extracción en este estudio.

6.3.1 Modelación de la cinética de extracción

Se presentan los ajustes de modelos cinéticos a los datos experimentales obtenidos en la sección anterior. Los modelos evaluados se presentaron en la sección 4.4. Las comparaciones entre modelos se llevaron a cabo mediante la desviación porcentual absoluta promedio (MAPD), que proporciona el error entre los datos experimentales y los datos ajustados del modelo (ver ecuación 16).

6.3.1.1 Modelo M1: Modelo de difusión de Fick

El modelo de difusión de Fick aproxima el proceso de extracción como un solo paso, con una difusividad efectiva que controla el proceso. Para este modelo se requieren dos parámetros: la concentración de fenoles en el líquido en el equilibrio (c_{∞}) y el coeficiente de difusión efectivo (D_{eff}). La derivación del modelo se explica en la sección 4.4.1. En este caso, se determinó c_{∞} experimentalmente y D_{eff} fue obtenido por ajuste de los datos experimentales. Se muestran en las figuras 19 y 20 las modelaciones de la cinética de extracción mediante el modelo de Fick a las distintas temperaturas.

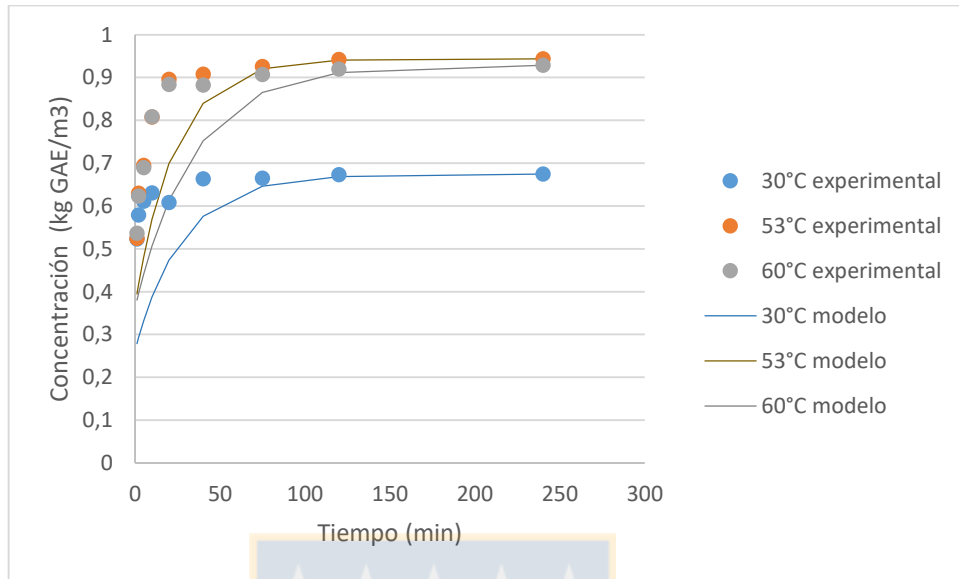


Figura 19: Cinética de extracción ajustada por el modelo de Fick para *E. nitens*
 Fuente: Elaboración propia

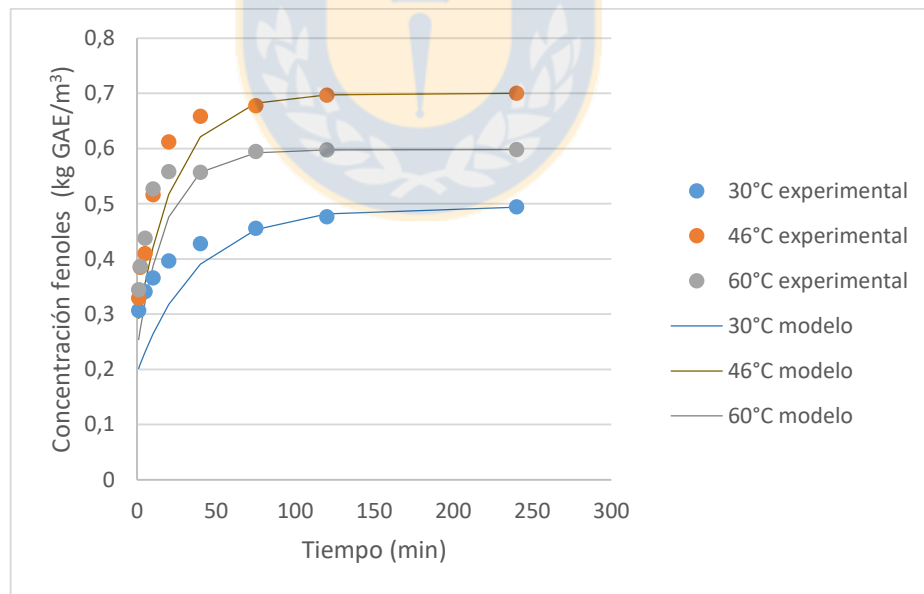


Figura 20: Cinética de extracción ajustada al modelo de Fick para *E. globulus*
 Fuente: Elaboración propia

Los valores de los coeficientes de difusión normalizados por los radios de partícula de cada especie se observan en la tabla 14, los cuales se encontraron en el orden de 10^{-3} . Sólo en los casos para la especie *E. nitens* a 60°C y la especie *E. globulus* a 53°C y 60°C se alcanzaron valores de r^2 mayores a 0,82. Los otros ajustes obtenidos proporcionaron coeficiente de determinación bajos ($r^2 < 0,6$), lo cual condujo a la búsqueda de otro modelo que ajustara con mayor exactitud a los datos experimentales. Esto se debió al hecho que el modelo sólo presentó un ajuste adecuado desde los 75 min de extracción, donde la velocidad de extracción es más lenta (segunda etapa de difusión) para luego llegar a la zona de equilibrio. No obstante, la primera etapa dominada por el proceso de lavado o washing (en inglés) no quedó explicada por el modelo de Fick tanto para *E. nitens* como *E. globulus*. El mejor ajuste para *E. nitens* se dió para una temperatura de 53°C, mientras que para *E. globulus* se encontró para 46°C.

Comparando las desviaciones porcentuales absolutas promedio (MAPD's), se tiene que los modelos obtenidos para *E. globulus* mostraron un ajuste con menor error predictivo que los modelos para *E. nitens*. Los coeficientes de difusión efectivo (D_{eff}) se encontraron en el orden esperado para una extracción de compuestos extraídos de materiales lignocelulósicos (Wright, 2015), a pesar de que no se observó una correlación con la temperatura en los dos casos estudiados. A pesar de que los ajustes no proporcionaron coeficientes de determinación altos, y a su vez, valores de MAPD's bajos; la discrepancia en los coeficientes de difusión entre ambas especies puede ser debida a la diferencia de porosidad que podrían haber tenido las cortezas, debido a su distinto tamaño de poros (ver sección 6.1.1). Simeonov et al. (1999) obtuvieron coeficientes de difusión distintos entre dos tipos de materiales lignocelulósicos con una variación de porosidad entre ambas especies de 0,12, obteniendo una variación en el coeficiente de difusión de 4,2 m^2/s . Para estudios futuros se recomienda la medición de la porosidad antes y después del proceso extractivo para ambas especies.

Tabla 14: Ajuste y parámetros del modelo de la ley de Fick para la cinética de extracción

Especie	Temperatura (°C)	MAPD (%)	D_{eff}/R^2 (m ² /min)	R ² ajuste cálculo de coef. difusión
<i>E. nitens</i>	30	25,2	2,02E-10	0,35
	53	17,0	1,97E-10	0,82
	60	22,0	1,55E-10	0,50
<i>E. globulus</i>	30	24,3	8,79E-11	0,58
	46	14,7	1,40E-10	0,92
	60	19,4	1,80E-10	0,86

Fuente: Elaboración propia

6.3.1.2 Modelo M2: Modelo de Fick con balance en el solvente

El balance de masa del solvente mejora la solución analítica de la ley de Fick (modelo M1). Es comparable con el modelo anterior debido a que ambos requieren dos parámetros de modelación. En este modelo los parámetros son calculados por medio de la aproximación de Crank-Nicolson de diferencias finitas de segundo orden. Se utilizó un diámetro de partícula de 0,386 y 0,362 mm y densidad de corteza molida de 242 kg/m³ y 267 kg/m³ para *E. nitens* y *E. globulus*, respectivamente.

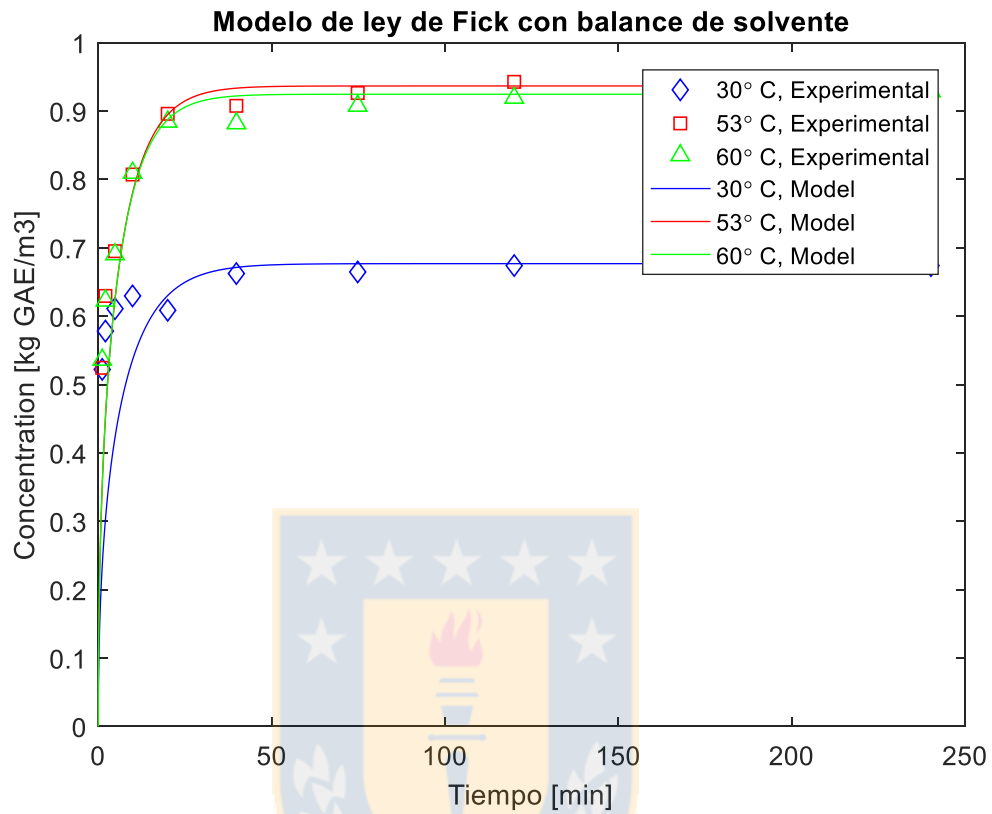


Figura 21: Cinética de extracción ajustada al modelo de Fick con balance de solvente para *E. nitens*

Fuente: Elaboración propia

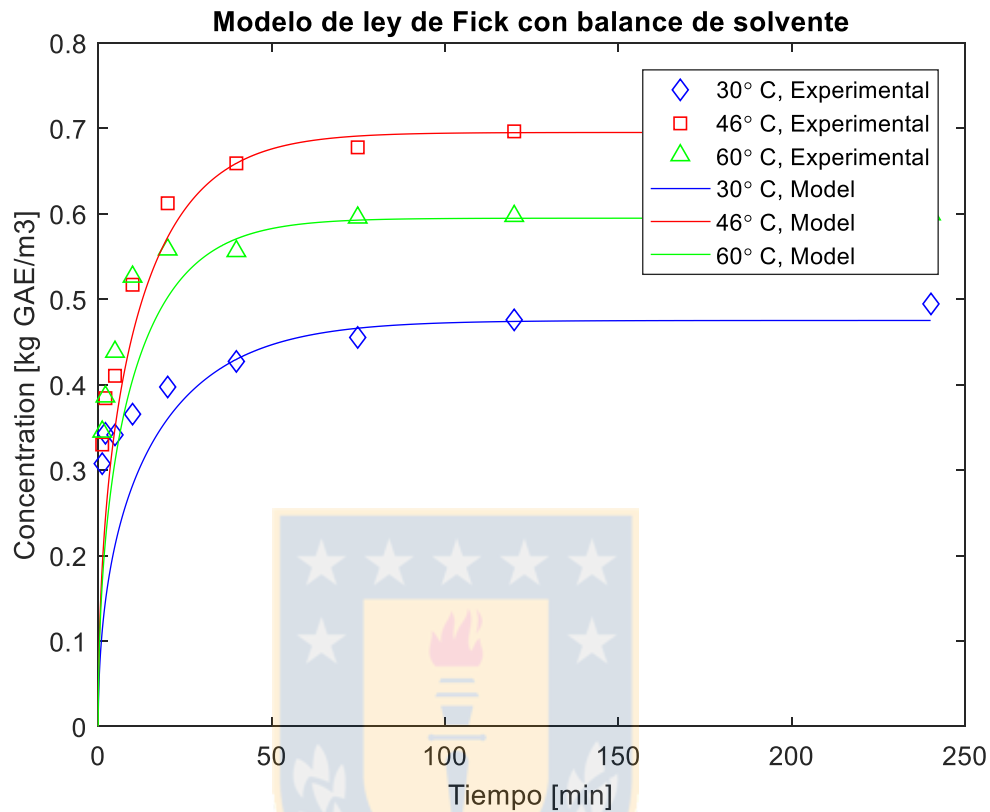


Figura 22: Cinética de extracción ajustada al modelo de Fick con balance de solvente para *E. globulus*

Fuente: Elaboración propia

Los coeficientes de difusión efectivos son presentados en la tabla 15. Los valores obtenidos para *E. nitens* a temperaturas de 53°C y 60°C fueron mayores que el obtenido a 30°C, indicando que la difusión ocurre más rápidamente a temperaturas altas. Por otro lado, para la especie *E. globulus*, el mayor coeficiente de difusión fue obtenido temperaturas de 46°C y 60°C, indicando que estas condiciones alcanzaron una tasa de velocidad mayor.

En la figura 21 se observa que los modelos para *E. nitens* subestiman los valores experimentales de la etapa de lavado, ajustándose de manera adecuada en la etapa de difusión y en la zona de equilibrio para las tres temperaturas estudiadas. Para *E. globulus*

(figura 22), se observó un comportamiento similar, lo cual, incitó a la búsqueda de otro modelo que se adaptara en la zona de lavado.

El error absoluto medio (MAPD) de los modelos es más bajo en los obtenidos para *E. nitens* que para los de *E. globulus*, por lo que la variabilidad de los datos experimentales estuvo mejor explicada en los modelos para *E. nitens*.

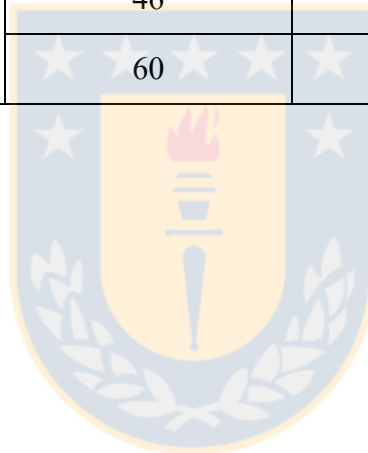
En comparación con el modelo anterior, estos ajustes resultaron en menores MAPDs para todas las condiciones (ver tabla 16), indicando que añadir el balance de solvente al modelo mejora significativamente el ajuste de los datos experimentales.

Wright (2015) añadió el balance de masa del solvente al modelo de la ley de Fick, obteniendo valores de MAPD significativamente menores, y en algunos casos disminuyendo los valores de MAPD en un 50% con respecto al modelo de Fick. Tsibranska, Tylkowski, Kochanov, and Alipieva (2011) utilizaron el modelo de la ley de Fick con balance de masa del solvente para modelar la cinética de polifenoles de las especies *Sideritis*, obteniendo un valor del coeficiente de difusión efectivo de $9,0 \times 10^{-11}$ m²/min, orden de magnitud cercano al obtenido en este estudio utilizando el mismo modelo.

Tabla 15: Ajuste y parámetros del modelo de la ley de Fick con balance de solvente para la cinética de extracción

Especie	Temperatura (°C)	MAPD (%)	D_{eff}/R^2 (m²/min)
<i>E. nitens</i>	30	18,0	4,02E-10
	53	9,64	4,87E-10
	60	9,81	5,10E-10
<i>E. globulus</i>	30	19,3	1,52E-10
	46	10,5	2,05E-10
	60	14,5	2,21E-10

Fuente: Elaboración propia



6.3.1.3 Modelo M3: Modelo de Fick extendido para dos fases de extracción

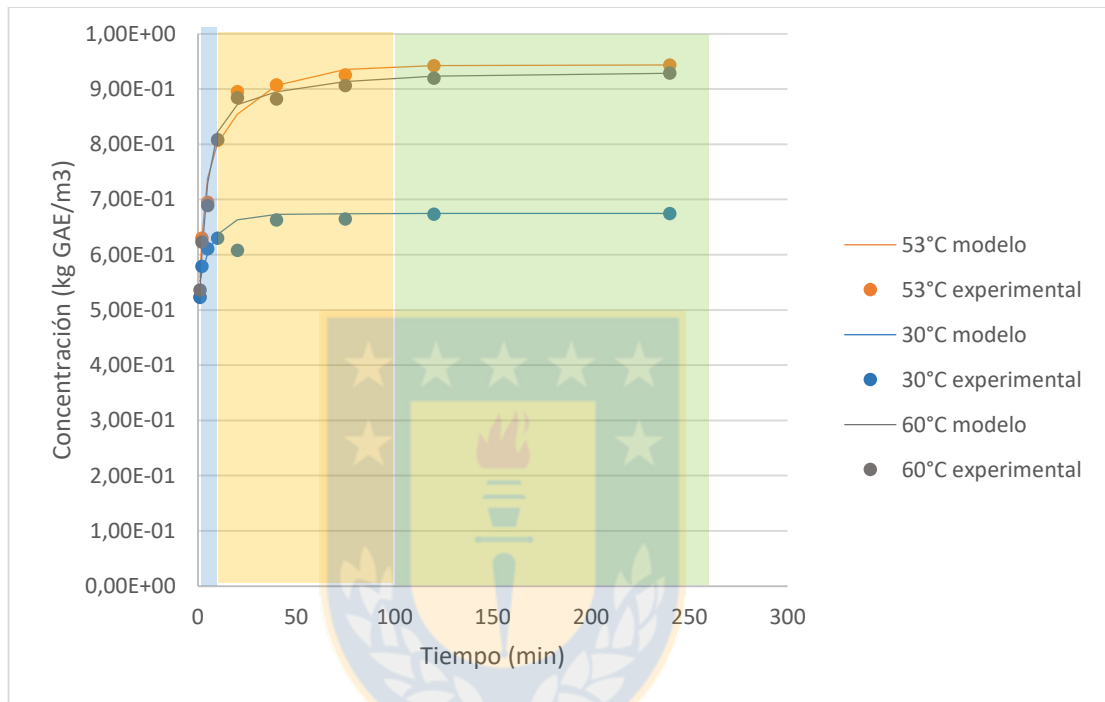


Figura 23: Cinética de extracción ajustada al modelo de Fick de dos fases para *E. nitens*

Fuente: Elaboración propia

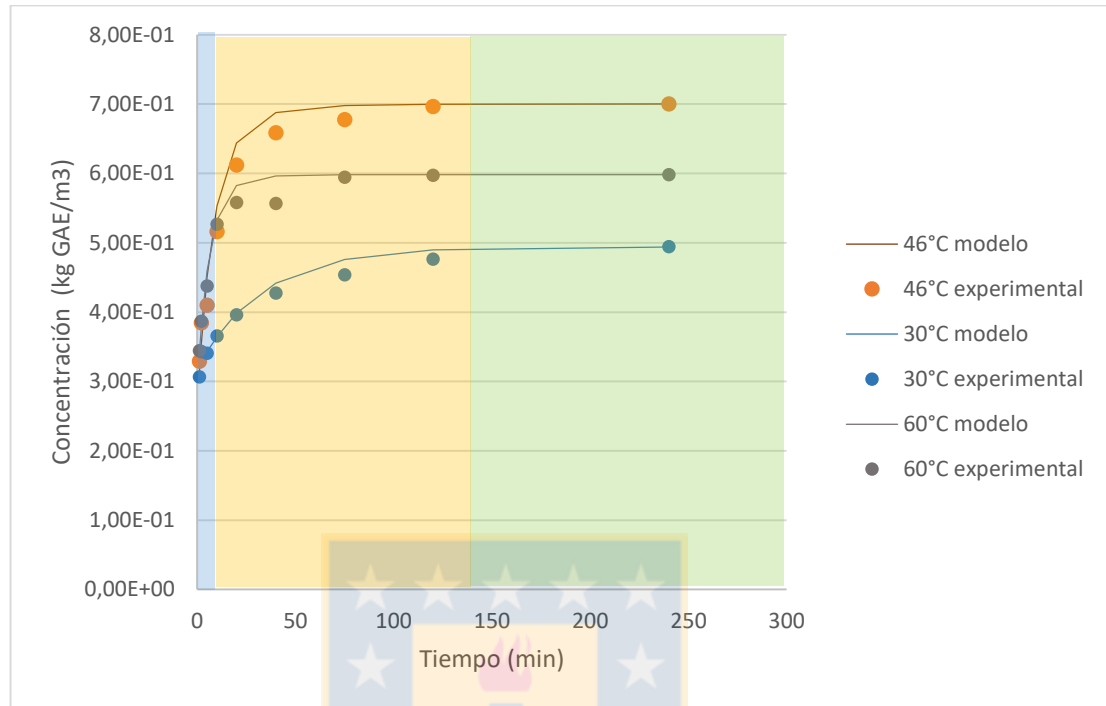


Figura 24: Cinética de extracción ajustada al modelo de Fick de dos fases para *E. globulus*

Fuente: Elaboración propia

Tabla 16: Ajuste y parámetros del modelo de la ley de Fick de dos fases para la cinética de extracción

Especie	Temperatura (°C)	MAPD (%)	D_{eff1}/R^2 (m²/min)	D_{eff2}/R^2 (m²/min)
<i>E. nitens</i>	30	4,35	1,94E-10	1,20E-11
	53	5,33	2,21E-10	1,67E-11
	60	4,74	2,04E-10	3,05E-11
<i>E. globulus</i>	30	3,78	6,69E-10	9,92E-12
	46	6,32	7,40E-10	1,57E-11
	60	3,12	7,64E-10	1,84E-11

Fuente: Elaboración propia

Anteriormente se ha modelado la extracción como si fuese una sola etapa de difusión, a diferencia del modelo utilizado en esta sección, el cual se basa en dos procesos difusivos, uno de rápida difusión (lavado) y otro de difusión lenta. Las figuras 23 y 24 representan la modelación de la especie *E. nitens* y *E. globulus* respectivamente. Para ambos casos, puede visualizarse el desarrollo de las etapas del proceso extractivo, representado por la disminución de la pendiente de las curvas de extracción, fenómeno que fue predicho por el modelo M3 de una forma eficiente, lo que es comprobado por los bajos valores del porcentaje de error obtenidos (ver tabla 16). Lo anterior proporciona una fuerte evidencia que la extracción de corteza es un proceso típico de la extracción de materiales lignocelulósicos (Tao, Zhang, & Sun, 2014) en donde participan tres etapas extractivas, las cuales son representadas en ambas figuras mediante recuadros de colores: una etapa inicial de difusión rápida o lavado (en azul), seguido por una etapa de difusión lenta (anaranjado) y finalmente, el equilibrio (en verde), etapa en la cual, se genera un flujo neto nulo de fenoles en el sistema, ligado al equilibrio de adsorción presente en la interfase sólido/líquido. Lo anterior, genera un gradiente de concentración igual a cero en todas las fases: en la escala molecular, aún existen moléculas de soluto movilizándose, pero en escala macroscópica, no existen cambios de concentración. Se observa que para la especie *E. nitens*, los datos experimentales fueron ajustados eficientemente para ambas etapas de extracción, no así para la especie *E. globulus*, para la cual se observó que los datos fueron ajustados correctamente solo para los puntos iniciales (lavado) y puntos finales (equilibrio), mientras que para la etapa de difusión lenta el modelo no se ajustó correctamente.

Para las diferentes temperaturas, los ajustes proporcionaron un error absoluto medio menor al 6% para ambas especies (tabla 16). Específicamente, para *E. nitens* se obtuvo un MAPD menor que 5,4% para 53°C y 60°C. En cuanto a *E. globulus* se obtuvo un MAPD menor al 6,4% para 46°C y 60°C.

Los coeficientes de difusión para ambas etapas (rápida y lenta) son presentados en la tabla 16, como D_{eff1} y D_{eff2} respectivamente. De la tabla se puede observar que los ajustes obtuvieron coeficientes de difusión efectivos mayores para la primera etapa de difusión (lavado) que para la etapa de difusión lenta. Los altos valores de D_{eff1} corresponden a la rápida transferencia de masa inicial del soluto hacia la superficie externa debido al daño mecánico de la superficie de la partícula durante la molienda y el simple efecto de lavado (Tao et al., 2014). Wright (2015) reportó valores de MAPD menores al 3% utilizando este modelo para la extracción de compuestos fenólicos desde la corteza de la especie *Pinus contorta* (*P. contorta*). Más aún, realizó modificaciones a este modelo que predicen con mayor exactitud los datos experimentales, asumiendo que la concentración de fenoles en la fase líquida es cero a tiempo cero. Esto no es necesariamente cierto, debido a que una cantidad considerable de fenoles son disueltos instantáneamente en el líquido a tiempo cero (proceso de lavado a tiempo cero).

6.3.1.4 Modelo M4: Modelo de ley de velocidad de 2° orden

El modelo de ley de velocidad asume una cinética de extracción de segundo orden, la concentración en equilibrio y la constante de velocidad son encontradas por linealización del modelo. Sin embargo, como se dijo en la sección 4.4.4, este modelo difiere de los demás ya que no es derivado con fundamentos teóricos, sólo es una adaptación. Por tanto, este modelo no es escalable a un proceso industrial.

Como se observa en las figuras 25 y 26, tanto para *E. nitens* y *E. globulus* se obtienen ajustes con mucha exactitud en sus predicciones, a su vez, los MAPD's (tabla 17) fueron relativamente bajos, especialmente para la especie *E. nitens*.

Para ambas especies a tiempos menores que 10 min, el modelo subestima las concentraciones con un error considerable que ha medida que pasa el tiempo este error disminuye. Por tanto, a mayores temperaturas el modelo predice con mayor exactitud los datos experimentales para ambas especies.

El r^2 obtenido de la regresión lineal fue mayor a 0,98 en todos los ensayos experimentales, el cual es similar al obtenido por Lazar et al. (2016), para la cinética de extracción de corteza de *Picea abies* en etanol/agua. Diferentes autores han reportado ajustes con r^2 mayores a 0,957 usando este modelo para la extracción de compuestos antioxidantes provenientes de plantas (Pan, Qu, Ma, Atungulu, & McHugh, 2012; Qu et al., 2010; Rakotondramasy-Rabesiaka et al., 2009).

Goula (2013) afirmó que el mejor ajuste se obtiene cuando se aplica una cinética de orden dos. Existen modificaciones a este modelo en la literatura, las cuales no se probaron en este trabajo debido a su carácter empírico.

Tabla 17: Ajuste y parámetros del modelo de ley de velocidad para la cinética de extracción

Especie	Temperatura (°C)	MAPD (%)	k (m³/min*kg GAE)
<i>E. nitens</i>	30	8,64	1,06
	53	6,19	1,96
	60	5,44	2,08
<i>E. globulus</i>	30	18,1	2,88
	46	10,9	3,74
	60	6,70	3,91

Fuente: Elaboración propia

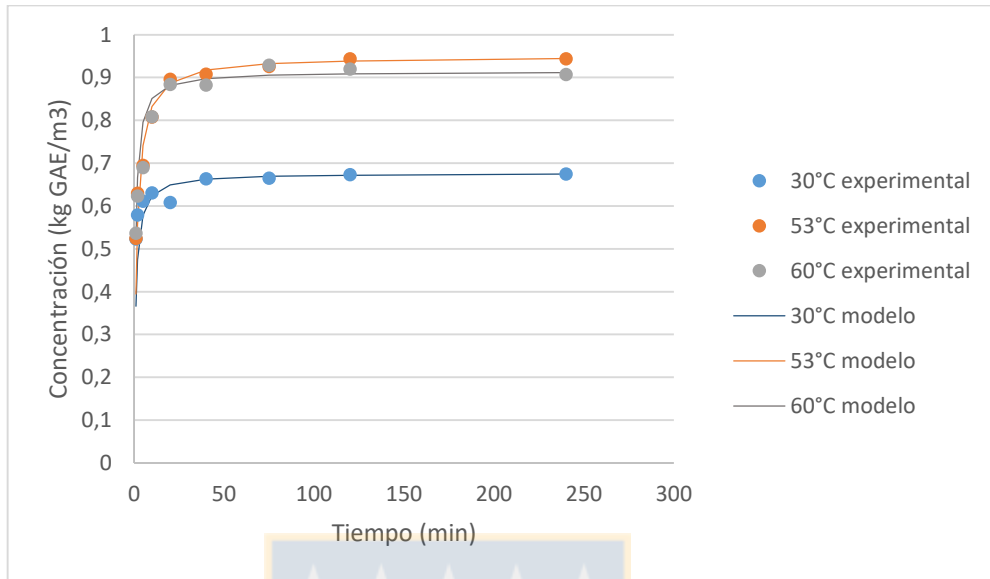


Figura 25: Ajuste del modelo de ley de velocidad para la cinética de extracción en *E. nitens*

Fuente: Elaboración propia

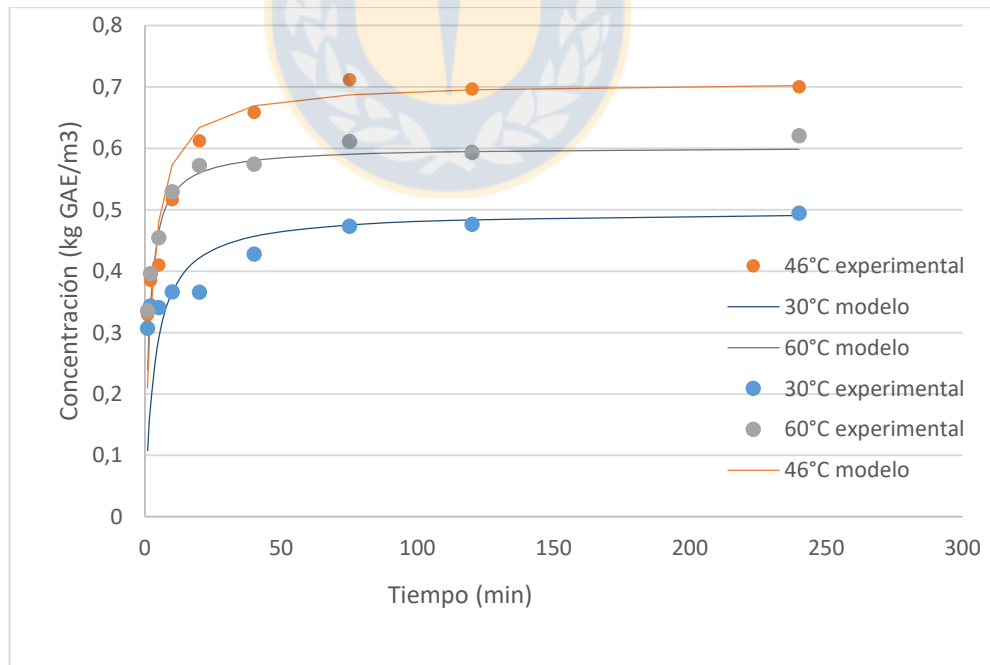


Figura 26: Ajuste del modelo de ley de velocidad para la cinética de extracción en *E. globulus*

Fuente: Elaboración propia

6.3.1.5 Comparación de modelos y constantes cinéticas

Un resumen de los ajustes obtenidos de los modelos de esta sección se puede observar en la tabla 18, la cual muestra que tanto para *E. nitens* como *E. globulus*, el modelo que mejor representó la cinética de extracción de compuestos fenólicos fue el modelo de Fick extendido a dos fases de extracción (M3), el cual, modeló la cinética de extracción como tres etapas extractivas en serie: una primera etapa dominada por una difusión rápida, llamada lavado (o washing en inglés) a los primeros minutos de la extracción, seguida por una etapa de difusión lenta que finalmente llega a una etapa final, representada por una concentración de equilibrio.

En cuanto al modelo de ley de velocidad (M4), este también presentó pequeños MAPDs en comparación con los modelos M1 y M2 regidos por la ley de Fick para ambas especies, obteniendo menores errores para la especie *E. globulus* que la especie *E. nitens*. A pesar de los buenos ajustes, se recomienda la utilización de estos modelos bajo las mismas condiciones de experimentación de este trabajo y no es recomendable para procesos de escalamiento debido al carácter empírico del modelo.

El modelo M2, al integrar el balance de masa del solvente, mostró una mejora en el ajuste y explicó una mayor variabilidad de los valores experimentales que el modelo M1, el cual es una simplificación estricta del modelo difusivo de Fick. Para *E. nitens* se encontró un mejor ajuste que para *E. globulus* para todas las temperaturas en estudio.

Por último, el modelo M1 obtuvo el peor ajuste y explicó en menor medida la variabilidad de los datos que los demás modelos para ambas especies. Wright (2015) investigó la cinética de extracción de corteza de *P. contorta* con 1% p/p NaOH y descubrió que la mejor modelación se obtuvo con el modelo de Fick extendido a dos fases extractivas (M3), con valores de MAPD menores a 2,89%

Tabla 18: Resumen de MAPD's de los modelos para *E. nitens* y *E. globulus* a las diferentes temperaturas

Modelos	Parámetros	MAPD (%)					
		<i>E. nitens</i>			<i>E. globulus</i>		
		30°C	53°C	60°C	30°C	46°C	60°C
Fick (M1)	$c_{\infty}, D_{\text{eff}}$	25,2	17,0	22,0	24,3	14,7	19,4
Fick con balance de solvente (M2)	C_0, D_{eff}	18,0	9,64	9,81	19,3	10,5	14,5
Fick extendido a dos fases (M3)	$c_{\infty}, D_{\text{eff}1}, D_{\text{eff}2}, f_1, f_2$	4,35	5,33	4,74	3,78	6,32	3,12
Ley de velocidad 2° orden (M4)	c_{∞}, k	8,64	6,19	5,44	18,1	10,9	6,70

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 19 se muestra un resumen de los coeficientes de difusión efectivos obtenidos de los distintos modelos estudiados.

Se observa que tanto para el modelo de Fick (M1) y el modelo de Fick con dos fases (M3), los coeficientes de difusión efectivos a las tres temperaturas fueron del mismo orden de magnitud que los coeficientes de difusión efectivos obtenidos por Wright (2015) para *P. contorta* para extracción con 1% p/p NaOH a temperaturas de 20°C y 60°C para ambas especies estudiadas. En cuanto al modelo de Fick con balance de solvente (M2), se encontró un valor muy similar a 60°C para ambas especies comparado con el obtenido por Simeonov et al. (1999) para la corteza de la especie *Quercus frainetto* utilizando agua como solvente. El modelo de ley de velocidad (M4), no es comparable con otros autores

debido a que es sólo un ajuste empírico y por tanto, su parámetro no posee significado físico, como se explicó anteriormente.

Tabla 19: Resumen de constantes cinéticas para *E. nitens* y *E. globulus* a las diferentes temperaturas

Modelos	Parámetro	<i>E. nitens</i>			<i>E. globulus</i>		
		30°C	53°C	60°C	30°C	46°C	60°C
Fick (M1)	D_{eff}/R^2 (m ² /min)	2,02E- -10	1,97E- -10	1,55E- 10	8,79E- 11	1,40E- 10	1,80E- 10
Fick con balance de solvente (M2)	D_{eff} (min ⁻¹)	4,02E- 10	4,87E- 10	5,10E- 10	1,52E- 10	2,05E- 10	2,21E- 10
Fick extendido a dos fases (M3)	D_{eff1} (m ² /min)	1,94E- 10	2,21E- 10	2,04E- 10	6,69E- 10	7,40E- 10	7,64E- 10
	D_{eff2} (m ² /min)	1,20E- 11	1,67E- 11	3,05E- 11	9,92E- 12	1,57E- 11	1,84E- 11
Ley de velocidad 2° orden (M4)	k (m ³ /kg GAE*min)	1,06	1,96	2,08	2,88	3,74	3,91


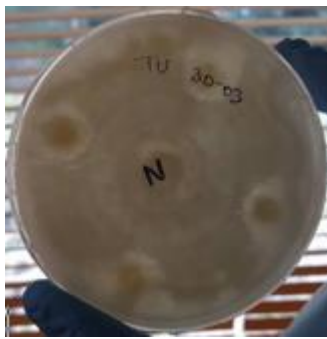

Fuente: Elaboración propia








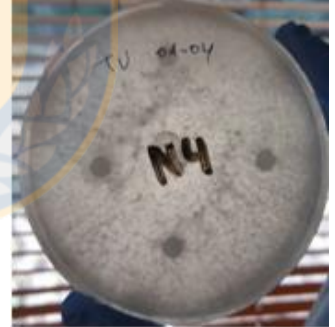

6.4 Ensayos antifúngicos

6.4.1 Ensayo de concentración mínima inhibitoria

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (IMC), necesaria para inhibir el crecimiento de distintos tipos de hongos: *T. versicolor*, *P. ostreatus* y *G. australe*. Se utilizó el método del halo de inhibición, entregando un resultando visual de la inhibición de las especies a causa del extracto utilizado. En las tablas 20, 21 y 22 se presentan los efectos del extracto hidrofílico sobre las placas inoculadas con las especies fúngicas: *T. versicolor*, *P. ostreatus* y *G. australe* respectivamente. En cada fotografía se presentó una sola réplica de cada muestra.





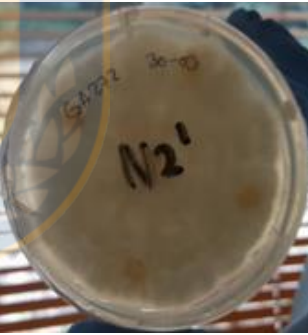




Tabla 20: Efecto causado por el extracto hidrofílico de la corteza de distintos árboles sobre la especie fúngica *T. versicolor*

Concentración de extracto ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Efecto del extracto hidrofílico sobre la especie <i>T. versicolor</i>		
	Extracto de <i>E. globulus</i>	Extracto de <i>E. nitens</i>	Extracto de <i>P. radiata</i>
15			

7,5			
3,75			
1,875			

Fuente: Elaboración propia

Tabla 21: Efecto causado por el extracto hidrofílico de la corteza de distintos árboles sobre la especie fúngica *G. australe*

Concentración de extracto (µg/µL)	Efecto del extracto hidrofílico sobre la especie <i>G. australe</i>		
	Extracto de <i>E. globulus</i>	Extracto de <i>E. nitens</i>	Extracto de <i>P. radiata</i>
15			
7,5			
3,75			

Fuente: Elaboración propia

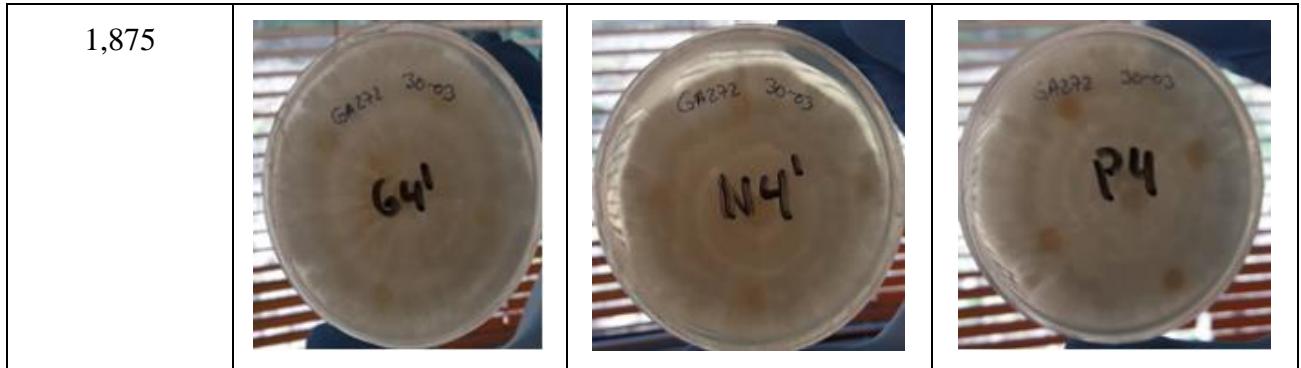

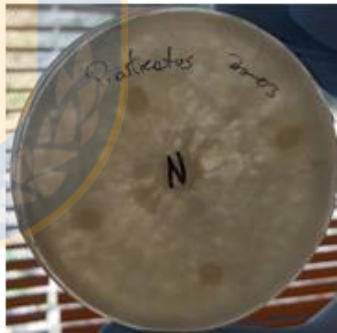


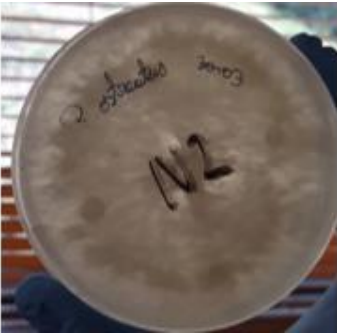



Tabla 22: Efecto causado por el extracto hidrofílico de la corteza de distintos árboles sobre la especie fúngica *P. ostreatus*

Concentración de extracto ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Efecto del extracto hidrofílico sobre la especie <i>P. ostreatus</i>		
	Extracto de <i>E. globulus</i>	Extracto de <i>E. nitens</i>	Extracto de <i>P. radiata</i>
15			
7,5			



Fuente: Elaboración propia

Por un lado, se observa en la tabla 20 que los extractos hidrofílicos de *E. globulus*, *E. nitens* y *P. radiata* mostraron la capacidad de inhibir a la especie fúngica *T. versicolor*. Para *E. globulus* y *P. radiata*, los extractos inhibieron el crecimiento del hongo a todas las concentraciones en estudio. En cuanto a la especie *E. nitens* se presentaron halos de inhibición sólo a la mayor concentración de extracto (15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

A mayor concentración de extracto se generaron halos de inhibición de mayor diámetro, siendo estos bien definidos y libres de contaminación de la especie fúngica por ambos lados de la placa. Las concentraciones mínimas inhibitorias fueron: 7,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 1,875 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en *E. globulus*, *E. nitens* y *P. radiata* respectivamente. Como se mencionó en la sección 4.5.3, este ensayo representa una evaluación preliminar para la medición, primeramente, de la factibilidad antifúngica, y en segundo lugar, del poder antifúngico como una aproximación inicial. Análisis superiores son realizados en la sección siguiente de degradación de madera.

Por otro lado, de las tablas 21 y 22 se puede observar que no existió inhibición de las especies fúngicas *G. australe* y *P. ostreatus* a ninguna concentración de los tres tipos de extracto estudiados. En la literatura, se ha reportado que no existe inhibición de las especies *G. australe* y *P. ostreatus* empleando extractos hidrofílicos. Cheng, Lin, Gu, and Chang (2011) utilizaron extracto lipofílico de distintos tejidos de las especies *Cryptomeria japonica* y *Cunninghamia konishii* obteniendo resultados exitosos de inhibición solo con el extracto obtenido del duramen de ambas especies, entregando bajos índices de inhibición para extractos obtenidos de la corteza y hojas de estas especies. Resultado similar fue el obtenido para extracto de hojas proveniente de las especies *Casearia sylvestris* and *Casearia decandra* (Bento, Torres, Fialho, & Bononi, 2016). Geromini et al. (2015) reportaron que extractos alcohólicos y acuosos obtenidos desde las hojas de *Lippia alba* no poseyeron actividad antifúngica contra la especie *P. ostreatus*, sin embargo, extractos lipofílicos (aceites esenciales) obtuvieron un efecto fungicida a concentraciones mayores a 1,0 mL/L en un medio de cultivo de extracto de malta.

Los resultados anteriores indican que los extractos de eucaliptus y pino poseen propiedades antifúngicas potenciales en hongos de rápido crecimiento (*T. versicolor*). Lomelí-Ramírez, Dávila-Soto, Silva-Guzmán, Ochoa-Ruíz, and García-Enriquez (2016) encontraron valores de IMC de 1,58, 1,72, 1,24 y 1,94 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para extractos en etanol/agua de la corteza de *Pinus strobus*, *Pinus douglasiana*, *Pinus caribaea* and *Pinus leiophylla* donde la especie *T. versicolor* fue inhibida. Esto es concordante con los valores de IMC obtenidos para la especie *P. radiata*. Para extractos de té verde y té negro en agua, los valores de IMC obtenidos para 13 especies de hongos fueron encontrados en el rango de 1-50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Erolls Cheruiyot Sigei, 2015), siendo del mismo orden de magnitud que los valores de IMC obtenidos para las especies en este estudio.

Los diámetros de los halos de inhibición se pueden observar en la tabla 23 para las tres especies de corteza de árboles.

Tabla 23: Diámetros de halos de inhibición para la especie *T. versicolor*

Concentración de extracto en la placa (µg/µL)	Diámetro de inhibición (mm)		
	<i>E. globulus</i>	<i>E. nitens</i>	<i>P. radiata</i>
15	22,2 ± 3,11	11,1 ± 1,37	19,2 ± 2,63
7,5	21,0 ± 1,41	ND	17,5 ± 3,53
3,75	ND	ND	14,8 ± 0,282
1,875	ND	ND	14,0 ± 0,755

ND: No definido

Fuente: Elaboración propia

En la sección posterior, se desarrolló el ensayo por pérdida de masa con la especie *T. versicolor* utilizando la mayor concentración de inhibición (15 µg/µL).

6.4.2 Ensayo de degradación de madera por medio de hongos de pudrición

Se observa en las tablas 25 y 26 las distintas muestras de madera de pino que fueron inoculadas con el hongo *T. versicolor* y que fueron retiradas y pesadas a un mes y dos meses, respectivamente. Las muestras fueron tratadas con el extracto hidrofílico obtenido en este trabajo a las condiciones mostradas en la tabla 24, las cuales fueron obtenidas con las condiciones óptimas del diseño experimental (ver sección 6.2) para *E. nitens*, *E. globulus*. El extracto de pino fue suministrado por la unidad de desarrollo tecnológico (UDT) de la Universidad de Concepción. Se realizaron 3 tipos de blanco: el blanco negativo, tratando al hongo inoculado con el solvente en que se diluyeron los tres tipos de

extracto mencionados anteriormente (metanol), el blanco neutro, en el cual el hongo no fue tratado con ningún químico ni extracto y por último un blanco positivo, que fue ketoconazol, conocido como un potente antifúngico.


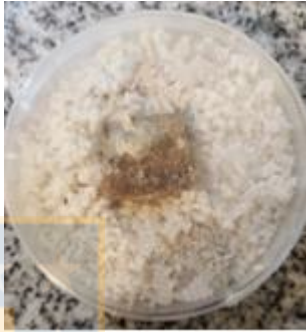







Tabla 24: Condiciones del extracto utilizado en el ensayo de degradación de madera de pino

Extracto	Rendimiento (%)	Fenoles totales (mg GAE/g corteza seca)	Capacidad antioxidante (mg AAE/g corteza seca)
<i>E. nitens</i>	15,1 ± 1,17	42,8 ± 7,03	41,5 ± 5,21
<i>E. globulus</i>	9,80 ± 2,72	34,7 ± 5,10	32,5 ± 4,66

Fuente: Elaboración propia

Para las muestras correspondientes a un mes de incubación (tabla 25), las placas con el extracto de *E. nitens* no mostraron un crecimiento del hongo, lo que indicaría un potencial antifúngico del extracto. En las placas con extracto de *E. globulus* se observó un débil crecimiento del hongo en la superficie de la madera. En las placas con extracto de pino y con los controles negativos, el hongo creció en la madera rodeando las muestras de madera por completo. En cuanto al blanco positivo, este mostró una inhibición del hongo sin diferencias significativas con los efectos obtenidos por los extractos de ambas especies de eucaliptus ($p > 0,05$).

Tabla 25: Efecto causado por el extracto hidrofílico de la corteza de distintos árboles sobre la especie fúngica *T. versicolor* con tiempo de incubación de 30 días

Muestra	Fotografías de las placas incubadas		
	Replica 1	Replica 2	Replica 3
Extracto de <i>E. nitens</i>			
Extracto de <i>E. globulus</i>			
Extracto de <i>P. radiata</i>			

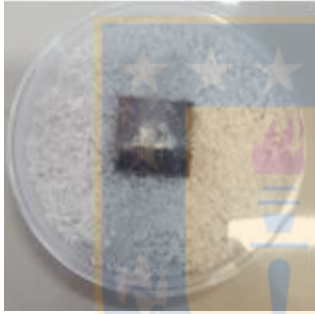

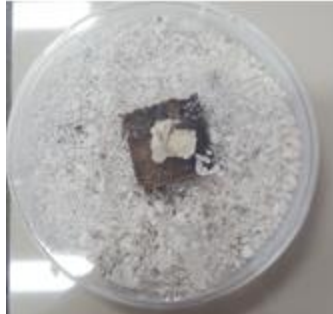


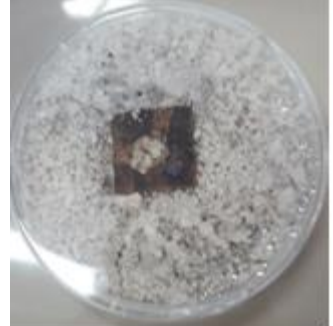
<p>Blanco negativo (metanol)</p>			
<p>Blanco positivo (antifúngico forestal)</p>			
<p>Blanco neutro (control, sin tratamiento)</p>	<p>No se realizó este ensayo para este tiempo</p>		

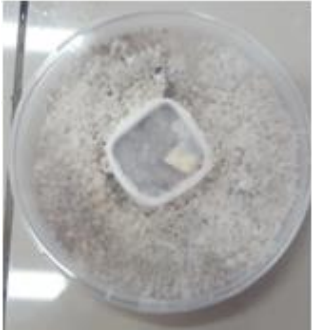


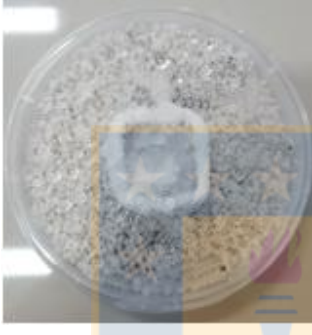







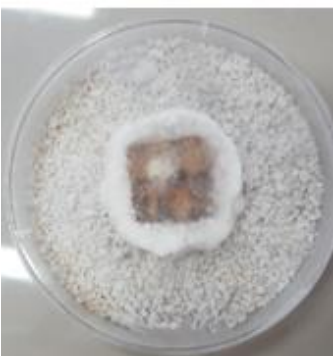
Fuente: Elaboración propia

En la tabla 26 se presentan las muestras que estuvieron dos meses en incubación. Las muestras incubadas con extracto *E.nitens* y *E. globulus* no presentaron un crecimiento del hongo mostrando que los extractos actuaron como inhibidores. Al igual que en el primer mes, las especies fúngicas no mostraron inhibición con el extracto de *P. radiata*, y a su vez, el área atacada por el hongo fue mayor que a los 30 días. Los controles negativos presentaron un aumento del crecimiento del hongo respecto a los 30 días, que se vio reflejado en un mayor volumen de éste. En el caso de las placas con blanco positivo, estas no evidenciaron un crecimiento del hongo. Por último, en los blancos neutros (madera de

pino sin tratamiento) se observó que un gran volumen de la madera fue atacada por la especie fúngica, efecto similar al obtenido para los blancos negativos.

Tabla 26: Efecto causado por el extracto hidrofílico de la corteza de distintos árboles sobre la especie fúngica *T. versicolor* con tiempo de incubación de 30 días

Muestra	Fotografías de las placas incubadas		
	Replica 1	Replica 2	Replica 3
Extracto de <i>E. nitens</i>			
Extracto de <i>E. globulus</i>			

<p>Extracto de <i>P. radiata</i></p>			
<p>Blanco negativo (metanol)</p>			
<p>Blanco positivo (antifúngico forestal)</p>			
<p>Blanco neutro (control, sin tratamiento)</p>			

Fuente: Elaboración propia

En la figura 27 se presentan los porcentajes de pérdida de peso a causa de la pudrición de la madera generada por el hongo *T. versicolor* para los tiempos de incubación en estudio.

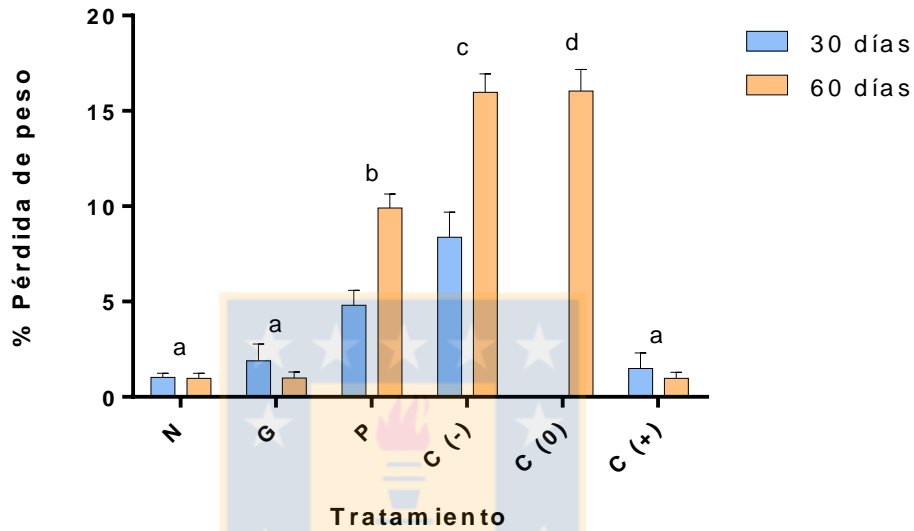


Figura 27: Pérdida de pesos de las muestras después de la exposición del hongo para 30 y 60 días. N: Trat. extracto de *E. nitens*; G: Trat. extracto de *E. globulus*; P: Trat. extracto de *P.radiata*; C(-): Control negativo, C(0): Control neutro; C(+): Control positivo

Fuente: Elaboración propia

Se observa que entre el tratamiento con extracto de *E. nitens*, *E. globulus* y el tratamiento con ketoconazol (control positivo) no se obtuvieron diferencias significativas (nivel de confianza del 95%) en la pérdida de peso a los 2 meses, siendo el porcentaje de pérdida de peso de $0,981 \pm 0,257$ %. Por otra parte, los porcentajes de pérdida de masa de los tratamientos con extracto de *P. radiata* ($9,90 \pm 0,741$ %), con metanol (control negativo) ($15,9 \pm 0,970$ %) y el control neutro (sin tratamiento) ($16,0 \pm 1,14$ %), fueron distintos ($p < 0,05$) y mayores a los obtenidos por los extractos de ambas cortezas de eucaliptos, y por el ketoconazol.

Se observa también, que la actividad antifúngica, medida en pérdida de masa de la muestra de madera, no mostró una diferencia significativa entre las especies *E. nitens* y *E. globulus*. Si bien se ha reportado que la actividad antioxidante puede ser importante en el modo antifúngico de acción de compuestos fenólicos, se debe considerar que las diferencias en las capacidades antioxidantes de ambos extractos no fue demasiado elevada, y que por tanto, posiblemente la prueba de pérdida de masa no permitió cuantificar tal tendencia, debido a que este ensayo se ve influenciado por distintos factores adicionales: el método silvicultural mediante el cual fueron obtenidas las probetas de ensayo, la humedad de las probetas y los cortes realizados para obtenerlas (se ha reportado que si éste coincide con la dirección de la fibra o no, puede afectar a los resultados obtenidos); posibles grietas, manchas, nudos o alabeos de las probetas, entre otros (Zaid, 2004). Otra hipótesis es que cuando el hongo es sometido a estrés, responde controlando la producción de metabolitos secundarios, los cuales le imparten una ventaja de supervivencia. A su vez, algunos autores también han vinculado la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos a su actividad en la biosíntesis de metabolitos (Dambolena et al., 2010; de Freitas Araújo et al., 2012; Kalidindi et al., 2015). Sin embargo, esta relación no fue observada en este estudio.

Basado en lo anterior, el tratamiento con extracto de *E. nitens* y *E. globulus* fueron efectivos contra el ataque del hongo *T. versicolor* inhibiendo su crecimiento en la madera de pino y siendo comparable con el efecto que produce el ketoconazol (control positivo). En cuanto a comparación con la literatura, la mayoría de los ensayos de tratamiento de hongos están patentados. (S. F. Curling et al. (2002)) encontraron un porcentaje de pérdida de masa de 3-4 % a los 44 días y del 5-7% a los 90 días para un ensayo de degradación de madera para *T. versicolor* utilizando vermiculita como medio de cultivo e inoculando por feeder-strip. Estos porcentajes fueron mayores a los obtenidos para el tratamiento con extracto de *E. nitens* y *E. globulus* en el presente estudio.

7 Conclusiones

- Las extracciones de corteza de *E. globulus* y *E. nitens* presentaron condiciones óptimas similares, pero rendimientos y concentración de fenoles levemente mayores para la especie *E. nitens*, indicando una extracción mayor de compuestos fenólicos.
- La cinética de extracción de los compuestos fenólicos de la corteza de *E. nitens* y *E. globulus* fueron determinadas y modeladas a diferentes temperaturas. Para ambas especies las etapas gobernantes en el proceso de extracción fueron identificadas como un proceso de difusión rápida o lavado y un proceso de difusión lenta.
- El mejor ajuste de la cinética de extracción fue conseguido con el modelo de Fick extendido a dos fases extractivas obteniendo valores de MAPD menores al 6% para ambas especies de eucalipto. Tanto para *E. nitens* como *E. globulus*, la etapa gobernada por el proceso de lavado obtuvo coeficientes de difusión efectivos de mayor orden que la etapa gobernada por el proceso de difusión para las tres temperaturas en estudio.
- Los extractos de corteza de *E. nitens* y *E. globulus* mostraron inhibición del crecimiento de la especie fúngica *T. versicolor* para los ensayos de concentración mínima inhibitoria y pérdida de masa en madera pino. Para este último, los resultados visuales y cuantitativos fueron similares a los obtenidos para el tratamiento con el producto antifúngico comercial (ketoconazol).

8 Bibliografía

- Madera - Parte 1: Determinación del contenido de humedad, NCh 176/1.Of2003 C.F.R. (2003).
- An, S. M., Kim, H. J., Kim, J. E., & Boo, Y. C. (2008). Flavonoids, taxifolin and luteolin attenuate cellular melanogenesis despite increasing tyrosinase protein levels. *Phytother Res*, 22(9), 1200-1207. doi: 10.1002/ptr.2435
- ASTM. (2007). ASTM D1413-07e1, Standard Test Method for Wood Preservatives by Laboratory Soil-Block Cultures (Withdrawn 2016). West Conshohocken, PA.
- Back, E. L., Allen, L. H., & Technical Association of the Pulp and Paper Industry. (2000). *Pitch control, wood resin and deresination* (T. Press Ed.). Atlanta, GA.
- Bakalivanova, T., & Kaloyanov, D. N. (2012). Effect of taxifolin, rosemary and synthetic antioxidants treatment on the poultry meat lipid peroxidation. *65*, 161-168.
- Barrett, E. P., Joyner, L. G., & Halenda, P. P. (1951). The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *Journal of the American Chemical Society*, 73(1), 373-380. doi: 10.1021/ja01145a126
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, 45(4), 493-496.
- Bento, T. S., Torres, L. M. B., Fialho, M. B., & Bononi, V. L. R. (2016). Leaf extracts of *Casearia sylvestris* and *Casearia decandra* affect growth and production of ligninolytic enzymes in wood decay basidiomycetes. *Hoehnea*, 43, 575-581.
- Braga, F., Ayres-Saraiva, D., Gattass, C. R., & Capella, M. A. (2007). Oleanolic acid inhibits the activity of the multidrug resistance protein ABCC1 (MRP1) but not of the ABCB1 (P-glycoprotein): possible use in cancer chemotherapy. *Cancer Lett*, 248(1), 147-152. doi: 10.1016/j.canlet.2006.06.008
- Brusotti, G., Ngueyem, T. A., Biesuz, R., & Caccialanza, G. (2010). Optimum extraction process of polyphenols from *Bridelia grandis* stem bark using experimental design. *J Sep Sci*, 33(11), 1692-1697. doi: 10.1002/jssc.200900717
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 379-389. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00497-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00497-1)
- Crank, J. (1975). *The mathematics of diffusion, 2nd edition* (O. Oxford Ed. 2 ed.). Oxford, UK.
- Curling, S., Winandy, J. E., Clausen, C. A., & Preservation, I. R. G. o. W. (2000). *An Experimental Method to Simulate Incipient Decay of Wood by Basidiomycete Fungi*. Kona, Hawaii, USA: IRG Secretariat.
- Curling, S. F., Clausen, C. A., & Winandy, J. E. (2002). Experimental method to quantify progressive stages of decay of wood by basidiomycete fungi. *International*

Biodeterioration & Biodegradation, 49(1), 13-19. doi: [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(01\)00101-9](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(01)00101-9)

- Chan, C.-H., Yusoff, R., & Ngoh, G.-C. (2014). Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(6), 1169-1186. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2013.10.001>
- Cheng, S.-S., Lin, C.-Y., Gu, H.-J., & Chang, S.-T. (2011). Antifungal Activities and Chemical Composition of Wood and Leaf Essential Oils from *Cunninghamia konishii*. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 31(3), 204-217. doi: 10.1080/02773813.2010.515049
- Chiao Chih Hua, H. M. (2001). Analyzing experiments with correlated multiple responses. *Journal of Quality Technology*, 33(4), 451-465.
- Dambolena, J. S., Zunino, M. P., López, A. G., Rubinstein, H. R., Zygodlo, J. A., Mwangi, J. W., . . . Kariuki, S. T. (2010). Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(2), 410-414. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2009.08.005>
- de Freitas Araújo, M. G., Hilário, F., Vilegas, W., dos Santos, L. C., Brunetti, I. L., Sotomayor, C. E., & Bauab, T. M. (2012). Correlation among Antioxidant, Antimicrobial, Hemolytic, and Antiproliferative Properties of *Leiothrix spiralis* Leaves Extract. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 9260-9277. doi: 10.3390/ijms13079260
- Derkyi Nana, S. A., Sekyere, D., Darkwa Nicholas, A., & Boakye Nana, B. (2011). Modeling and Optimization of Polyphenol Extraction for Tannin-Formaldehyde Resin Synthesis *International Journal of Chemical Reactor Engineering* (Vol. 9).
- Domingues, R. M. A., Sousa, G. D. A., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., & Neto, C. P. (2010). *Eucalyptus globulus* biomass residues from pulping industry as a source of high value triterpenic compounds. *Industrial Crops and Products*, 31(1), 65-70. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.09.002>
- Domingues, R. M. A., Sousa, G. D. A., Silva, C. M., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., & Neto, C. P. (2011). High value triterpenic compounds from the outer barks of several *Eucalyptus* species cultivated in Brazil and in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 33(1), 158-164. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.006>
- Espinel-Ingroff, A., Arthington-Skaggs, B., Iqbal, N., Ellis, D., Pfaller, M. A., Messer, S., . . . Wang, A. (2007). Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B, and caspofungin. *J Clin Microbiol*, 45(6), 1811-1820. doi: 10.1128/jcm.00134-07
- FAO. (2017). Global data on forest plantations resources. Retrieved 17/05, 2017, from <http://www.fao.org/docrep/004/Y2316E/y2316e0b.htm>
- Feldman, D. (1985). Wood—chemistry, ultrastructure, reactions, by D. Fengel and G. Wegener, Walter de Gruyter, Berlin and New York, 1984, 613 *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition*, 23(11), 601-602. doi: 10.1002/pol.1985.130231112

- Fernandes, P., & Cabral, J. M. (2007). Phytosterols: applications and recovery methods. *Bioresour Technol*, 98(12), 2335-2350. doi: 10.1016/j.biortech.2006.10.006
- Franco, D., Pinelo, M., Sineiro, J., & Nunez, M. J. (2007). Processing of *Rosa rubiginosa*: extraction of oil and antioxidant substances. *Bioresour Technol*, 98(18), 3506-3512. doi: 10.1016/j.biortech.2006.11.012
- Geldres, E., Gerding, V., & Schlatter, J. E. (2006). Biomasa de *Eucalyptus nitens* de 4-7 años de edad en un rodal de la X Región, Chile. *Bosque (Valdivia)*, 27(3), 223-230. doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002006000300001>
- Geromini, K. V. N., Roratto, F. B., Ferreira, F. G., Camilotti, J., Vidigal, T. M. A., Valle, J. S., . . . Linde, G. A. (2015). Fungicidal effect of *Lippia alba* essential oil on a white-rot fungus. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 17(1), 29-38. doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-221X2015005000003>.
- Godoy, S., Roeckel, M., & Fernández, K. (2012). Influence of the structure and composition of the País grape proanthocyanidins on the inhibition of angiotensin I-converting enzyme (ACE). *Food Chemistry*, 134(1), 346-350. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.171>
- Goula, A. M. (2013). Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil – Kinetic modeling. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 492-498. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.10.009>
- Gutiérrez, C. (2016). *Caracterización química de extractos obtenidos a partir de la corteza de Eucalyptus globulus*. (Memoria de título), Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Heath Rushing, A. K., and James Wisnowski. (2013). *Design and Analysis of Experiments by Douglas Montgomery: A supplement for Using JMP* (S. Institute Ed. Supplement (23 de septiembre de 2013) ed.). Cary, North Carolina, USA.
- Hojnik, M., Škerget, M., & Knez, Ž. (2008). Extraction of lutein from Marigold flower petals – Experimental kinetics and modelling. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 2008-2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.11.017>
- Horiuchi, K., Shiota, S., Hatano, T., Yoshida, T., Kuroda, T., & Tsuchiya, T. (2007). Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biol Pharm Bull*, 30(6), 1147-1149.
- Hou, A. J., Liu, Y. Z., Yang, H., Lin, Z. W., & Sun, H. D. (2000). Hydrolyzable tannins and related polyphenols from *Eucalyptus globulus*. *J Asian Nat Prod Res*, 2(3), 205-212. doi: 10.1080/10286020008039912
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*, 53(6), 1841-1856. doi: 10.1021/jf030723c
- Huang, H.-J., Ramaswamy, S., Tschirner, U. W., & Ramarao, B. V. (2008). A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Separation and Purification Technology*, 62(1), 1-21. doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.12.011>

- INFOR. (2016). Chilean Forestry Sector 2016. Retrieved 12 Septiembre, 2017, from http://wef.infor.cl/sector_forestal/sectorforestal.php#/14
- Jerez, M., Selga, A., Sineiro, J., Torres, J. L., & Núñez, M. J. (2007). A comparison between bark extracts from *Pinus pinaster* and *Pinus radiata*: Antioxidant activity and procyanidin composition. *Food Chemistry*, *100*(2), 439-444. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.064>
- Jokić, S., Velić, D., Bilić, M., Bucić-Kojić, A., Planinić, M., & Tomas, S. (2010). Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *Czech Journal of Food Sciences*, *28*(3), 206-212.
- Jutakradsada, P., Iamamornphanth, W., Patikarnmonthon, N., & Kamwilaisak, K. (2017). Usage of *Eucalyptus globulus* bark as a raw material for natural antioxidant and fuel source. *Clean Technologies and Environmental Policy*, *19*(3), 907-915. doi: 10.1007/s10098-016-1276-y
- Kaiser, S., Verza, S. G., Moraes, R. C., Pittol, V., Peñaloza, E. M. C., Pavei, C., & Ortega, G. G. (2013). Extraction optimization of polyphenols, oxindole alkaloids and quinovic acid glycosides from cat's claw bark by Box–Behnken design. *Industrial Crops and Products*, *48*, 153-161. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.026>
- Kalidindi, N., Thimmaiah, N. V., Jagadeesh, N. V., Nandeeep, R., Swetha, S., & Kalidindi, B. (2015). Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. leaves. *Journal of Food and Drug Analysis*, *23*(4), 795-802. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2015.04.012>
- Kamm, B., Kamm, M., Schmidt, M., Hirth, T., & Schulze, M. (2008). Lignocellulose-based Chemical Products and Product Family Trees *Biorefineries-Industrial Processes and Products* (pp. 97-149): Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Ku, C. S., & Mun, S. P. (2008). Antioxidant properties of monomeric, oligomeric, and polymeric fractions in hot water extract from *Pinus radiata* bark. *Wood Science and Technology*, *42*(1), 47-60. doi: 10.1007/s00226-007-0150-9
- Kumar, N., Man, H., & Woo, H.-S. (2014). Biosorption of phenolic compounds from aqueous solutions using pine (*Pinus desinflora* Sieb) bark powder. *BioResources*, *9*(3), 5155-5174.
- Lazar, L., Talmaciu, A. I., Volf, I., & Popa, V. I. (2016). Kinetic modeling of the ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Picea abies* bark. *Ultrason Sonochem*, *32*, 191-197. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.03.009>
- Lee, S. B., Cha, K. H., Selenge, D., Solongo, A., & Nho, C. W. (2007). The chemopreventive effect of taxifolin is exerted through ARE-dependent gene regulation. *Biol Pharm Bull*, *30*(6), 1074-1079.
- Li, W., Li, N., Tang, Y., Li, B., Liu, L., Zhang, X., . . . Duan, J. A. (2012). Biological activity evaluation and structure-activity relationships analysis of ferulic acid and caffeic acid derivatives for anticancer. *Bioorg Med Chem Lett*, *22*(19), 6085-6088. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.08.038

- Limón, J., Rodríguez, M. A., Sánchez, J., & Tlapa, D. A. (2012). Metodología bayesiana para la optimización simultánea de múltiples respuestas. *Información tecnológica*, 23(2), 151-166. doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642012000200017>
- Lomelí-Ramírez, M. G., Dávila-Soto, H., Silva-Guzmán, J. A., Ochoa-Ruiz, H. G., & García-Enriquez, S. (2016). Fungitoxic Potential of Extracts of Four Pinus spp. Bark to Inhibit Fungus *Trametes versicolor* (L. ex. Fr.) Pilát. *BioResources*, 11(4), 10575-10584.
- Makena, P. S., Pierce, S. C., Chung, K. T., & Sinclair, S. E. (2009). Comparative mutagenic effects of structurally similar flavonoids quercetin and taxifolin on tester strains *Salmonella typhimurium* TA102 and *Escherichia coli* WP-2 uvrA. *Environ Mol Mutagen*, 50(6), 451-459. doi: 10.1002/em.20487
- Maksimovic, Z., Malencic, D., & Kovacevic, N. (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresour Technol*, 96(8), 873-877. doi: 10.1016/j.biortech.2004.09.006
- Marquez-Martin, A., De La Puerta, R., Fernandez-Arche, A., Ruiz-Gutierrez, V., & Yaqoob, P. (2006). Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. *Cytokine*, 36(5-6), 211-217. doi: 10.1016/j.cyto.2006.12.007
- Martínez, B. (2014). *Obtención de nano-fibras de celulosa a partir de corteza de eucalyptus globulus*. (Memoria de título), Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Meyer, A. S. (2002). Enhanced extraction of antioxidant phenols from wine and juice press residues via enzymatic polysaccharide hydrolysis. *Fruit Processing*, 12, 29-33.
- Miranda, I., Gominho, J., Mirra, I., & Pereira, H. (2013). Fractioning and chemical characterization of barks of *Betula pendula* and *Eucalyptus globulus*. *Industrial Crops and Products*, 41, 299-305. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.024>
- Mota, I., Rodrigues, P., Novo, C., Sousa, G. D. A., Guerreiro, O., Guerra, Â. R., . . . Rodrigues, A. E. (2013). *Eucalyptus globulus* bark as source of polyphenolic compounds with biological activity. *O Papel*, 74, 57-64.
- Mota, I., Rodrigues Pinto, P. C., Novo, C., Sousa, G., Guerreiro, O., Guerra, Â. R., . . . Rodrigues, A. E. (2012). Extraction of Polyphenolic Compounds from *Eucalyptus globulus* Bark: Process Optimization and Screening for Biological Activity. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51(20), 6991-7000. doi: 10.1021/ie300103z
- Muñoz, F., Ballerini, A., & Gacitúa, W. (2013). VARIABILIDAD DE LAS PROPIEDADES FISICAS, MORFOLOGICAS Y TERMICAS DE LA FIBRA DE CORTEZA DE *Eucalyptus nitens*. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 15, 17-30.
- P. Vedhanarayanan, T. V., P. Sundaramoorthy. (2015). Antimicrobial Activity of Chloroform and Methanol Extract of *Lennea coromandelica* Merr. *International Letters of Natural Sciences*, 45, 67-74.
- Pacific-Forest. (2012). Pacific Forest, Forest Commercializer. Retrieved 12 Abril, 2017, from <http://woodexportchile.com/es/especies-madera>

- Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G. G., & McHugh, T. H. (2012). Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrason Sonochem*, 19(2), 365-372. doi: 10.1016/j.ultsonch.2011.05.015
- Pinelo, M., Sineiro, J., & Núñez, M. a. J. (2006). Mass transfer during continuous solid–liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering*, 77(1), 57-63. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.06.021>
- Qu, W., Pan, Z., & Ma, H. (2010). Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *Journal of Food Engineering*, 99(1), 16-23. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.020>
- R. Wongkittipong, L. P. b., S. Damronglerd, C. Gourdon b. (2004). Solid–liquid extraction of andrographolide from plants—experimental study, kinetic reaction and model. *Sep. Purif Technol*, 40(2), 147-154. doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.02.002>
- Rakotondramasy-Rabesiaka, L., Havet, J. L., Porte, C., & Fauduet, H. (2009). Solid–liquid extraction of protopine from *Fumaria officinalis* L.—Kinetic modelling of influential parameters. *Industrial Crops and Products*, 29(2), 516-523. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.10.001>
- Río, J. T. d. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera*. (Memoria de título), Universidad tecnológica de Pereira, Colombia.
- Rodriguez S, S. y. T. U., Marcos. (1994). Análisis cuantitativo de componentes principales y secundarios en la corteza de diversas especies nativas y exóticas de la provincia de Llanquihue, X región, Chile. *Bosque (Valdivia)*, 15(2), 45-48.
- Rogovskii, V. S., Matiushin, A. I., Shimanovskii, N. L., Semeikin, A. V., Kukhareva, T. S., Koroteev, A. M., . . . Nifant'ev, E. E. (2010). [Antiproliferative and antioxidant activity of new dihydroquercetin derivatives]. *Eksp Klin Farmakol*, 73(9), 39-42.
- Saldarriaga, J., Pablos, A., Aguayo, A., Aguado, R., & Olazar, M. (2014). Determination of particle density by mercury porosimetry for biomass fluid dynamic study in moving beds. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 5(2), 63-71.
- Santos, F. A., Alban, L., Frankenberg, C. L. C., & Pires, M. (2016). Characterization and use of biosorbents prepared from forestry waste and their washed extracts to reduce/remove chromium. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13(1), 327-338. doi: 10.1007/s13762-015-0878-y
- Santos, S. A. O., Freire, C. S. R., Domingues, M. R. M., Silvestre, A. J. D., & Neto, C. P. (2011). Characterization of Phenolic Components in Polar Extracts of *Eucalyptus globulus* Labill. Bark by High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), 9386-9393. doi: 10.1021/jf201801q
- Santos, S. A. O., Villaverde, J. J., Freire, C. S. R., Domingues, M. R. M., Neto, C. P., & Silvestre, A. J. D. (2012). Phenolic composition and antioxidant activity of *Eucalyptus grandis*, *E. urograndis* (*E. grandis* × *E. urophylla*) and *E. maidenii* bark extracts. *Industrial Crops and Products*, 39, 120-127. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.003>

- Sato, H., Genet, C., Strehle, A., Thomas, C., Lobstein, A., Wagner, A., . . . Saladin, R. (2007). Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochem Biophys Res Commun*, 362(4), 793-798. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.130
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202-1205. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>
- Simeonov, E., Tsibranska, I., & Minchev, A. (1999). Solid-liquid extraction from plants — experimental kinetics and modelling. *Chemical Engineering Journal*, 73(3), 255-259. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1385-8947\(99\)00030-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1385-8947(99)00030-3)
- Sjöström, E. (1993). *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*: Academic Press.
- Soong, Y.-Y., & Barlow, P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88(3), 411-417. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.003>
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200-208. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
- Spiro, M., & Selwood, R. M. (1984). The kinetics and mechanism of caffeine infusion from coffee: The effect of particle size. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35(8), 915-924. doi: 10.1002/jsfa.2740350817
- Tao, Y., Zhang, Z., & Sun, D.-W. (2014). Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: Influence of acoustic energy density and temperature. *Ultrason Sonochem*, 21(4), 1461-1469. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.01.029>
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 669-675. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- Tsibranska, I., Tylkowski, B., Kochanov, R., & Alipieva, K. (2011). Extraction of biologically active compounds from *Sideritis ssp. L.* *Food and Bioprocess Processing*, 89(4), 273-280. doi: 10.1016/j.fbp.2010.10.004
- Vázquez, G., Fontenla, E., Santos, J., Freire, M. S., González-Álvarez, J., & Antorrena, G. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial Crops and Products*, 28(3), 279-285. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.03.003>
- Vázquez, G., González-Alvarez, J., Santos, J., Freire, M. S., & Antorrena, G. (2009). Evaluation of potential applications for chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial Crops and Products*, 29(2-3), 364-370. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.07.004>

- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4113-4117. doi: 10.1021/jf9801973
- Wegener, D. F. a. G. (1984). *Wood—chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter, Berlin and New York.
- Winandy, J. E. M., Jeffrey J. (1993). Relationship between incipient decay, strength, and chemical composition of Douglas-fir heartwood. *Wood. Fib. Sci*, 25(3), 278-288.
- Wright, G. (2015). *Mathematical modeling of the solid-liquid extraction of phenolic-rich compounds from pinus contorta bark*. (Master Memoria de título), Universidad de Toronto.
- Yang, L., Jiang, J. G., Li, W. F., Chen, J., Wang, D. Y., & Zhu, L. (2009). Optimum extraction process of polyphenols from the bark of *Phyllanthus emblica* L. based on the response surface methodology. *J Sep Sci*, 32(9), 1437-1444. doi: 10.1002/jssc.200800744
- Yi, J., Wang, Z., Bai, H., Li, L., Zhao, H., Cheng, C., . . . Li, J. (2016). Polyphenols from pinecones of *Pinus koraiensis* induce apoptosis in colon cancer cells through the activation of caspase in vitro. *RSC Advances*, 6(7), 5278-5287. doi: 10.1039/C5RA24913A
- Zaid, L. (2004). *Estudio del biodeterioro en madera de Eucalyptus globulus Lab. por método gravimétrico. Memoria de título*. (Pregrado), Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Zhou, L., Wang, X., Sha, Z., Xu, H., & Xiao, Q. (2013). Kinetics and Model Building on Ultrasonic Extraction of Schisandrin From Fruit of *Schisandra chinensis*. *Journal of Food Process Engineering*, 36(3), 257-266. doi: 10.1111/j.1745-4530.2012.00685.x

9 Anexos

9.1 Anexo A: Muestreo de árboles

A.1. Protocolo de muestreo

Selección de la muestra:

- Se seleccionan 6 árboles en total; 3 árboles de la especie *E. nitens* cuyo diámetro medio (DAP) debe estar en el rango de 36 a 40 cm y 3 árboles de la especie *E. globulus* cuyo diámetro medio debe estar en el rango de 20 a 26 cm. Este dato es registrado en la hoja de datos.
- El corte para realizar el volteo debe situarse a no más de 15 cm del suelo, este dato queda registrado como altura de tocón.
- Registrar Altura Total del árbol.

Procedimiento de extracción de muestras y etiquetado:

- De la altura total se hacen cuatro cortes con el fin de dividir el árbol en 5 secciones de igual largo, las alturas de los cortes son registradas de manera correlativa de 1 a 4. Estas secciones deberán quedar identificadas: para la especie *E. nitens* o *E. globulus* con una N o G según corresponda y deben ser registradas en la hoja de muestras.

- A cada sección se le ubica el punto medio, y en ese lugar, se le extraerá una rodela de 15 cm. El centro de la rodela debe coincidir con el punto medio de la sección.
- Cada set de cinco rodela deberá ser almacenadas en una bolsa y etiquetadas con los números 1-2-3-4-5 donde 1 es la rodela más cercana al tocón y 5 la más cercana de la copa.
- La bolsa será identificada con una letra (A, B, C, D, E y F). Esta será denominada “letra de identificación” y deberá estar registrada en la hoja de muestras.

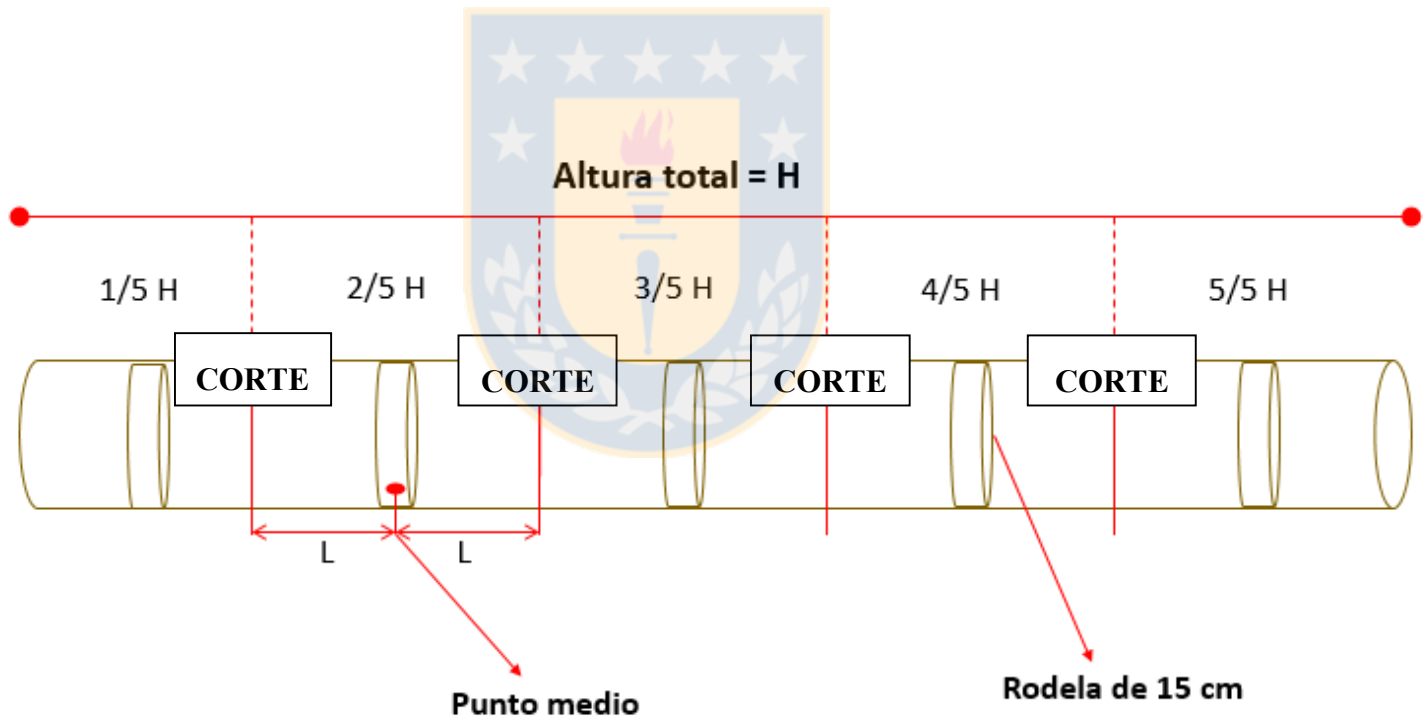


Figura 28: Esquema explicativo de corte

Fuente: Elaboración propia

A.2. Hojas de muestreo

Letra de identificación: Árbol 1

Especie: *E. nitens*

Identificación del predio: Los Castaños FCSA, Rodal 9404

Día de recolección: 17/12/2015

Tabla 27: Mediciones en terreno para Árbol 1 – *E. nitens*, *E. globulus*

Medida	Medición <i>E. nitens</i> (m)	Medición <i>E. globulus</i> (m)
DAP	0,36	0,20
Altura de tocón	0,15	0,12
Altura total	35,0	23,5
Altura de corte 1	7	4,7
Altura de corte 2	14	9,4
Altura de corte 3	21	14,1
Altura de corte 4	28	18,8

Fuente: Elaboración propia

Letra de identificación: Árbol 2

Especie: *E. nitens*

Identificación del predio: Los Castaños FCSA, Rodal 9404

Día de recolección: 17/12/2015

Tabla 28: Mediciones en terreno para Árbol 2 – *E. nitens*, *E. globulus*

Medida	Medición <i>E. nitens</i> (m)	Medición <i>E. globulus</i> (m)
DAP	0,38	0,24
Altura de tocón	0,15	0,14
Altura total	37	27,60
Altura de corte 1	7,40	5,52
Altura de corte 2	14,8	11,04
Altura de corte 3	22,20	16,56
Altura de corte 4	29,60	22,08

Fuente: Elaboración propia

Letra de identificación: Árbol 3

Especie: *E. nitens*

Identificación del predio: Los Castaños FCSA, Rodal 9404

Día de recolección: 17/12/2015

Tabla 29: Mediciones en terreno para Árbol 3 – *E. nitens*, *E. globulus*

Medida	Medición <i>E. nitens</i> (m)	Medición <i>E. globulus</i> (m)
DAP	0,36	0,26
Altura de tocón	0,15	0,12
Altura total	32	29,6
Altura de corte 1	6,4	5,92
Altura de corte 2	12,8	11,84
Altura de corte 3	19,2	17,76
Altura de corte 4	25,6	23,68

Fuente: Elaboración propia

9.2 Anexo B: Tablas de resultados

Tabla 30: Valores de concentración de equilibrio a distintos tamaños de partícula

Tamaño de partícula (mm)	Concentración de fenoles en el equilibrio (mg GAE/g corteza seca)	
	<i>E. nitens</i>	<i>E. globulus</i>
0,08-0,35	52,9 ± 0,355 a	38,3 ± 0,0410 a
0,35-0,60	52,4 ± 0,0490 a	38,4 ± 0,501 a
0,60-0,85	48,7 ± 0,841 b	36,6 ± 0,167 b
0,85-1	44,6 ± 1,19 c	34,0 ± 0,179 c

Nota: Diferencias con un valor $p < 0,05$
Fuente: Elaboración propia

9.3 Anexo C: Curva de calibración de ácido gálico

La curva de calibración utilizada en el cálculo de FT por el método Folin-Ciocalteu se muestra en la figura 29.

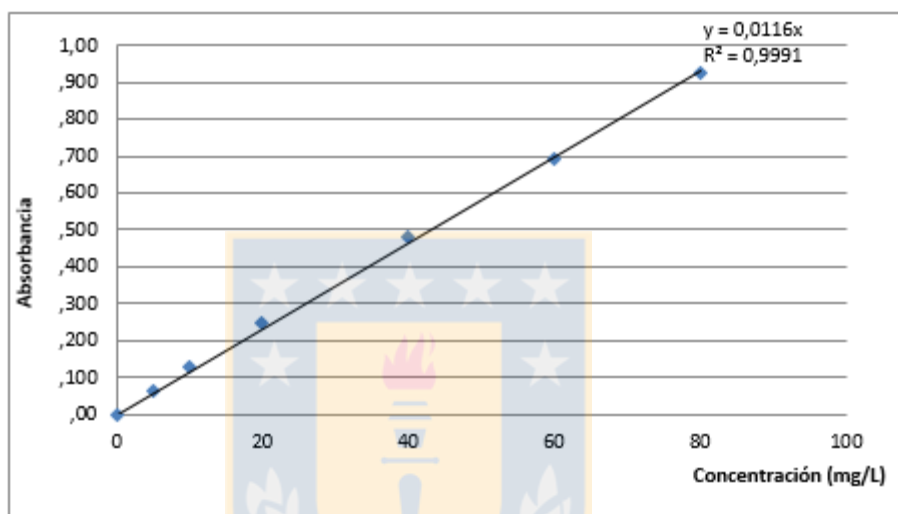


Figura 29: Curva de calibración para absorción medida en fenoles totales

Fuente: Elaboración propia

Las mediciones se realizaron por triplicado y se determinó la concentración de ácido gálico de acuerdo al promedio de absorbancias obtenido.

9.4 Anexo D: Curva de calibración de Trolox

La curva de calibración utilizada en el cálculo de la actividad antioxidante por el método DPPH se muestra en la figura 30.

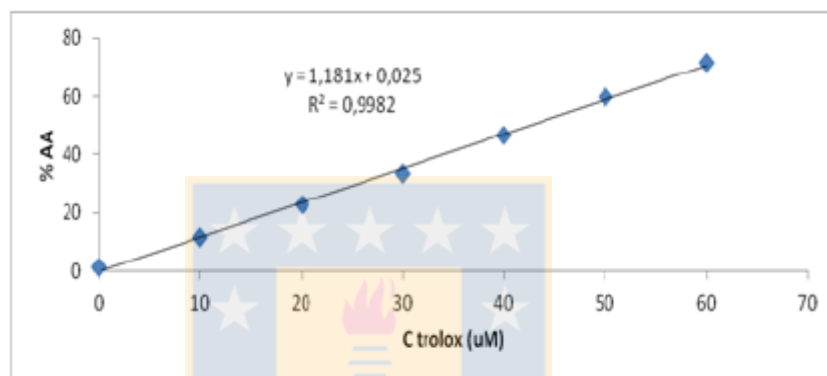


Figura 30: Curva de calibración para determinación de capacidad antioxidante (DPPH)

Fuente: Elaboración propia