

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER  
MÓDULO DE QUÍMICA ANALÍTICA****ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN  
HIERBAS Y FRUTOS****Autora: Cristina Trujillo Hernández****Tutora: Dra. Rosa M<sup>a</sup> Garcinuño Martínez****FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ANALÍTICAS  
FEBRERO 2019**

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	4
<b>INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	6
<b>CAPÍTULO I. COMPUESTOS ANTIOXIDANTES</b> .....	8
I.1.- DESCRIPCIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES.....	8
I.2.-CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES.....	9
I.2.1- Antioxidantes endógenos.....	9
I.2.2- Antioxidantes exógenos.....	11
I.3.- RADICALES LIBRES.....	16
I.3.1.-Reacciones en cadena de los radicales libres.....	17
I.3.2.- Efectos que generan los radicales libres en la salud.....	19
I.4.- DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	21
I.4.1- Métodos directos.....	21
I.4.2- Métodos indirectos.....	23
I.4.3- Otros métodos.....	23
I.5.- IMPORTANCIA DE LA DETECCIÓN ANALÍTICA DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES Y APLICACIONES.....	25
<b>CAPÍTULO II.TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN ESPECIES VEGETALES</b> .....	27
II.1.-INTRODUCCIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES E IMPORTANCIA EN SU ELECCIÓN.....	27
II.2.- TRATAMIENTO DE LA MUESTRA .....	27
II.3.-DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL ENSAYO DPPH.....	33
II.4.- DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR ABTS ..	38
II.5.-MÉTODO DE REDUCCIÓN DEL RADICAL DMPD (DICLORHIDRATO DE N, N- DIMETIL P-FENILENDIAMINA).....	41
II.6.- MÉTODO FOLIN- CICOALTEU.....	43
II.7.- MÉTODO DE PODER ANTIOXIDANTE REDUCTOR DEL HIERRO (FRAP)	47
II.8.- MÉTODO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE REDUCTORA DE IONES CÚPRICOS (CUPRAC).....	50

II.9.- OTROS MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN ESPECIES VEGETALES.....	54
II.9.1.-Cromatografía líquida de alta eficacia (HPCL).....	54
II.9.2.-Método del pH- diferencial para la determinación de antiocianina	58
II.9.3.- Quimioluminiscencia y electroquimioluminiscencia.....	61
II.10 RESUMEN DE LOS MÉTODOS APLICADOS EN LOS TRABAJOS CITADOS.....	64
<b>CAPÍTULO III. CONCLUSIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>CAPÍTULO IV. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>71</b>

## **ABREVIATURAS**

ABTS: Sal diamónica del ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

AOAC: Association of analytical chemists o asociación oficial de químicos analíticos

BHA: Hidroxianisolbutilado o butilhidroxianisol

BHT: Hidroxitolueno butilado o butilhidroxitolueno

BL: Bioluminiscencia

CAT: Catalasa

CUPRAC: Cupric ion reducing antioxidant capacity o capacidad antioxidante reductora de iones cúpricos

DPPH: 2,2-difenil-1-pirilhidrazilo

DMPD: Diclorhidrato de n, n-dimetil p-fenilendiamina

EDTA: Etilendiamintetraacetato

EQL: Electroquimioluminiscencia

FRAP: Ferric ion reducing antioxidant power o *poder antioxidante reductor del hierro*

GPX: Glutación peroxidasa

GSSG: Cataliza la reducción del glutación oxidado

GSH: Glutación reducido

HPLC: High-performance liquid chromatography o cromatografía líquida de alta eficacia

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

NAC: N-acetilcisteína

NADPH: Flavoenzima dependiente del nicotinamína de dinucleótido fosfato reducido

NOS: Citosolicaoxido nítrico sintasa

OMS: Organización mundial de la salud

PBS: Phosphate buffer saline o solución salina tamponada con fosfato

QL: Quimioluminiscencia

RL: Radical libre

RNS: Reactive nitrogen species o especies reactivas derivadas del nitrógeno

RCS: Reactive chlorine species o especies reactivas derivadas del cloro

ROS o EROs: reactive oxygen species o especies reactivas derivadas del oxígeno

SOD: Superóxido dismutasa

TBA: 3-tercbutil-4-hidroxianisol

TBH: 2,6-di-tercbutil-4-metilfenol

TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity o capacidad antioxidante equivalente de trolox

TOSC: Total oxyradical scavenging capacity o Capacidad total de barrido oxirradical

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los antioxidantes son sustancias químicas fundamentales para nuestro organismo, cuya función, entre otras, es la de prevenir y proteger a las células sanas de los radicales libres, compuestos de elevada reactividad, que en exceso, son los causantes del deterioro de las células y el envejecimiento del cuerpo.

Desde los años 60 se comenzó el estudio de los efectos de los antioxidantes para la salud, su relación con el estrés oxidativo y consecuentemente con las enfermedades que aparecen como resultado. Hoy día, la búsqueda de nuevas entidades antioxidantes es un tema que suscita gran interés.

Tras observar las estadísticas de las defunciones según la causa de muerte durante el 2016 que ha publicado el Instituto Nacional de Estadística en una nota de prensa, se puede observar que las debidas al Alzheimer y a algunos tipos de cáncer ocupan casi un 70%, coincidiendo con las enfermedades que están directamente relacionadas con los radicales libres y por tanto con el estrés oxidativo (INE, 2017).

A los radicales libres, por tanto, se les relaciona directamente con el estrés oxidativo de las células y las macromoléculas del cuerpo, dando lugar al envejecimiento prematuro, enfermedades neurodegenerativas y algunos cánceres.

El metabolismo oxidativo es esencial para la supervivencia de las células, pero produce radicales libres y otras especies oxidantes. El problema aparece cuando se produce un exceso de radicales libres que poseen electrones “desapareados” y necesitan estabilizarse, formando un nuevo par de electrones “robando” un electrón a otra molécula. La molécula a la que le ha “robado”, se convierte en un nuevo radical libre, provocando así una reacción en cadena que termina dañando las células.

Los antioxidantes, por su parte, son moléculas capaces de evitar la oxidación o el “robo” de un electrón, lo que evita el daño celular mediante la neutralización de los radicales libres a través del consumo de alimentos ricos en antioxidantes. Así, la prevención de enfermedades se limita a la recomendación de consumir alimentos fundamentalmente vegetales, con alto contenido en ese tipo de sustancias.

De la misma manera, la oxidación puede afectar también a los alimentos, en especial por oxidación de los ácidos grasos (Kanner, 1994), siendo ésta la mayor causa del deterioro químico (Colbert y cols., 1991) que deriva en la pérdida del sabor, del valor nutricional, del color y la textura, y de la seguridad de dichos alimentos. Se

estima que la mitad de la fruta y verdura cosechada en el mundo se pierde después de la recogida debido a su deterioro (Shahidi, 1992).

Los compuestos antioxidantes pueden ser de dos tipos, por un lado tenemos los conocidos como naturales, que se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes concentraciones en las plantas, verduras, frutas, té, café, vino, etc. Y por otro lado existen los antioxidantes sintéticos muy utilizados por la industria alimentaria, debido a su estabilidad y bajo costo, para preservar la inocuidad de los productos envasados comercializados. Aunque las dosis están limitadas en cada producto (REAL DECRETO 142/2002, de 1 de febrero), las personas estamos diariamente expuestas a grandes cantidades de estos agentes, que son usados como conservantes en alimentos y cosméticos, aun existiendo numerosa bibliografía que atribuye efectos tóxicos y carcinogénicos para la salud. El uso de estos productos en la industria alimentaria se ha extendido desde comienzos del siglo pasado debido además de a su estabilidad y eficacia, a que son más económicos que los naturales. Se estima que la vida útil de muchos productos alimentarios aumenta entre un 15 y un 200% con el empleo de estos antioxidantes.

En la actualidad, y dadas las investigaciones sobre los efectos negativos que causan los antioxidantes sintéticos sobre la salud, existe una creciente oposición al empleo de los mismos en la industria alimentaria. Por ello, la tendencia actual de esta línea de investigación va dirigida hacia la búsqueda de productos naturales con actividad antioxidante que sustituyan completa o parcialmente a los anteriores.

El objetivo de este Trabajo de Fin de Máster se centra en presentar el estado actual de las investigaciones referidas a los compuestos oxidantes, y su importancia en la prevención de enfermedades. Para ello, se pretende realizar una revisión bibliográfica sobre los principales compuestos antioxidantes, tanto endógenos como exógenos que existen, así como sobre las metodologías empleadas en la actualidad para la determinación de la actividad antioxidante de los compuestos que forman parte de especies vegetales. En este trabajo se incluye también una revisión de los métodos de preparación de muestra utilizados más habitualmente.

Este trabajo supone un paso más para seguir promoviendo nuevas investigaciones sobre el uso de plantas con propiedades medicinales, especialmente con actividad antioxidante, y pone de manifiesto la importancia del aislamiento e identificación estructural de los principios activos presentes en los extractos vegetales.

# CAPÍTULO I. COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

## I.1.- DESCRIPCIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES

La molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas se denomina antioxidante. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. El antioxidante al colisionar con el radical libre (RL) le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil no tóxico (figura 1). Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermedios del radical e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos.

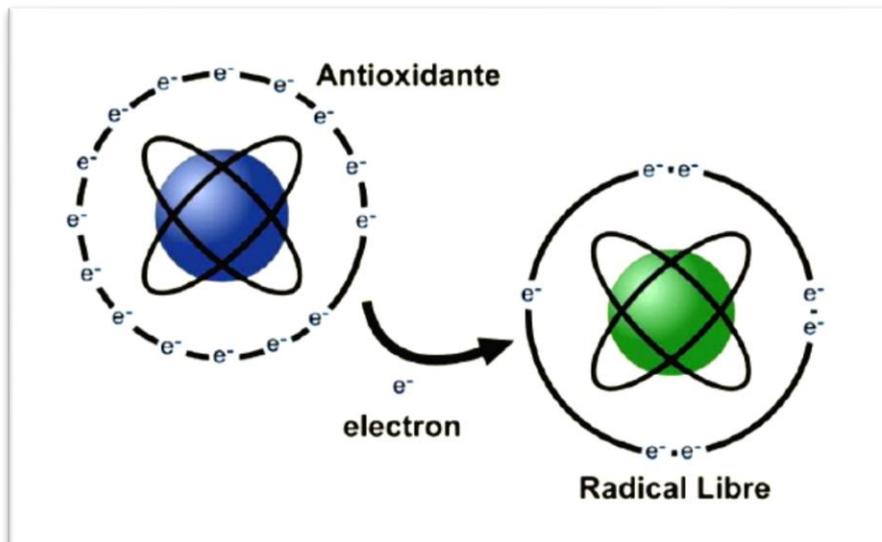


Figura 1. Interacción del antioxidante con el radical libre (Sánchez y Trujillo, 2013).

Halliwell y cols. (2011) definen como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. Un antioxidante facilita el uso fisiológico del oxígeno por parte de las mitocondrias celulares, lo cual contribuye a reducir los efectos del estrés oxidativo y la falta de oxígeno, al formar complejos que reducen las reacciones productoras de RL (Halliwell y cols., 2011).

## **I.2.-CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES**

Existen dos tipos de antioxidantes: los endógenos, dotados por el propio sistema biológico, y los exógenos, tomados de la dieta.

### **I.2.1- Antioxidantes endógenos**

Específicamente los antioxidantes endógenos se clasifican en dos grupos, enzimáticos y no enzimáticos.

#### **Antioxidantes enzimáticos**

Los llamados antioxidantes enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los RL. Las principales enzimas antioxidantes de este grupo que se encuentran en el organismo son las siguientes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX).

##### *Enzima superóxido dismutasa (SOD)*

Es una metaloenzima que tiene una amplia distribución en el organismo humano. Existen varias clases, las cuales tienen como cofactores diferentes átomos metálicos como Zn, Cu, Fe, Mn o Ni. Se localiza dentro de la célula, específicamente, en el citosol y el espacio intermembranoso mitocondrial. Cataliza la reacción de destrucción del anión superóxido, mediante la transformación de éste en peróxido de hidrógeno (dismutación del  $O_2$ ), el cual puede ser destruido a su vez por la actividad de la catalasa o de la glutatión peroxidasa. La función de esta enzima consiste en eliminar el radical superóxido antes de que este reaccione con moléculas biológicas susceptibles. Su presencia es imprescindible en todos los organismos aerobios.

##### *Catalasa (CAT)*

La Catalasa es un enzima metaloproteína tetramérica, también con amplia distribución en el organismo. Su presencia es abundante en hígado y riñón, pero escasa en tejido conectivo y epitelios, y prácticamente nula en tejido nervioso. De localización intracelular (mitocondrias, peroxisomas, citosol), tiene dos funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa. La principal, es catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Esta función es compartida con la glutatión peroxidasa. En general, las bajas concentraciones de

peróxido de hidrógeno estimulan la actividad de peroxidasas, mientras que las altas concentraciones de peróxido son preferentemente catalizadas por la catalasa.

### *Glutación peroxidasa (GPX)*

Es una enzima que usa como cofactor el selenio. Es dependiente de localización mitocondrial, citosólica y lisosómica, que cataliza la reducción del  $H_2O_2$  a radical hidroperóxido en presencia de glutatión reducido y selenio. El ciclo redox de la glutatión es la mayor fuente de protección contra bajos niveles de estrés oxidativo. La actividad de esta enzima contribuye a proteger a los lípidos de la membrana celular de la peroxidación.

La glutatión reductasa es una flavoenzima dependiente del nicotinamína de níndinucleótido fosfato reducido (NADPH) que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), el cual será utilizado por la glutatión peroxidasa para la reducción del peróxido de hidrógeno y de lipoperóxidos. Permite mantener concentraciones estables de GSH en la célula de igual manera, es de utilidad en la recuperación de las vitaminas C y E y participa en la eliminación de RL. El GSH interviene además en la de toxicación de compuestos xenobióticos, el almacenamiento y transporte de cisteína, la regulación del balance redox de la célula, el metabolismo de los leucotrienos y las prostaglandinas, la síntesis de los desoxirribonucleótidos, la función inmunológica y la proliferación celular.

### **Antioxidantes no enzimáticos**

Los antioxidantes endógenos no enzimáticos se ubican principalmente en el citosol, matriz mitocondrial y nuclear y fluidos extracelulares. Entre los más importantes se incluyen el glutatión, el ácido úrico, la bilirrubina, la albúmina y la ubiquinona. En este apartado se comentan algunos de los antioxidantes no enzimáticos de gran importancia en el organismo, tales como la enzima glutatión en su forma reducida (GSH), el ácido úrico y la ubiquinona.

### *La enzima glutatión*

Se encuentra dentro de los principales compuestos pertenecientes a este grupo cuya forma reducida (GSH) es un tripéptido (g-glutamyl-cisteinil-glicina), que presenta una distribución tisular variable y constituye el compuesto tiólico de bajo

peso molecular más abundante en las células de mamíferos. Sus propiedades químicas le permiten actuar frente a numerosos compuestos oxidantes, ya que su reducción destoxifica el efecto de las especies reactivas del oxígeno (EROS). Los precursores de glutatión ricos en cisteína incluyen N-acetilcisteína (NAC) y proteína del suero sin desnaturalizar, y estos suplementos se ha demostrado que aumentan el contenido de glutatión de la célula. La N-acetilcisteína está disponible como un medicamento y como un suplemento genérico y se ha demostrado que es eficaz en el aumento de los valores de glutatión.

#### *El ácido úrico*

Aunque se ha considerado un producto terminal del metabolismo de las purinas, la función del ácido úrico como antioxidante biológico, intra y extracelular, ha comenzado a reconocerse. Su mecanismo de acción es prevenir la oxidación del ácido ascórbico y formar complejos con los metales Fe y Cu.

#### *La ubiquinona*

Es una quinona con estructura semejante al tocoferol, también llamada coenzima-Q. Su forma oxidada, el ubiquinol, impide que las especies reactivas de oxígeno desencadenen la peroxidación lipídica, y también participa en el recambio de la vitamina E en la mitocondria.

### **I.2.2- Antioxidantes exógenos**

Los antioxidantes exógenos, es decir, los que ingresan al organismo solo a través de la dieta, se clasifican, esencialmente, en vitaminas-antioxidantes como el ácido ascórbico o la vitamina E, compuestos provitamina A, y polifenoles.

#### **Vitaminas antioxidantes**

##### *El ácido ascórbico (o Vitamina C)*

Es conocido por su potente capacidad antioxidante, actúa en combinación con otros antioxidantes primarios como la vitamina E y los carotenoides, así como en conjunto con las enzimas antioxidantes en medio acuoso. La vitamina C (figura 2) coopera con la Vitamina E regenerando el  $\alpha$ -tocoferol desde el radical  $\alpha$ -tocoferilo en membranas y lipoproteínas. Como donante de electrones, es un potente antioxidante soluble en agua en los seres humanos.

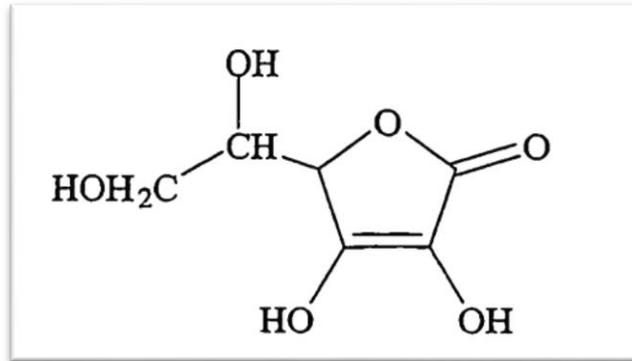


Figura 2. Estructura molecular del ácido ascórbico

### Vitamina E

Es el nombre genérico de una familia homogénea de compuestos que tienen en su estructura una porción hidroquinona metilada en mayor o menor grado y una cadena isoprenoide. Un término que incluye no solo al alfa-tocoferol, sino además, a las isoformas alfa, beta, gama y delta de los tocoferoles y los tocotrienoles. Posee gran capacidad oxidante ya que protege a las células de la acción nociva de los radicales libres.

La vitamina E tiene un grupo hidroxilo fenólico responsable de su actividad estabilizadora de radicales libres y una cadena hidrocarbonada ( $C_{16}H_{33}$ ) que favorece su inserción en la región lipídica de la bicapa. En sistemas biológicos, una molécula de vitamina E permite proteger 10.000 moléculas de ácidos grasos insaturados. El  $\alpha$ -tocoferol (figura 3) es el componente más abundante de la vitamina E, es bien conocido y representa la mayor posibilidad de prevención de la peroxidación de membrana por estabilización de radicales peroxilo.

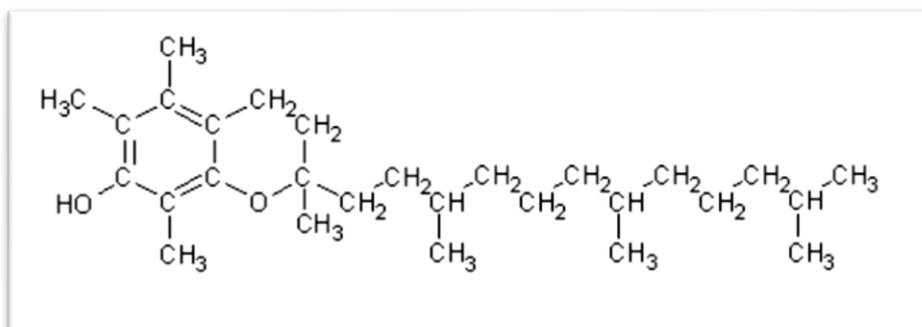


Figura 3. Estructura molecular del alfa-tocoferol

## **Compuestos Pro-Vitamina A**

La vitamina A presente en la fruta y verdura es llamada “carotenoide provitamina A”, y puede convertirse en retinol en el organismo. Los carotenos son compuestos que se encuentran en las plantas, incluidas aquellas que sirven como alimentos, donde son importantes en el proceso de la fotosíntesis.

Los carotenoides pueden ser alfa y beta caroteno, son precursores de la vitamina A y actúan como nutrientes antioxidantes. Son los únicos carotenoides que el organismo transforma en cantidades apreciables de vitamina A conforme los va necesitando. Son importantes para el sistema inmune, ya que proporcionan resistencia a la infección. Además, son necesarios para el desarrollo y mantenimiento de un tejido epitelial saludable y de las membranas mucosas, así como para el revestimiento de los pulmones, los bronquios y otros tejidos respiratorios. El tejido epitelial forma una barrera frente a las bacterias y sustancias extrañas y ayuda directamente a la prevención de infecciones y enfermedades.

Recientemente, se ha prestado mucha atención a la familia completa de los carotenoides, especialmente a compuestos tales como alfa caroteno, luteína, licopeno, zeaxantina y capxantina, dado que las investigaciones han demostrado que alguno de estos carotenoides proporciona unos beneficios antioxidantes y protectores significativamente superiores al beta caroteno (Day, 2004).

## ***Polifenoles***

La mayoría de los polifenoles se encuentran en los alimentos vegetales consumidos habitualmente por la población. Todos los polifenoles exhiben en su estructura, al menos, uno o más grupos hidroxilos, unidos a un anillo aromático. Entre los polifenoles es posible distinguir dos grandes grupos de compuestos los flavonoides y los no flavonoides.

### *Flavonoides*

Su estructura comprende dos anillos aromáticos unidos aun heterociclo común de difenilpiranos de tres átomos de carbono y uno de oxígeno (C6-C3-C6) compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico), como se puede observar en la figura 4, donde aparecen las estructuras básicas de algunos de los flavonoides más característicos. Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (figura 4).

Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C (Martínez y cols., 2010).

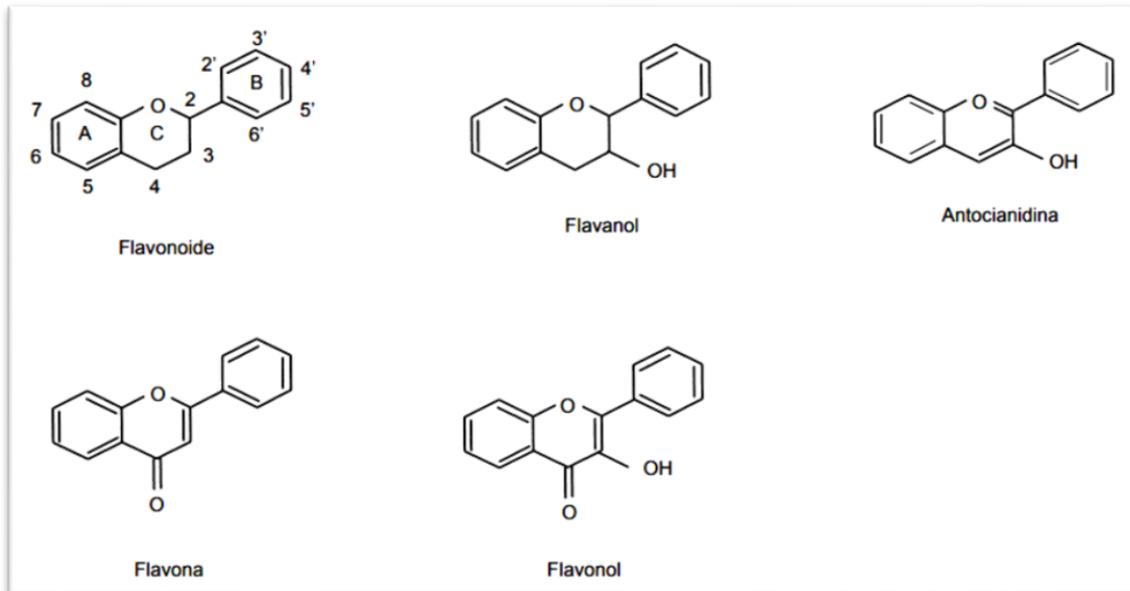


Figura 4. Flavonoides estructura básica de algunos de los más característicos.

Los flavonoides se subdividen en antoxantinas (pigmentos blancos, amarillos e incoloros) y antocianinas (pigmentos rojos, azules o púrpuros). La clasificación de los flavonoides también se puede realizar en función de su estructura y vía metabólica, en flavonoides simples, isoflavonoides y neoflavonoides. En la tabla 1 se realiza una clasificación de los flavonoides por grupos, compuestos y se indican algunos de los alimentos en los que se encuentran.

Tabla 1. Clasificación de flavonoides por grupos y compuestos

	Grupo	Compuesto	Alimento
Flavonoides	Flavonoles	Quercetina, Kemferol, Miricetina	Lechuga, aceitunas, cebollas, piel de fruta
	Flavonas	Luteolina, Apigenina, Crisina Rutina, Sibelina	Apio, piel de naranja
	Flavanoles	Catequina, Epicatequina, Galocatequina	Vino tinto, Té
	Flavanonas	Fisetina, Mesperodina, Naringenina, Taxifolin	Cítricos (limón, lima y mandarina) Uvas Cítricos (piel)
	Isoflavonas	Genisteína, Daidzeína, Gliceteína, Pelargonidina	Soja Frambuesa

### *No-flavonoides*

Dentro de este grupo existen algunos cientos de compuestos que pueden dividirse en ácidos benzóicos y ácidos cinámicos, portadores de una cadena lateral insaturada, y también comprenden otros derivados fenólicos como los estilbenos, entre los que destaca el resveratrol. Los fenoles libres y los ácidos fenoles se consideran en un mismo grupo, ya que generalmente se identifican simultáneamente durante el análisis de las plantas. La estructura básica de los ácidos benzóicos es un anillo aromático con un grupo carboxilo. Los ácidos de la serie benzoica, tales como el gálico, el vainillínico y el p-hidroxibenzoico son abundantes en las espermatofitas y los helechos.

En el caso de la serie cinámica, los ácidos cinámicos (cafeico, ferúlico, p-cumárico y sináptico) raramente se encuentran libres y en general se hallan en forma de derivados.

A continuación, en la tabla 2 se muestran algunos de los compuestos no flavonoides característicos así como los algunos de los alimentos en los que se encuentran.

Tabla 2. Compuestos no flavonoides

	Grupo	Compuesto	Alimento
No flavonoides	Ácidos fenólicos	Ácido cafeico, clorogénico, ferúlico	Granos de café, cerezas dulces, naranja, patata blanca, uva
	Ácido benzóico	Ácido elágico, ácido vainillínico ácido gálico	Granada, jugo de uva negra y verde
	Estilbenos	Resveratrol	Vino tinto, rosado y blanco, uvas, nueces, bayas
	Acetofenonas	Ácido benzóico ácido carbónico y acetona	Manzana, albaricoque, plátano

### I.3.- RADICALES LIBRES (RL)

Los procesos fisiológicos de los cuales resultan los radicales libres en los seres humanos son el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio físico. Por otro lado, en el organismo existen RL generados por factores externos o ambientales como la contaminación industrial, el tabaco, la radiación, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y los pesticidas.

Los RL son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado y que se producen mediante reacciones con especies reactivas del oxígeno (EROs). Son muy reactivos, con una vida media biológica de microsegundos, ya que tienden a alcanzar la estabilidad química mediante la captación de un electrón de otra molécula estable. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre iniciándose así, una cadena de captura de electrones entre moléculas que destruye las células.

Los radicales libres son generados y utilizados por células como los neutrófilos, los monocitos, los macrófagos, los eosinófilos y los fibroblastos para eliminar organismos extraños como bacterias y virus. Pero el incremento de estos radicales conduce a un deterioro celular que se refleja de manera muy pronunciada durante la vejez, etapa en que se presentan varias enfermedades asociadas al daño oxidativo.

Una vez formados los RL por el metabolismo celular, éstos son capaces de reaccionar rápidamente con la molécula vecina. Los lípidos representan el grupo más susceptible debido a la presencia de dobles enlaces en sus ácidos grasos, además de constituir de manera fundamental el orgánulo celular más expuesto, que es la membrana celular.

Nuestro propio cuerpo fabrica RL en cantidades moderadas para determinadas fusiones, como para luchar contra bacterias y virus. Esta cantidad producida por el cuerpo son neutralizados fácilmente por nuestro propio sistema. Con este fin, nuestro cuerpo produce enzimas (como catalasa o dismutasa) que son las encargadas de neutralizarlos. Estas enzimas tienen la capacidad de “desarmar” a los radicales libres sin desestabilizarse. Por lo tanto, los RL no son intrínsecamente deletéreos.

### **I.3.1.-Reacciones en cadena de los radicales libres**

Las especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) es un término colectivo, ampliamente empleado, que comprende todas aquellas especies reactivas que, siendo o no radicales libres, centran su reactividad en un átomo de oxígeno. No obstante, a menudo, bajo la denominación ROS se incluyen otras especies químicas cuya reactividad se centra o deriva en átomos distintos al de oxígeno. En rigor, sin embargo, las especies cuya reactividad deriva o se centra en átomos como nitrógeno o cloro deberían referirse como RNS (*Reactive NitrogenSpecies*) y RCS (*Reactive Chlorinespecies*), respectivamente.

La Tabla 3 muestra los principales radicales libres, ROS y RNS, respectivamente, normalmente generadas en nuestro organismo.

Tabla 3. Principales radicales libres y especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno. Imagen extraída de Portal antioxidantes

PRINCIPALES ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DEL OXÍGENO (ROS) Y DEL NITRÓGENO (RNS)			
RADICALES LIBRES		ESPECIES REACTIVAS NO-RADICALES	
SUPERÓXIDO	$O_2^{\cdot-}$	PERÓXIDO HIDRÓGENO	$H_2O_2$
HIDROXILO	$HO^{\cdot}$	HIDROPERÓXIDOS	$ROOH$
ALCOXI	$RO^{\cdot}$	HIPOCLORITO	$ClO^{\cdot}$
PEROXI	$ROO^{\cdot}$	OXÍGENO SINGLETE	$^1O_2$
CARBONATO	$CO_3^{\cdot-}$	OZONO	$O_3$
OXIDO NÍTRICO	$NO^{\cdot}$	PEROXINITRITO	$ONOO^{\cdot}$
DIOXIDO NÍTRICO	$NO_2^{\cdot}$		$NO^{\cdot} O_2^{\cdot-}$

A partir del oxígeno molecular  $O_2$  se forman moléculas más reactivas conocidas como EROs, como el superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el hidroxilo ( $OH$ ) y el peróxido de hidrógeno, así como los oxiradicales ( $O_2$  singlete y doblete). Debido a su función primordial de producción de energía química, la mitocondria es considerada la mayor productora de EROs.

Las EROs regulan varios procesos celulares, en el caso de mamíferos son la secreción y acción de la insulina, la producción de hormonas de crecimiento, citocinas (comunicación entre células), la unión de las proteínas G a sus receptores, factores de transcripción, regulación de los transportadores y canales de iones, entre otros (Bartozs, 2009). Sin embargo, también resultan nocivas para los organismos cuando se producen en grandes cantidades dañando los constituyentes celulares e induciendo la muerte celular.

Otra especie reactiva normalmente generada por el organismo es el óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ). Este radical libre, que resulta de la acción de la enzima citosólica óxido nítrico sintasa (NOS), es generado en forma continua, aunque no exclusiva, por células vasculo-endoteliales (aquellas que “tapizan” la parte interna de un vaso sanguíneo). Junto al  $O_2^{\cdot-}$ , el  $NO^{\cdot}$  constituye un ejemplo de especies reactivas cuya generación y acción es, no solo fisiológica, sino absolutamente fundamental para el adecuado funcionamiento del organismo.

Las reacciones que afectan a los RL se dividen en tres categorías: iniciación, propagación y terminación.

- Iniciación: que consiste en la producción inicial de RL por alteraciones internas de las células o por elementos externos a ella.
- Propagación: son aquellas en que los RL generan otros RL, y éstos, a su vez, atacan moléculas, diseminando la lesión a través de la célula.
- Terminación: ocurre cuando las reacciones finalizan y se han originado metabolitos secundarios que la célula no puede utilizar, por ello, son eliminados.

### **I.3.2.- Efectos que generan los radicales libres en la salud**

Los RL juegan un papel importante en la lucha contra bacterias y virus, participan en la regulación de la estructura y función de proteínas y colaboran en el control del tono muscular. Como ocurre en la mayoría de los procesos biológicos, debe existir un equilibrio entre los beneficios que aportan la presencia de radicales y los inconvenientes que puedan resultar de un exceso de éstos. El problema con los radicales libres, surge cuando este delicado equilibrio se ve alterado debido a diversos factores, que son difícilmente evitables en la vida actual, ya que sus niveles se ven aumentados por causas como el tabaco, consumo de alcohol, exceso de grasas saturadas, elevadas dosis de azúcar, respiración biológica, radiaciones solares, contaminación ambiental o ejercicio físico o emocional intenso. Todos estos factores (tanto los evitables como los no evitables) son los que hacen que se generen más radicales libres de lo normal, que ataquen nuestras células, las dañen y que finalmente las conviertan en nuevos RL, produciendo la reacción en cadena comentada anteriormente. Cuando estos RL se encuentran en exceso en el organismo, afectan directamente a nuestro estado de salud produciendo el denominado “estrés oxidativo”.

El estrés o daño oxidativo es esencialmente el desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad del cuerpo para contrarrestar o desintoxicar sus efectos nocivos a través de la neutralización con antioxidantes.

El concepto expresa la existencia de un desequilibrio entre las velocidades de producción y de destrucción de las moléculas tóxicas que da lugar a un aumento en la concentración celular de los radicales libres. Estos reaccionan químicamente con lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN al interior de las células, y con componentes de la matriz extracelular (Finkel, 2003), por lo que pueden desencadenar un daño

irreversible que, si es muy extenso, puede llevar a la muerte celular, provocando afecciones de diversa consideración.

En líneas generales existen más de 200 enfermedades ligadas a desequilibrios en el sistema de generación-neutralización de radicales libres entre las que destacan ciertas patologías cardiovasculares, cáncer, cataratas, artritis, degeneración muscular, problemas articulares, etc. (Hertog y cols., 1995). A continuación, se detallan algunos aspectos significantes de estas afecciones.

✓ Sistema cardiovascular

Los problemas en el sistema cardiovascular hacen que se vea favorecida la aparición de arterioesclerosis por el endurecimiento de las paredes arteriales. El endotelio es el responsable de mantener el equilibrio entre los procesos de trombosis-fibrosis y vaso dilatación-constricción. La oxidación por el exceso de radicales libres afecta a la pared endotelial, no pudiendo realizar sus funciones correctamente. La captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) se ve afectada también y por esta razón quedan en el torrente sanguíneo.

✓ Sistema nervioso

Los problemas de desequilibrio en el sistema nervioso provocan que el impulso nervioso se vea disminuido, al igual que los reflejos, la memoria y el aprendizaje, si disminuye la irrigación sanguínea a nivel del sistema nervioso se puede llegar a padecer demencia senil o aparición de Alzheimer.

✓ Tumores

Existe también un incremento del riesgo de desarrollar tumores debido a la acción de los radicales libres sobre los genes.

✓ Envejecimiento prematuro de la piel

La acumulación a lo largo de los años de radicales libres produce envejecimiento prematuro de la piel. Como consecuencia de esto, las membranas de las células epiteliales se modifican, y así se ve dificultada la nutrición de la piel. Por otro lado, también se ven dañadas las células de colágeno y elastina, y es cuando la piel pierde firmeza y elasticidad. El resultado es sequedad, falta de elasticidad y aparición temprana de arrugas y líneas de expresión.

#### **I.4.- DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

El estudio de la capacidad antioxidante de plantas medicinales y alimenticias ha crecido en las últimas décadas. Esto es debido a que un número importante de productos obtenidos de éstas, como los aceites esenciales, alcaloides y los polifenoles, poseen efectos antioxidantes los cuales son evidenciados mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* asociadas a cada uno de ellos.

Las medidas de la actividad antirradical se pueden clasificar mediante dos estrategias distintas o métodos de determinación, en función de la información que se desea obtener, en métodos directos o métodos indirectos.

##### **I.4.1.- Métodos directos**

Los métodos directos son aquellos en los que se involucra un sustrato oxidable y corresponden a moléculas o extractos naturales con actividad biológica, como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. Se basan en los efectos inhibitorios de una sustancia potencialmente antioxidante sobre la degradación oxidativa de ese sustrato en un sistema de ensayo sujeto a condiciones oxidantes naturales o aceleradas (Roginsky y cols., 2005; Laguerre y cols., 2007). Por lo general, los métodos directos presentan un mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno. Estos involucran una diana (sustrato oxidable), consistente normalmente en lípidos o mezcla de los mismos (Laguerre y cols., 2007), que es oxidada por la especie reactiva (radical o no radical) bajo estudio, y después de la oxidación se mide la forma oxidada de la diana. Una vez añadidos los antioxidantes estos van a competir con la diana por las especies reactivas produciendo la inhibición de la oxidación, ya que los antioxidantes reaccionarán con las especies reactivas, reduciéndoles de tal forma que no se seguirá produciendo la oxidación de la diana (Magalhaes y cols., 2008).

Las reacciones con mecanismos de transferencia de átomo de hidrógeno son dependientes del disolvente y son generalmente rápidos, completados de segundos a minutos (Prior y cols., 2005). Es importante tener en cuenta que los métodos de transferencia de átomo de hidrógeno son influenciados por diversas variables como la temperatura, el medio de reacción y el pH. También es necesario conocer las sustancias interferentes que pueden llegar a producir una sobrestimación o incluso falsos positivos (Laguerre y cols., 2007).

Según Antolovich y cols. (2002) la cuantificación de los resultados se realiza de las siguientes formas posibles:

- Medida de un punto a un tiempo fijado. Se cuantifica después de un intervalo de tiempo determinado.
- Medida de la velocidad de reacción.
- Medida de la fase de latencia (el tiempo en el que a bajas concentraciones de antioxidante, éste se consume totalmente en su acción con los radicales libres). Se cuantifica el tiempo en el cual la señal está extinguida durante la acción de los antioxidantes.
- Integral del tiempo de medida. Se cuantifica el área encerrada bajo la curva cinética.

En los métodos con mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno, los resultados se expresan en función de la sonda por decaimiento del sustrato, por consumo de oxígeno, por formación de productos de oxidación o por decaimiento de radicales libres (Antolovich y cols., 2002).

Entre los métodos directos se encuentran los ensayos **DPPH** (2,2-difenil-1-pirilhidrazilo), **ABTS** (*sal diamónica del Ácido 2.2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)*) y el **DMPD** (diclorhidrato de n, n-dimetil p-fenilendiamina).

El método DPPH es el método espectrofotométrico más utilizado, según la biografía revisada, basado en la transferencia de electrones y/o de hidrógeno que consiste en la reducción de una cantidad de radical DPPH<sup>+</sup> neutralizado por el extracto a una determinada concentración de antioxidante, expresado como porcentaje de inhibición.

Del método ABTS con TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity o capacidad antioxidante equivalente de trolox) también existe amplia bibliografía a lo largo de los años donde se hace uso de este método para la determinación de la capacidad antioxidante en muestras vegetales, lo que podría ser debido a su simplicidad, reproducibilidad y rapidez. El trolox es una sustancia oxidante que se usa como patrón para posteriormente poder comparar. Es un antioxidante, como la vitamina E, y es utilizado en aplicaciones biológicas o bioquímicas para reducir el estrés o daño oxidativo en múltiples ensayos.

Aunque es frecuente encontrar el método de reducción del radical DMPD en determinaciones de la capacidad antioxidante, los resultados no suelen ser tan satisfactorios como con los ensayos DPPH o el ABTS.

#### **I.4.2.- Métodos indirectos**

Los métodos indirectos consisten en la capacidad de una molécula de neutralizar radicales artificiales estables o reducir metales de transición que presentan generalmente un mecanismo de transferencia electrónica. Las propias especies reactivas (dianas), normalmente moléculas artificiales (Laguerrey cols., 2007), son empleadas como sonda en su forma reducida y se mide su cambio de color (Magalhaesy cols., 2008). La intensidad del cambio de color está relacionada con la concentración de los antioxidantes en la muestra en un tiempo determinado. En otras palabras, la presencia de radicales libres produce la pérdida o aparición de un reactivo, y por tanto, en presencia de un antioxidante se provoca el aumento o disminución de la señal. Este es el caso de métodos como **FRAP** (Ferricion Reducing Antioxidant Power o poder antioxidante reductor del hierro), **CUPRAC** (Cupric ion reducing antioxidant capacity o capacidad antioxidante reductora de iones cúpricos), métodos de reducción a un complejo traducidos en una coloración, o **Folin Cicoaltea**, ampliamente utilizado para la cuantificación de flavonoides.

Los ensayos FRAP y CUPRAC son métodos que proporcionan buenos resultados para realizar las mediciones de la actividad antioxidante en base a sus mecanismos. En particular, el ensayo CUPRAC se ha empleado para la determinación de la capacidad antioxidante de polifenoles, ácido ascórbico y tioles. El ensayo también se ha adaptado para al análisis de antioxidantes hidrofílicos como lipofílicos y para la determinación de la capacidad captadora de radical hidroxilo.

#### **I.4.3.- Otros métodos**

En la práctica se han desarrollado una gran cantidad de métodos para determinar la capacidad oxidativa de las sustancias presentes en diferentes tipos de sustratos. Las condiciones ideales que debe reunir un procedimiento para la determinación de la capacidad antioxidante son: tener un mecanismo químico definido y un punto final, evaluar reacciones de transferencia de electrones y de átomos de hidrogeno, ser adaptable para medir antioxidantes hidrófilos y lipofílicos (Romero, 2012).

Cada uno de los métodos tiene una característica única y las diferencias existentes se encuentran en la generación del sistema de radicales libres, en la diana molecular, en el punto final, la adecuación a antioxidantes lipofílicos o hidrófilos y en la relevancia fisiológica (Phipps y cols., 2007).

Debido a estas diferencias encontradas entre los métodos, es recomendable el empleo de al menos dos métodos ellos y más de un estándar para determinar la capacidad antioxidante de una determinada muestra o sustrato, ya que los antioxidantes responden de distintas maneras a las diferentes especies reactivas, en los distintos ensayos (Schlesier y cols., 2002).

Lo más importante es conocer desde el principio que no existe un método sencillo y universal por el cual se puede medir la capacidad antioxidante de forma precisa y cuantitativa (Prior y cols., 2005). Los procesos de oxidación presentan una gran complejidad porque no existe un método que refleje de forma completa el perfil del antioxidante, por lo cual utilizar varios métodos, puede facilitar la comparación de los resultados.

Otros métodos que tienen que ver con la evaluación de la capacidad antioxidante en especies vegetales que se han encontrado en esta extensa búsqueda bibliográfica y que pueden aportar información valiosa al respecto son: la determinación de antioxidantes mediante varios métodos cómo el método oficial de **AOAC** (Association of analytical chemists o asociación oficial de químicos analíticos) mediante **HPLC** (cromatografía líquida de alta eficacia) y el **método pH- diferencial**.

En relación a la determinación de la capacidad antioxidante en especies vegetales, el HPLC está entre los métodos analíticos más utilizados en la actualidad para el análisis de compuestos flavonoides. La determinación de anticianinas, flavonoides con extraordinario poder antioxidante, se realiza por el método del pH diferencial, ya que es una técnica espectrofotométrica basada en la presencia de pigmentos degradables polimerizados y de otros compuestos interferentes donde los cambios en la absorbancia pueden interpretarse como variaciones en el pH.

Existen también otros métodos que han sido desarrollados para la determinación de la capacidad antioxidante, que no pertenecen a ninguno de los grupos que hemos visto en este trabajo, como por ejemplo la **quimioluminiscencia** y la **electroquimioluminiscencia** (Tabart y cols., 2009). Son técnicas ópticas, que emplean la luminiscencia, la emisión de radiación (Vis/IR) que ocurre cuando una molécula en estado excitado se relaja radiactivamente a su estado fundamental (Vis/IR).

## **I.5.- IMPORTANCIA DE LA DETECCIÓN ANALÍTICA DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS Y SUS APLICACIONES**

En este trabajo nos referiremos a los términos de “capacidad antioxidante” y de “actividad antioxidante” como términos similares.

La evaluación de la capacidad antioxidante de los compuestos que constituyen los extractos de materiales liofilizados procedentes de especies vegetales, nos permitirá conocer algunas especies vegetales interesantes, siendo los compuestos con dicha actividad antioxidante los que tienen la capacidad de inhibir o interrumpir las reacciones de transformación que causan daños a las mencionadas biomoléculas.

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante de uno o varios compuestos. Por otra parte, lo que se pretende es la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo. El mecanismo de acción de los antioxidantes está basado en:

- La prevención de la formación de ROS.
- La interceptación del ataque de ROS.
- El secuestro de los metabolitos reactivos convirtiéndolos en moléculas menos reactivas.
- Facilitar la reparación del daño causado por ROS.
- Mantener un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.
- La amplificación de la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ROS. (Agudo, 2002).

El estudio de los extractos activos de los compuestos que pueden actuar como antioxidantes, resulta de gran importancia para la prevención de patologías, siendo un gran aporte para la medicina preventiva. Además, estos estudios presentan ventajas para la sociedad en general, dada su aplicación en:

- Productos farmacéuticos. Extractos antioxidantes utilizados como suplemento farmacéutico por ingestión, para la prevención de enfermedades asociadas al envejecimiento tales como el cáncer, enfermedades del corazón, y enfermedades neurológicas como el alzhéimer.
- Productos cosméticos. Se trata de la elaboración de cremas, geles y todo tipo de cosméticos aprovechando los principios activos.

- Conservantes alimentarios. Alternativa a los antioxidantes sintéticos utilizados actualmente como conservantes alimentarios.

## **CAPÍTULO II. TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN ESPECIES VEGETALES**

### **II.1.-INTRODUCCIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES E IMPORTANCIA EN SU ELECCIÓN**

La revisión bibliográfica realizada en este capítulo se ha centrado en el estudio de una selección de técnicas instrumentales utilizadas para cuantificar la actividad antioxidante de determinados compuestos presentes en especies vegetales. Como se ha comentado anteriormente, a lo largo de las últimas dos décadas, se han aplicado distintos métodos para su evaluación en diversas plantas medicinales y frutos por el gran interés que suscita la actividad antioxidante que genera su consumo, y sus posibles efectos beneficiosos para la salud humana así como para fomentar su uso.

Tanto la elección de las herramientas de medición, como las etapas de toma y tratamiento de la muestra, se relacionan con aspectos críticos de la investigación sobre la actividad antioxidante de productos naturales. Es por esto, que en el siguiente apartado se ha hecho una selección entre la gran variedad de los métodos de extracción que existen, que introduce la posterior evaluación de ensayos para la determinación de la actividad antioxidante.

### **II.2.- TRATAMIENTO DE LA MUESTRA**

Un plan de toma y preparación de muestra debe asegurar que la muestra obtenida refleje adecuadamente las propiedades que interesan del lote del que proviene, es decir, la muestra final debe ser tan similar como sea posible a la población global a analizar, poseer sus características esenciales y sobretodo, ser reproducible.

La preparación de la muestra va a depender de la naturaleza de la misma así como de la clase específica de compuestos antioxidantes que se desean analizar. De manera general, la primera etapa del pretratamiento consiste en, tras la recolecta de las hierbas o frutos, lavar con agua potable, realizar un baño antifúngico al 0.1% si fuera necesario, eliminar huesos, tallos y hojas y liofilizar la muestra hasta sequedad.

La función principal del liofilizado es separar el agua mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida. Es el mejor proceso para secar las muestras sin alterar su composición cualitativa o cuantitativa.

El proceso de liofilización se realiza a vacío y baja temperatura, de esta manera, es posible evitar la desnaturalización de las proteínas. Esta es una de las ventajas de la técnica, ya que el empleo de temperaturas muy bajas, permite aumentar la estabilidad y disminuir la pérdida y volatilización de sustancias del producto. Además, el producto final liofilizado queda con alta porosidad, ausencia de oxidación de la muestra, que se debe a la existencia de condiciones de vacío, y estéril. El contenido final de humedad que se obtiene en la muestra es menor o igual a 0.5%.

Puede ser necesario moler las especies vegetales en mortero y/o batidora y si no se fuera a trabajar con ellas inmediatamente, es primordial almacenarlas protegidas de la luz utilizando frascos color topacio, o cubrirlos con papel de aluminio. Si el análisis de las muestras se alarga en el tiempo, éstas se deben conservar en refrigeración o congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La no correcta conservación de las muestras puede dar datos que no se ajusten a la realidad y con ello resultados no concluyentes.

El rendimiento del proceso de extracción a cada extracto depende del disolvente y del método utilizado. La determinación de parámetros fisicoquímicos tales como humedad e índice de refracción y parámetros bacteriológicos, según lo establecido por la norma, aportan información que puede ser de gran ayuda a la hora de establecer el procedimiento apropiado (Rivas y cols., 2017). Además, hay que tener en cuenta que el número o la cantidad de compuestos oxidantes de una especie van a depender de factores tales como el estado de maduración de los frutos y la parte de la planta utilizada. El porcentaje de extracción de componentes antioxidantes suele ser mayor para los frutos maduros disminuyendo en el estado intermedio y por último el más inmaduro (Hernández y cols., 2015).

Paladino (2008), realizó un estudio donde se compararon distintos disolventes para la extracción de fenoles de las semillas de la uva, con el fin de obtener el extracto más concentrado en compuestos activos con la mínima degradación de su poder antioxidante durante el proceso de obtención. El extracto fue concentrado al vacío, y se verificó la conservación del poder reductor en el extracto concentrado. Los disolventes estudiados fueron: agua a  $90^{\circ}\text{C}$ , acetona 75% a  $30^{\circ}\text{C}$ , metanol al 70% y etanol al 20%, ambos a  $30^{\circ}\text{C}$ . Entre las concentraciones obtenidas hubo cambios significativos. Los disolventes que mayores extracciones lograron fueron el agua

seguido de la acetona. Se prefiere el empleo de agua como extractante por ser más económico, y porque su uso futuro será como aditivo para alimentos. Además, si el solvente seleccionado fuese acetona, debería eliminarse posteriormente del extracto. Por lo tanto, el escogido es el agua en las siguientes condiciones de extracción: 10 mL de solvente por gramo de semilla utilizada, temperatura: 90° C y 3 horas de tratamiento. Una vez seleccionado el disolvente más adecuado para la extracción, se analizó la cinética de extracción, optimizando el tiempo de tratamiento. (Paladino, 2008).

Jumbo y Guevara (2016) realizaron la determinación del contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de cinco hierbas aromáticas y esteviosido, uno de los azúcares obtenido naturalmente de la Stevia. Para ello, cada una de las hierbas aromáticas se trituran y tamizan con la finalidad de uniformizar las partículas y la obtención del extracto se realiza con nitrógeno líquido.

En este trabajo se lleva a cabo un estudio sobre la influencia del tratamiento de las muestras en la capacidad oxidante de las mismas. Para ello, se analiza paralelamente la capacidad antioxidante en muestras deshidratadas y el extracto en infusión de la hierba. Por otro lado, se estudió la viabilidad de la capacidad antioxidante en cada hierba fresca seleccionada (materia prima), en la etapa de la hierba desecada y en la molienda (figura 4). En el gráfico de la figura 4, se muestra en el eje vertical la capacidad antioxidante determinada con trolox en mmoles por cada 100 gramos de muestra frente a los tres tipos de tratamiento de muestra (eje x). Este análisis, basado en el poder reductor que se revisa en este trabajo posteriormente, ha servido para ver cuál es la manera más óptima de preparación de la muestra previa al análisis y donde se obtienen los mejores resultados. En los dos últimos tratamientos de secado y molienda parece haber mayor capacidad antioxidante de las hierbas frente a las muestras frescas o materia prima, en los cinco tipos de hierbas aromáticas estudiadas.

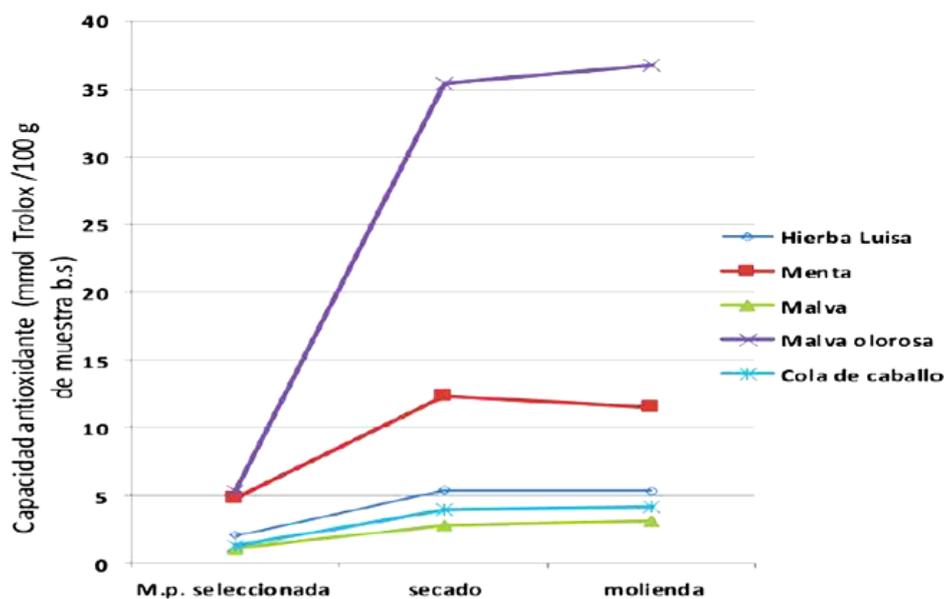


Figura 4. Variabilidad de la capacidad antioxidante de las hierbas en materia prima, secado y en la molienda (Jumbo y Guevara, 2016).

Álvarez (2008), en la preparación de extractos orgánicos de frutas nativas objeto de análisis, para el estudio del potencial antioxidante, optó por realizar en primer lugar una maceración en la oscuridad utilizando metanol, para pasadas 24 horas filtrar y evaporar el disolvente. Este concentrado de frutas, se somete a una extracción sólido-líquido en una segunda etapa con una mezcla de acetato de etilo que le va a facilitar obtener compuestos de mediana polaridad. Paralelamente, se prepararon extractos acuosos con una determinada cantidad de pulpa de fruta en maceración con agua destinado a los ensayos biológicos de cuantificación de la actividad antioxidante (Álvarez, 2008).

Genesis y Corrales (2014) para la formulación y elaboración de una bebida de romero y su determinación de la actividad antioxidante, prepararon tres muestras de extracto de la hierba por infusión a distintas concentraciones a una temperatura mayor a 75°C con una ligera agitación durante 10 minutos. La actividad antioxidante se mide con el método de inhibición del radical DPPH, que se desarrolla en el próximo apartado. Del resultado se concluye que a mayor concentración de extracto de romero mayor porcentaje de inhibición del radical (Genesis y Corrales, 2014).

Por otro lado, se preparó el extracto con un volumen conocido de metanol para la evaluación de la capacidad antioxidante, añadiendo una determinada cantidad de muestra seca y triturada. Esta solución se mantuvo en refrigeración 24 horas, para

filtrarla y obtener el extracto metanólico de romero. Aquí el porcentaje de inhibición obtenido es mucho mayor, aunque como se trata de elaborar una bebida de consumo humano, el extracto metanólico de romero solo ha servido para realizar la valoración de la capacidad antioxidante.

En otros trabajos de investigación para la determinación de antioxidantes en especies vegetales, sin embargo, se ha evitado el uso del agua para extraer o infundir las muestras, ya que se afirma, que se arrastra una gran cantidad de productos que podrían causar interferencias en los análisis (Sánchez y Trujillo 2013).

En este sentido, Ganesan y cols. (2008) evaluaron la capacidad antioxidante de extractos de tres algas rojas y concluyeron que las fracciones obtenidas del extracto crudo infundido con agua eran más activas que el propio extracto crudo, debido precisamente a la presencia, de una mayor cantidad de “sustancias interferencia” (Ganesan y cols., 2008).

Se han publicado muchos artículos sobre la eficacia de los disolventes en la extracción de polifenoles de especies vegetales, en los que se concluye que se obtiene un mayor rendimiento de extracción a medida que aumenta la polaridad del disolvente (Hayouni y cols.). Es por ello que para la preparación de los extractos en la determinación de polifenoles se debe hacer una extracción selectiva (Sánchez y Trujillo, 2013).

En la determinación de nuevos antioxidantes naturales como la artemisia canaria, la hierba ratonera, el llantén el oro o el tuno indio, Sánchez & Trujillo (2013), realizaron una evaluación de los distintos disolventes orgánicos (hexano, acetona, etanol y metanol) para seleccionar el óptimo. Para ello, se utilizó una determinada cantidad de *artemisia canaria* liofilizada y su correspondiente dilución en cada disolvente. Se determinó la capacidad antioxidante con el ensayo FRAP (ferric reducing power assay), el cual se describe posteriormente en esta memoria, basado en una reacción de reducción del Fe(III) a Fe(II). Se obtuvo una mayor reducción de Fe para dos concentraciones del extracto, es decir, mayor actividad antioxidante, utilizando metanol, como se puede observar el gráfico en la figura 5, en comparación con el resto de disolventes. La efectividad del metanol respecto a los demás disolventes estudiados se puede ver claramente (figura 5). Por ello, todas las especies vegetales que se estudiaron en este trabajo se sometieron al mismo proceso de extracción utilizando metanol, disolviendo 1 gramo de material seco liofilizado en 18 mL de metanol.

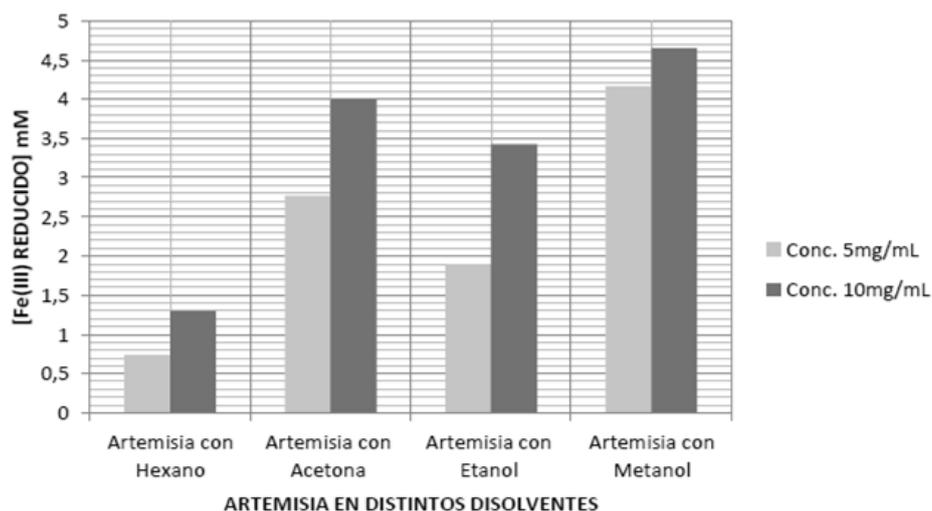


Figura 5. Efecto del disolvente y de la concentración del extracto de Artemisia canaria en la reducción del Fe III a Fe II (Sánchez y Trujillo, 2013)

Rivas y cols. (2017) también evaluaron el mejor disolvente de extracción en su determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en extractos de cuatro especies de orégano: *Lippia origanoides*, *Plectranthus amboinicus* (Lour), *Plectranthus amboinicus* (variegatus) y *Origanum vulgare*. Las proporciones fueron: 1: Maceración con 75 % de etanol rotoevaporada; 2: maceración con 75% de metanol rotoevaporada; 3: maceración con mezcla de 50% hexano y metanol 50% rotoevaporada; 4: Soxleth con 75 % de etanol rotoevaporado; 5: Soxleth con 75% de metanol rotoevaporada; 6: Soxleth con mezcla de 50% hexano y metanol 50% rotoevaporada. Además, a cada extracto rotoevaporado obtenido por cada método de extracción se le determinó el rendimiento en base a la diferencia de peso del extracto seco, con el fin de garantizar la factibilidad del proyecto.

Las concentraciones de polifenoles totales resultó ser distinta según el tipo de solvente (utilizando el método Folin Cicoalteu de acuerdo a la metodología que se describe posteriormente en este trabajo). Las mayores concentraciones para todas las especies fueron las obtenidas con el método de extracción que emplea maceración en una mezcla de 75% de metanol y 25% de agua, por lo que con estos valores se completa la información y se certifica que el mejor método de extracción manteniendo las condiciones de rendimientos y propiedades fisicoquímicas además de su capacidad antioxidante es la maceración con metanol y agua.

### II.3.- DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL ENSAYO DPPH (2,2-DIFENIL-1-PIRILHIDRAZIL)

El DPPH es uno de los pocos radicales orgánicos nitrogenados estables y disponibles comercialmente. El ensayo se basa en evaluar la capacidad de los antioxidantes para reducir el radical DPPH, que puede ser medido por resonancia spin electrón o por decrecimiento de longitud de onda 515 nm. El método de la decoloración fue propuesto en 1995 por Brand-Williams, Cuvelier, and Berset, y mide la actividad antioxidante de los compuestos a través de la pérdida de color del DPPH a 515 nm después de la reacción del mismo con dichos compuestos, mediante un espectrofotómetro. Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición que se calcula en base a la siguiente fórmula:

$$\% = \left( 1 - \frac{Ab}{Ab0} \right) \times 100 \quad (1)$$

Ecuación 1. Determinación del porcentaje de inhibición del radical DPPH

siendo la absorbancia inicial (Ab) la máxima correspondiente a la disolución inicial del radical de DPPH, y la absorbancia final (Ab0), la correspondiente a la disolución del radical DPPH al que se le ha añadido el extracto o los antioxidantes en el estudio.

Una vez que se determina el valor del porcentaje de inhibición de cada una de las concentraciones, se procede a realizar una regresión lineal con dichos valores, de tal manera se obtiene la siguiente ecuación:

$$y = mx + b \quad (2)$$

Ecuación 2. Ecuación de la recta

A medida que se produce la reacción con el antioxidante, el color cambia de violeta a amarillo por la formación de DPPH (figura 6). Esta reacción es estequiométrica respecto de la cantidad de hidrógenos sustraídos.

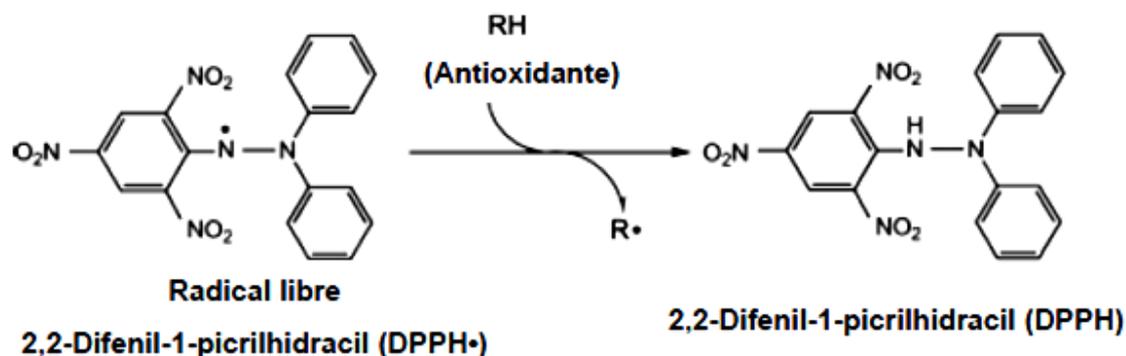


Figura 6. Reacción entre el radical 2,2-Difenil-1-picrilhidracil y un antioxidante para formar el 2,2-Difenil-1-picrilhidracil

Para la reparación de la disolución 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH) 0,1 mM de fórmula molecular  $C_{18}H_{12}N_6O_5$  se pesa la cantidad necesaria y se diluye con metanol en un matraz aforado del volumen que sea necesario. Puesto que la disolución queda bastante opaca, se introduce en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos y después se pone en un agitador magnético 15 minutos más para asegurar que se disuelve completamente.

Por norma general, los resultados se expresan en porcentaje de inhibición (Seeram y cols., 2008) o referidos al trolox, como  $\mu\text{mol}$  de trolox equivalente/100 g (Moon y Shibamoto, 2009).

La accesibilidad estérica del radical  $\text{DPPH}^{\bullet+}$  (figura 7) es un importante factor determinante de la reacción, ya que pequeñas moléculas que tienen un mejor acceso al sitio radical, tienen una capacidad antioxidante relativamente más alta (Magalhaes y cols., 2008).

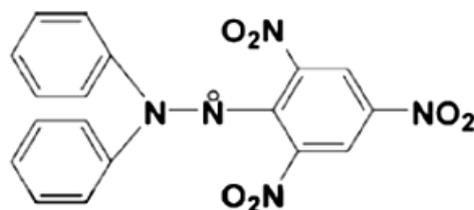


Figura 7. Estructura química del catión radical  $\text{DPPH}^{\bullet+}$ .

Adaptado de Huang y cols., (2005).

La interpretación se complica cuando los compuestos del ensayo tienen un espectro que se superpone al del DPPH a 515 nm. Los carotenoides, en particular,

interfieren (Prior y cols., 2005). Además, la monitorización del DPPH•+ es una reacción lenta que puede tardar desde 20 minutos hasta 6 horas (Magalhaes y cols., 2008).

El ensayo es técnicamente sencillo y rápido y sólo necesita un espectrofotómetro UV-Visible, lo que podría explicar su amplio uso en la detección de antioxidantes. Los análisis de un gran número de muestras pueden hacerse mediante el uso de microplaca (Karadag y cols., 2009)

El procedimiento original para el ensayo DPPH•+ ha sido adoptado por muchos laboratorios y a pesar de que existen modificaciones a conveniencia, ha revelado que la mayoría de los estudios están basados en un tiempo de reacción de 20-30 min en vez de un tiempo de reacción total de 120 minutos requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox. Por lo tanto, se comienza la medición en el espectrofotómetro desde que cae la primera gota de DPPH y se deja que se produzca la reacción de inhibición durante 1200 segundos.

En el trabajo de Génesis y Corrales (2015), donde se proyecta la elaboración de una bebida a base de romero y se determina su capacidad antioxidante con el método DPPH, se pudo comprobar una gran capacidad inhibidora de radicales libres. A una longitud de onda de 517 nm, donde presenta su máxima absorción, se realizaron 100 mediciones de 30 segundos. Por un lado, 50 µL del extracto metanólico de romero con 2 mL del radical DPPH y por otro, el extracto obtenido por infusión a distintas concentraciones.

Los resultados fueron satisfactorios, ya que en las pruebas realizadas se detectaron grandes cantidades de antioxidantes en el extracto a partir de la metodología aplicada, lo que concluye una alternativa para la industria alimentaria en producción de bebidas a base de romero con un alto porcentaje de inhibición de radicales libres.

Acosta y Díaz(2016), al evaluar la capacidad antioxidante en la pulpa y cáscara de la guanábana (*Annona Muricata L.*), también por el método del DPPH, se encontraron altas concentraciones de actividad antioxidante.

En disoluciones de concentraciones crecientes de los extractos, evaluando por un lado la pulpa y por otro la cáscara (figura 8), se determinó la inhibición del secuestro del radical DPPH por el método clásico a 517 nm. Los resultados expresados en función del patrón, µmoles equivalentes de trolox/100 gr de muestra,

reflejaron el aumento en el porcentaje de inhibición al aumentar la concentración de la muestra .

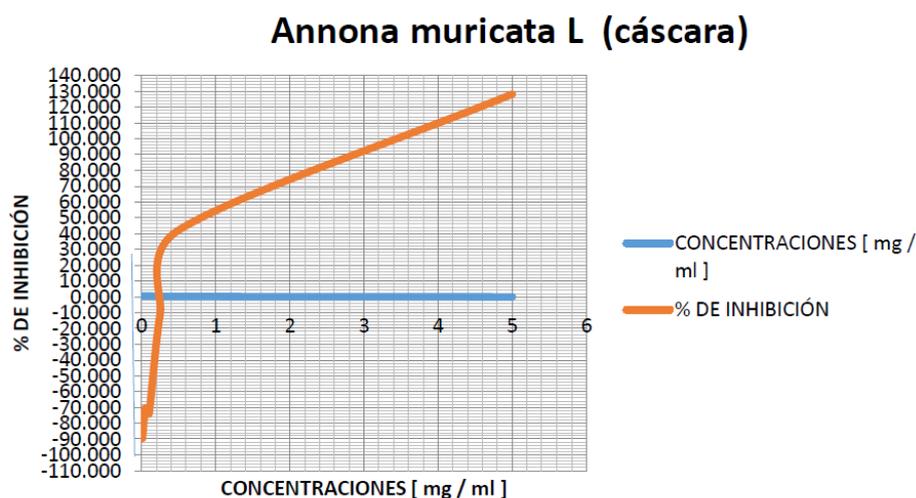


Figura 8. Porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de la cáscara *Annona muricata L.*(Guanábana) Acosta y Díaz (2016).

Además se concluyó que el contenido evaluado y encontrado en grandes cantidades de vitamina C, contenido de fenoles totales y taninos analizados previamente, pueden ser los responsables de la actividad antioxidante obtenida utilizando el método DPPH.

En otro trabajo de investigación se evaluó la actividad antioxidante en 18 especies vegetales con propiedades medicinales (Aguirre y cols., 2013), muchas de ellas con actividad antioxidante desconocida por falta de información científica, recolectadas en Matagalpa (Nicaragua) través del ensayo DPPH. Las especies vegetales en cuestión fueron las siguientes: *begonia sericoneura L.*, *brusera simaruba*, *Moringa oleífera L.*, *heliotropium indicum L.*; *chenopodium ambrosioides L.*; *mimosa púdica L.*; *ruta graveolens*; *symphytum officinale*; *senna alata L.*; *tillandsia usnoides*; *pluchea caroliensis*; *ricinus communitis*; *costus pulverulentus C.*; *myroxylon balsamum L.*; *petiveria alliacea L.*; *quassia amara*; *gliricidia sepium*; *phyla dulcis*.

A cada extracto se le sometió al método de identificación DPPH para determinar si poseen o no actividad antioxidante a través de sus absorbancias mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 517 nm. Las plantas que denotaron coloración y un porcentaje de inhibición más alto poseen diferentes tipos de polifenoles, que le confieren la actividad antioxidante y por ende poseen mayor actividad eliminando o disminuyendo los radicales libres ayudando a combatir

diferentes enfermedades como cáncer y enfermedades degenerativas. Las especies que denotaron mayor actividad antioxidante fueron: *quassia amara*, *phyladulcis*, *heliotropium indicum L.*, *bursera simaruba*.

Además, tras la experiencia en el estudio, se llegó a la conclusión que se debe preparar el DPPH en el momento en que se va a realizar el ensayo para evitar una posible decoloración y oxidación de la solución, dato que reproducen otros autores en su desarrollo experimental (Aguirre y cols., 2013).

Entre las formas de expresar los resultados en el ensayo DPPH, Repo y Encina (2008), en la determinación de la capacidad antioxidante de los componentes bioactivos en frutas nativas peruanas (aguaymanto, tomate de árbol, papaya de monte y tuna) expresan el resultado como porcentaje de decoloración  $IC_{50}$  y lo calculan estableciendo una relación lineal entre la concentración de la muestra y el porcentaje de decoloración. En el gráfico de la figura 9 se observa la expresión de  $IC_{50}$  de ensayos de capacidad antioxidante.

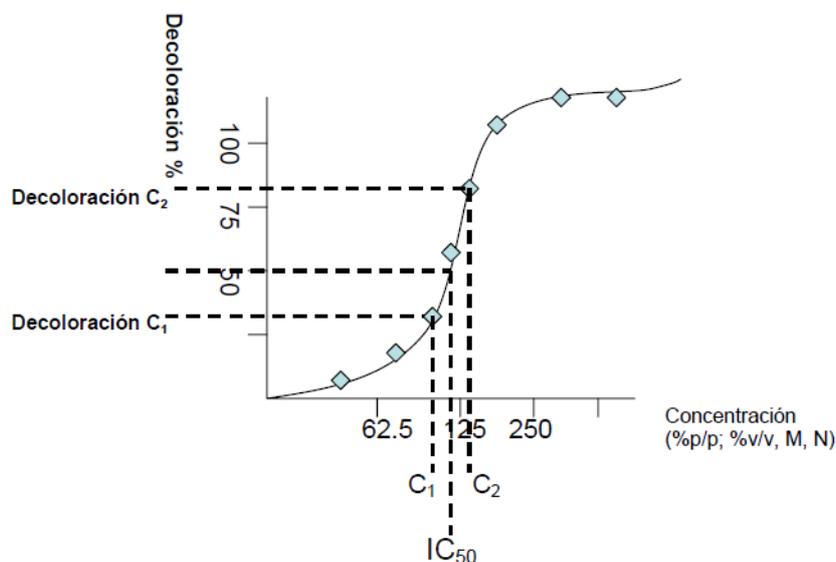


Figura 9. Expresión de  $IC_{50}$  de ensayos de capacidad antioxidante(Repo y Encina,2008).

Vemos en el gráfico que se trata de una curva sigmoide en la que existe una relación lineal de una zona comprendida entre un rango de concentraciones  $C_1$  y  $C_2$  y sus porcentajes de decoloración. Al seleccionar este rango es posible calcular el efecto de las sustancias evaluadas, en la captura del 50% de los radicales libres presentes en la reacción en base a su relación lineal.

Para expresar la capacidad antioxidante como  $IC_{50}$  se identifican las concentraciones de sustancia que producen una captura superior e inferior al 50% de

los radicales libres, y se interpola a la concentración que es responsable del 50% de la captura de DPPH.

Para el efecto se utilizan las siguientes expresiones matemáticas:

$$a = \frac{\text{Decoloración Conc 2} - \text{Decoloración Conc 1}}{\text{Conc 2} - \text{Conc 1}}$$
$$b = \text{Decoloración Conc 1} - a * \text{conc 1}$$
$$IC_{50} = \frac{50-b}{a}$$

Donde Conc 1 es la más alta concentración que da menos del 50% de actividad que el control, y Conc 2 es la más baja concentración que da más del 50% de la actividad que el control (Repo y Encina, 2008).

En este ensayo la mayor capacidad antioxidante medida con trolox, por el método del DPPH fue el de la papaya de monte seguido por el tomate de árbol, el aguaymanto y finalmente la tuna roja (en equivalente trolox/g de tejido) (Repo y Encina, 2008).

#### **II.4.-DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR ABTS**

Es uno de los métodos más empleados donde el radical más ABTS (Sal diamónica del Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) que es un sustrato tipo peroxidasa, al ser oxidado por radicales peroxilo u otros oxidantes, genera un radical metaestable que es intensamente coloreado (Karadagy cols., 2009), el cual presenta varios máximos de absorbancia a varias longitudes de onda 415, 645, 734, y 815 nm (Prior y cols. 2005). La acción de los antioxidantes provoca la reducción del catión radical (provocando su decoloración), midiéndose el decaimiento de la absorbancia frente a la absorbancia inicial del catión. La captación de radicales libres es el principal mecanismo de acción, por lo que se trata de una reacción de transferencias de electrones.

La capacidad inhibidora del catión-radical ABTS•+ suele compararse con el trolox, antioxidante comercial e hidrosoluble análogo a la vitamina E.

Existen varias versiones de este método que varían sobre todo en la generación del catión radical, en la longitud de onda de la medida y en el orden en el cual se ponen los reactivos.

En la primera versión se emplea metilmioglobina en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Con este tipo de oxidación, la adición de los antioxidantes es previa a la obtención del catión radical; estos antioxidantes podían interferir en la generación del radical (Magalhaes y cols., 2008).

En la segunda versión la generación del radical se lleva a cabo por dióxido de manganeso en exceso y se emplea tampón salino fosfato PBS (*Phosphate Buffer Saline*) como disolvente (Schlesier y cols., 2002).

Una de las mayores ventajas del ABTS•+ es que es soluble en agua y en disolventes orgánicos, lo que le permite detectar antioxidantes hidrófilos y lipófilos (Karadag y cols., 2009). Se puede utilizar en la ordenación de antioxidantes, además es simple, sencillo y automatizable (Prior y cols., 2005).

Entre sus mayores inconvenientes están su potencial de electrodo de 0,68 V, que permite que muchos compuestos puedan reducir el catión radical (Magalhaes y cols., 2008), y que el ABTS•+ es un catión que se degrada lentamente en las condiciones experimentales (Stratil y cols., 2006). Además, no está claro el valor de TEAC en relación con el número de electrones transferidos (Prior y cols., 2005).

El procedimiento desarrollado por López (2015) para determinar los compuestos bioactivos en bebidas con capacidad antioxidante, se realizó con el método ABTS. Una vez se prepara el catión radical, se realiza una dilución con PBS a pH 7,4 para la absorbancia del catión radical a 734 nm siendo 0,800 ± 0,020 (aproximadamente 1ml a 80 ml). La dilución del radical ABTS•+ se trasladó a tubos de ensayo, 4 ml en cada tubo, que se protegieron de la luz lo máximo posible. Como estándar se empleó trolox y se realizó una curva de calibrado de 3,90·10<sup>-3</sup>-1,75·10<sup>-2</sup>mM, diluido en metanol.

Se mide el decaimiento de la decoloración a 734 nm, 30 minutos después de añadir el trolox, frente a PBS. Los resultados se calcularon en porcentaje de inhibición con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{Abs_0 - Abs_{muestra}}{Abs_0} * 100$$

Los resultados de las muestras se expresaron en mmol de trolox equivalente por litro de muestra. En la figura 10 se puede observar oxidación del ABTS•+ con persulfato potásico y reducción del catión radical por parte de los antioxidantes. En el análisis de los néctares en la valoración global presentaron elevada capacidad de inhibición del radical por el efecto de antioxidantes.

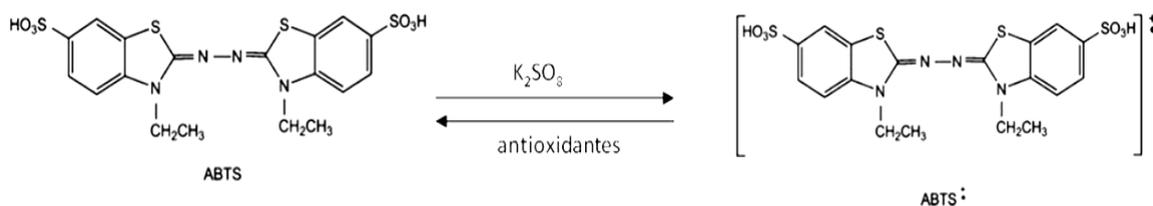


Figura 10. Oxidación del ABTS•+ con persulfato potásico y reducción del catión radical por parte de los antioxidantes (Moon y Shibamoto, 2009).

Palacios (2017), en la determinación de la capacidad antioxidante de bayas y frutos del bosque, aplicó los métodos espectrofotométricos DPPH y ABTS•+ expresando ambos resultados en mmoles de trolox/100 gramos de extracto seco. El ensayo de ABTS se determinó según el procedimiento descrito por Gouveia y Castilho (2011) con alguna modificación para adaptarlo de los compuestos analizados, dos especies de frutos silvestres las majoletas y los madroños.

El procedimiento para generar el radical ABTS•+ está basado en el desarrollado por Ramírez, (2011).

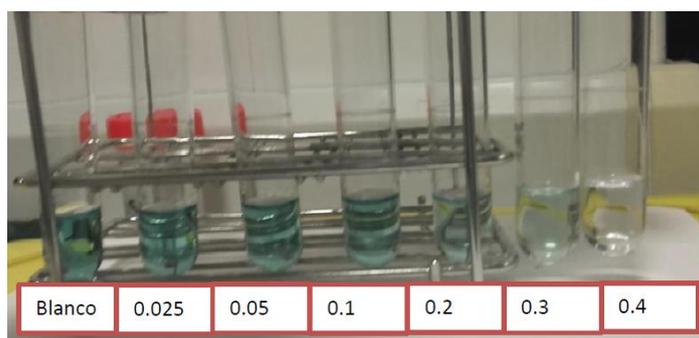
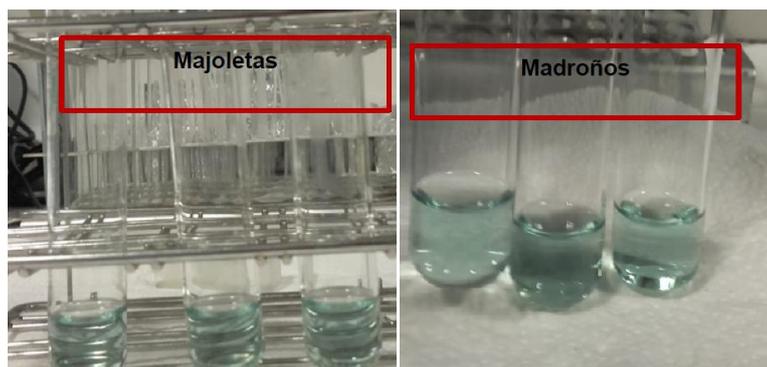


Figura 11. Ensayo ABTS en diferentes concentraciones de trolox (mM) (Palacios 2017).

En la imagen de la figuras 12 y 13 se puede observar una batería de diluciones de trolox, donde disminuye la intensidad del color al aumentar la concentración de trolox en las muestras procesadas de majoretas y madroños.



Figuras 12 y 13. Ensayo ABTS en muestra de Majoletas y Madroños (Palacios, 2017).

Los resultados se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a trolox (en mM o  $\mu$ M) o bien en VCEAC, actividad equivalente a vitamina C (mg/L o mg/100 g).

Este procedimiento descrito en esta investigación viene a completar la escasa información disponible en bibliografía sobre estos frutos silvestres. Los resultados obtenidos indican que dichos frutos serían una buena alternativa a otros alimentos, pudiendo incorporarlos en la dieta habitual, lo que contribuirá a la revalorización de los mismos.

## **II.5.-MÉTODO DE REDUCCIÓN DEL RADICAL DMPD (DICLORHIDRATO DE N, N-DIMETIL P-FENILENDIAMINA)**

Está basado en la generación de un radical que se genera por oxidación del diclorhidrato de N, Ndimetil-p-fenilendiamina (DMPD) con cloruro férrico, en medio ácido, que es estable a los diez minutos. Este catión presenta un máximo de absorbancia a 505 nm. Al añadirle los antioxidantes, éstos son capaces de donarle un protón, lo que provoca una inhibición de la absorbancia (Fogliano y cols., 1999).

En algunos estudios se afirma que el mecanismo que presenta este método es de transferencia electrónica (Huang y cols., 2005) y no de transferencia de hidrógeno, como se planteó en un principio, al igual que el TEAC. Consiste en medir la absorbancia a 505 nm en una cubeta de plástico y medir la inhibición de la absorbancia, expresándolo en referencia al trolox (Fogliano y cols., 1999).

En la realización del método DMPD en zumos de frutas, fueron observados valores muy elevados en comparación con otros métodos empleados para la evaluación de la capacidad antioxidante, por Pernice y cols. (2000) y Gil y cols. (2000). Para buscar una explicación, Gil y cols. (2000) fragmentaron una serie de muestras,

concretamente zumo de granada, mediante columnas de intercambio iónico y obtuvieron que la fracción acuosa donde se encontraban los ácidos orgánicos que presentaba mayor capacidad antioxidante con respecto a este método y no con los otros métodos utilizados (FRAP y DPPH). Además, mediante otro ensayo se determinó que el ácido málico y el ácido tartárico eran capaces de neutralizar al  $\text{DMPD}^{\bullet+}$ , pero en mucha menor medida que el ácido cítrico. Pernice y cols. (2009) indicaron que como el método reflejaba la capacidad de neutralizar hidrógenos donadores, ya que éste es el mecanismo químico que se pensó que el método tenía en un principio, les indujo a pensar que el ácido cítrico le podía donar un átomo de hidrógeno produciendo su reducción.

Otra explicación posible podría deberse al hecho de que el ácido cítrico es un buen quelador de metales y debido a la presencia de ion ferroso en la solución de catión radical, el ácido cítrico podría haberlo retenido, provocando que el equilibrio con el ion férrico/ferroso se desplazase hacia la formación de este último, lo que pudiese haber provocado la inhibición del catión radical (Decker, 2002).

Se ha propuesto una modificación del método empleando persulfato potásico como oxidante para obtener el catión radical, ya que la presencia de metales en las muestras de vegetales puede contribuir a la oxidación de  $\text{DMPD}$  y, por tanto, causar una desviación negativa de los valores reales de antioxidante.

La presencia de Fe (II) y otros metales en las frutas y las muestras de vegetales puede aumentar la producción de las ROS a través de una reacción tipo Fenton, además la estabilidad del  $\text{DMPD}^{\bullet+}$  también podría ser cuestionada en vista de la vulnerabilidad de la disolución de hierro que se utiliza para la generación del catión radical por oxidación del aire (Asghar y cols., 2007).

Un ejemplo del procedimiento para la reducción del radical  $\text{DMPD}$  se puede ver en la aplicación de diversos métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en pulpa de frutos que realizan Kuskoski y cols. (2005). Se determina la actividad antioxidante aplicando el método propuesto por Fogliano y cols. (1999) el cual consiste en una determinación de la vitamina C. Para ello, se añade 1 mL de la disolución de  $\text{DMPD}$  100 mM a 100 mL de disolución tamponada con ácido acético/acetato de sodio 0,1 M (pH 5,25). Tras la adición de 0,2 mL de una disolución de cloruro férrico 0,05 M (concentración final de 0,1 mM) se forman radicales cationes coloreados ( $\text{DMPD}^{\bullet+}$ ). Un mililitro de esta disolución se traslada a una cubeta midiéndose su absorbancia, comprendida entre 0,90 ( $\pm 0,1$ ), a 506 nm. A continuación

se añaden 50  $\mu\text{L}$  de una disolución patrón de antioxidante o de muestras diluidas y transcurridos diez minutos (a  $25^{\circ}\text{C}$ ), se hace otra medida de absorbancia a 506 nm. La disolución tamponada de acetato se utiliza como blanco de referencia.

La actividad antioxidante es dependiente de la concentración del extracto. Los resultados obtenidos en este caso de DMPD no son consistentes con los obtenidos mediante los ensayos de la ABTS y DPPH que se realizaron paralelamente.

## **II.6.-MÉTODO DE FOLIN- CICALTEU**

Los polifenoles, en general, se han estudiado con la intención de encontrar compuestos que protegen a los seres vivos del estrés oxidativo y del daño inducido por los radicales libres. En la actualidad se sabe que los polifenoles pueden interferir en las etapas de propagación radicalaria en cadena destruyendo los radicales libres (Meo y cols., 2013). Los ácidos fenólicos y los flavonoides, son los compuestos fenólicos más abundantes en la dieta (30 y 60 % del total, respectivamente) (Gómez, 2010).

Los mecanismos por los que actúan todos estos compuestos varían dependiendo de su concentración y del tipo de compuestos presentes en los alimentos (Pedrielli y Skibted, 2002).

El método de Folin Ciocalteu es el más utilizado para la determinación de este tipo de antioxidantes y se fundamenta en el carácter reductor que este posee.

Este método es muy utilizado debido a su simplicidad, a la disponibilidad comercial del reactivo, y por ser un procedimiento ya estandarizado. Está basado en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes, (reactivo de Folin-Ciocalteu a pH básico), dando lugar a una coloración azul que posee una absorción máxima entorno a 765 nm, que puede ser determinada espectrofotométricamente. Este reactivo contiene una mezcla de molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con los compuestos fenólicos presentes en la muestra, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico (Gutiérrez y cols., 2008). El molibdeno es reducido en el complejo mediante la reacción de transferencia de electrones entre el Mo (IV) y el reductor como se muestra en la figura 14 (Huang y cols., 2005).

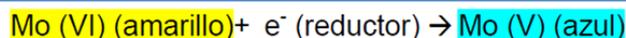


Figura 14. Reacción de transferencia de electrones entre el Mo (IV) y el reductor (Huang y cols., 2005).

Los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico de color amarillo, al ser reducidos por los compuestos fenólicos, dan lugar a complejos de color azul intenso de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula.

El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total.

La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico. Una manera de determinar los polifenoles totales es expresarlos como equivalentes de ácido gálico (de acuerdo al método 952.03 descrito por la AOAC, 2000). Se trata de un método preciso y sensible, que puede padecer numerosas variaciones, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción.

Este ensayo de análisis de los polifenoles totales se utiliza con frecuencia en el estudio de las propiedades antioxidantes de alimentos vegetales, como zumos de fruta, al tratarse de un parámetro que generalmente, muestra una estrecha correlación con los diferentes métodos de medición de la actividad antioxidante.

Barrera, (2011) aplicó este procedimiento a los extractos de cuatro frutos de interés comercial (*Averrhoa carambola* L., *Vitis labrusca*, *Bactris minor*, *Vaccinium meridionale* SW) por triplicado, para la evaluación de la actividad antioxidante de los mismos.

A los extractos estudiados con mayor cantidad de fenoles totales se les atribuyen altas concentraciones de antiocianinas y otros fenoles (Gaviria y Montoya y col., 2009; Garzón y col., 2010). Esto demuestra que existe correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales. Al observar el contenido de fenoles totales de una de las semillas estudiadas, la semilla de *Vitis labrusca* y su capacidad antioxidante equivalente obtenida en este método, y por los métodos ABTS

y DPPH, también realizados en este estudio, así como con los otros frutos que tienen un contenido de fenoles menor, coincide con una actividad antioxidante menor. Por otra parte, los frutos pigmentados de colores oscuros como el rojo o morado (en éste caso *Vaccinium meridionale*, *Elaeisoleifera*, *Vitis labrusca*) tienen una mayor cantidad de fenoles respecto a los frutos de colores pálidos, razón por la cual también se relacionan dichos frutos oscuros como potentes antioxidantes (García y cols., 2004).

En este contexto, Rivas y cols., (2017), en la determinación de compuestos fenólicos en extractos de cuatro especies de orégano a través del método de Folin-Ciocalteu, de acuerdo a la metodología descrita, midieron la cantidad de polifenoles a los extractos rotaevaporados y sin rotaevaporar. El objeto es verificar la influencia de la temperatura en la rotaevaporación sobre la concentración de polifenoles totales. La concentración de polifenoles se expresó como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de orégano seco. Tomando en cuenta que las mejores condiciones se obtienen utilizando metanol- agua, y que el metanol es considerado tóxico para el ser humano, sugieren realizar pruebas futuras con la mezcla de etanol-agua variando sus proporciones.

Resulta que no solo influye la concentración del extracto rotaevaporado, sino también las condiciones ambientales intervienen para obtener la mayor concentración de polifenoles, la constante dieléctrica de los solventes y el método de extracción, puesto que a mayor constante dieléctrica mayor será la concentración de polifenoles (constante dieléctrica del metanol es de 32,6 y la del etanol 24,3). A partir de los datos obtenidos en la cuantificación de compuestos fenólicos en este método, les ha servido para así aplicar otros métodos de determinación de la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) a los extractos que presentaron mayor concentración de polifenoles.

La determinación del contenido total de flavonoides se realiza más comúnmente empleando métodos basados en la espectrofotometría de ultravioleta-visible (Ulubele y cols., 2005). La determinación de flavonoides puede ser expresada como porcentaje de quercetina según el método espectrofotométrico descrito por Kostennikova (1983). Este método se desarrolló de acuerdo a la comparación de los flavonoides contenidos en la muestra utilizando la quercetina flavonoide de referencia.

Se distinguen dos procedimientos espectrofotométricos que determinan la formación de complejos de aluminio para la determinación del contenido total en flavonoides en alimentos y en plantas de diferentes familias.

En el primer procedimiento, se añade  $\text{AlCl}_3$  en un intervalo de concentración de 2-10 % (m/v) en una solución ácida. Las medidas espectrofotométricas se realizaban después de 2-60 minutos a una absorbancia máxima de 404 nm, tras la adición de  $\text{AlCl}_3$ . Se utilizan diferentes patrones internos (quercetina, rutina, galangina...).

En el segundo procedimiento, la reacción de complejación se lleva a cabo en presencia de  $\text{NaNO}_2$  en medio alcalino. El método estaba basado en la nitración de cualquier anillo aromático que lleve un grupo catecol. Después de añadir  $\text{Al(III)}$  se formó un complejo de color amarillo que se volvió rojo tras la adición de  $\text{NaOH}$ . El valor de la absorbancia se midió a 510 nm. En este procedimiento se prefiere la catequina como patrón interno.

La aplicación de ambos procedimientos a muestras naturales daba diferentes resultados en cuando a su contenido de flavonoides. Por lo tanto, el contenido de la expresión “total de flavonoides” no es adecuada. Los resultados de los dos métodos dependen de la estructura de los flavonoides presentes en las muestras (Pękal y Pyrzyńska, 2014).

Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides, son (figura 15):

- Presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
- Doble ligadura, en conjunción con la función 4- oxo del anillo C.
- Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante.

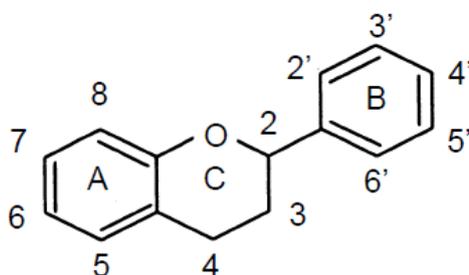


Figura 15. Estructura molecular del Flavonoide

La capacidad antioxidante de los flavonoides depende, entre otros factores, de su capacidad de eliminar el hierro, y de hecho se ha comprobado recientemente en células U937 (modelo de línea celular humana establecida a partir de un Linfoma) tratadas con el agente tóxico terbutilhidroperóxido, que aun a muy bajas concentraciones, son capaces de evitar la rotura y la oxidación del ADN, y que una parte importante de su potente acción protectora está relacionada directamente con su lipofilicidad (Sestili y cols., 2002).

Acosta y Díaz (2016) realizaron de una manera sencilla la determinación de fenoles totales con el método de Folin-Ciocalteu, para la identificación y cuantificación de antocianinas presentes en la cáscara de la guanábana. Se preparó una solución patrón de 0.1 mg/mL de ácido gálico a partir de la que se prepararon las diluciones para obtener la curva patrón. A 200  $\mu$ L del extracto etanólico reconstituido correspondiente mente, se le agregaron 1.5ml de agua destilada, 100  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de 5 minutos se agregaron 200  $\mu$ L de solución de carbonato de sodio al 20 %, se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente o 30 min a 40°C en oscuridad. Posteriormente se midió la absorbancia a 765 nm.

La concentración de fenoles se calculó con la curva de calibración del ácido gálico y se expresó como mg equivalentes de ácido gálico/mL. Resultaron presentes fenoles totales en pulpa en cantidades representativas y en cambio en la cáscara mayor contenido.

## **II.7.- MÉTODO DE PODER ANTIOXIDANTE REDUCTOR DEL HIERRO (FRAP)**

Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado. Cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción, mayor la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$ , y más alta la señal de absorbancia. El complejo va a poder ser reducido por productos con potenciales redox menores a 0.7V (potencial redox del  $\text{Fe}^{3+}$  -TPTZ). Debido a que el potencial redox del  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ es comparable con el del ABTS, se pueden analizar compuestos similares con ambos métodos, aunque las condiciones de la reacción sean distintas. El mecanismo del FRAP es de transferencia de electrones, a diferencia de otros métodos donde se produce captura de radicales libres. Según esto, el FRAP puede ser útil, en

combinación con otros métodos, en la determinación de la capacidad antioxidante de productos que contengan distintos tipos de antioxidantes.

El ensayo FRAP mide la capacidad antioxidante basada en la capacidad de reducción del ion férrico, por tanto, los antioxidantes que actúan como neutralizadores de radicales (de transferencia hidrógeno), en particular los tioles y los carotenoides, no se determinan (Magalhaes y cols., 2008).

El poder reductor se basa en la reducción por parte de los antioxidantes del ferricianuro a su forma reducida obteniéndose el complejo coloreado azul Prusia (figura 16). Es necesario estabilizar el ferrocianuro con iones férricos (Berker y cols., 2010).

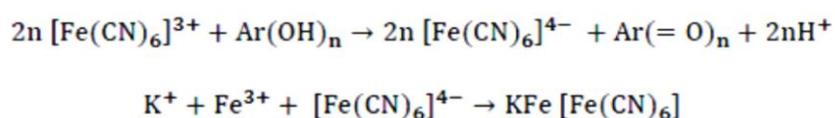


Figura 16. Formación del azul Prusia, adaptado de Berker y cols. (2010).

Se mide su absorbancia a 700 nm, lo que constituye una ventaja importante en la selección del método espectrofotométrico, porque esta longitud de onda está alejada de los máximos a los que absorben otros compuestos que se encuentran en los alimentos. Por otro lado, una de sus mayores desventajas es que precipita rápidamente con algunos antioxidantes como es el caso del trolox (dos minutos después de añadir el cloruro férrico que estabiliza el azul Prusia), lo que requiere una medida rápida y no debe usarse ácido ascórbico como estándar, ya que es necesaria una incubación.

Existe una modificación a este método desarrollada por Berker y cols. (2007) que consiste en añadirle un estabilizador, para evitar la precipitación y un pH más adecuado para el ion ferroso, que minimiza esta desventaja, o también puede evitarse mediante la automatización del ensayo (Berker y cols., 2010).

El trolox se usa en muchas ocasiones como estándar. López (2015) lleva a cabo este método usando trolox para la determinación de compuestos bioactivos en bebidas con capacidad antioxidante, expresando los resultados en mmol de trolox equivalente por litro de muestra.

Para evaluar la capacidad antioxidante de especies vegetales de origen canario, (artemisia Canaria, tuno Indio, llantén, pazote, té canario, orobal, ratonera) frente a antioxidantes de origen sintético, Sánchez y Trujillo (2013), sin embargo, optaron por el sulfato de hierro (II) como patrón al realizar el ensayo FRAP. Es posible usar este patrón como estándar por su estabilidad en condiciones normales de uso y almacenamiento. Tiene un peso molecular de 278,02 gr/mol, y se encuentra casi siempre en forma de sal heptahidratada, de color azul-verdoso. Es un compuesto químico iónico de fórmula  $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ , también llamado sulfato ferroso o melanterita.

Sánchez y Trujillo (2013) llevaron a cabo de este método espectrofotométrico donde la reacción mide la reducción del complejo tripiridil-triazina- $\text{Fe}^{+3}$  (TPTZ- $\text{Fe}^{+3}$ ) al complejo de color azul TPTZ- $\text{Fe}^{+2}$  mediada por antioxidantes en medio ácido (figura 17).

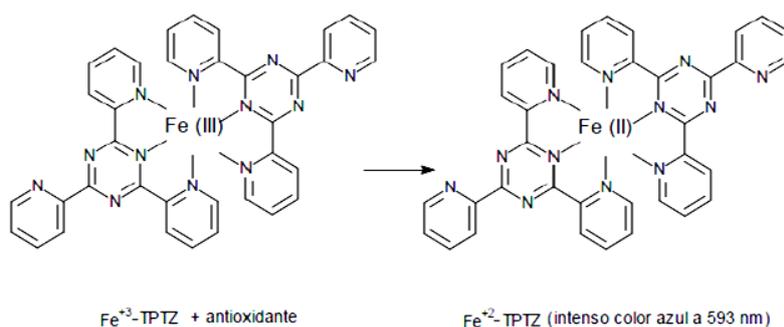


Figura 17. Reacción de reducción del complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina(TPTZ) incoloro al complejo ferroso coloreado

Cuando se produce la reacción de reducción aparece un intenso color azul, que se puede medir en el espectrofotómetro a 593 nm. Esa coloración es interpretada como una relación lineal con el total de la capacidad de reducción de los antioxidantes donantes de electrones y que se puede cuantificar en función de una curva de calibrado realizada previamente en el rango de concentraciones adecuadas y conocidas con disoluciones de  $\text{Fe}^{+2}$  y TPTZ.

Se preparó una curva de calibrado con sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y se mezclan 10  $\mu\text{L}$  de extracto y 1 mL de reactivo FRAP. Se introduce la cubeta en el espectrofotómetro de UV-visible y al cabo de 10 minutos se mide la absorbancia del complejo de color azul que se forma a 593 nm de longitud de onda

los resultados se expresan como la media de los mmol/L de Fe (III) reducido  $\pm$  la desviación estándar.

En los resultados obtenidos se encuentran altas actividades antioxidantes de los extractos de artemisia, llantén y té canario que superan incluso a la capacidad antioxidante ensayada a antioxidantes sintéticos como TBA (3-tercbutil-4-hidroxianisol), y el resto (tuno indio, orobal, ratonera, y pazote) presentan mayores resultados en cuanto a actividad antioxidante al TBH (2,6-di-tercbutil-4-metilfenol) y alfa tocoferol, usados comúnmente en la conservación de alimentos.

## II.8.-MÉTODO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE REDUCTORA DE IONES CÚPRICOS (CUPRAC)

En este método la reacción mide la reducción del complejo que forma la neocuproina con el  $\text{Cu}^{2+}$  al complejo de color amarillo de la neocuproina con el  $\text{Cu}^+$  por acción de los antioxidantes presentes en la muestra. La reacción general es la que aparece en la figura 18, donde el polifenol es oxidado a su correspondiente quinona. El producto de la reducción, el quelante bis (neocuproína) cobre (I), que es  $n\text{Cu}(\text{Nc})_2^+$ , muestra una máxima absorción a 450 nm (Apak y cols., 2007).



Figura 18. Reacción de reducción de neocuproina con el  $\text{Cu}^{2+}$

Cuando se produce la reacción la de reducción, aparece un intenso color amarillo, que medido con un espectrofotómetro a dicha longitud de onda, es tomado como una reacción lineal con el total de la capacidad de reducción de los antioxidantes donantes de electrones. Se puede cuantificar en función de una curva de calibrado realizada previamente en el rango de concentraciones adecuadas y conocidas con disoluciones de  $\text{Cu}^+$  y neocuproina con el trolox como patrón, y los datos obtenidos se dan en mmoles equivalentes de trolox. La fórmula molecular del catión quelato bis (neocuproína) cobre (I) se puede ver en la figura 19.

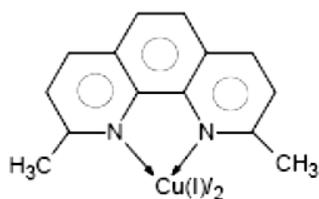


Figura 19. Cation quelato bis (neucoproina) cobre (I) (Gozzi, 2011)

Esta metodología fue normalizada en el laboratorio por parte de Sánchez y Trujillo (2013) siguiendo el protocolo que se describe a continuación para la determinación de la actividad antioxidante en especies vegetales autóctonas, de antioxidantes sintéticos y algunos estándares para su comparación.

Se preparó una curva de calibrado con trolox y las muestras en un amplio rango de concentraciones, luego se pipetearon 40  $\mu\text{L}$  directamente en la cubeta más 1210  $\mu\text{L}$  de agua destilada y se añadieron 750  $\mu\text{L}$  de una disolución formada por 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuCl}_2$  0,01M, 250  $\mu\text{L}$  de neocuproina  $7,5 \cdot 10^{-3}$  M y 250  $\mu\text{L}$  de tampón acetato amónico. Se ha de homogenizar y se introduce la cubeta en el espectrofotómetro de UV-visible y al cabo de 30 minutos se mide la absorbancia del complejo color amarillo a 450 nm de longitud de onda. Los resultados se expresan como los mmol de Cu (II) reducido teniendo en cuenta la desviación estándar que se relacionan directamente con los mmoles equivalentes de Trolox.

La actividad antioxidante resultante de los extractos vegetales supera a la observada para los antioxidantes sintéticos (figura 20). También, en el caso de las especies vegetales que mostraron menor actividad antioxidante, (tuno indio o la ratonera), se observa quedichas actividades superan a la encontrada para el TBH, que es uno de los antioxidantes sintéticos más utilizados en la industria para la conservación de los alimentos como se puede ver en la figura 20.

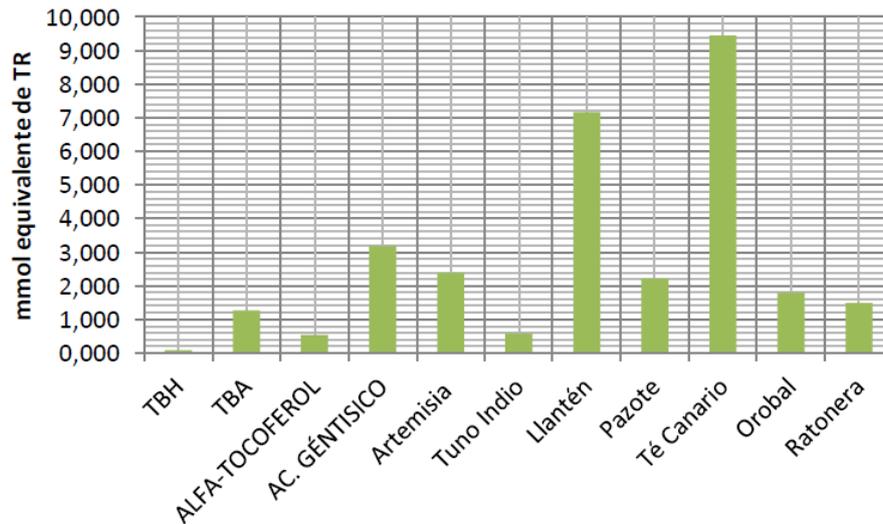


Figura 20. Resultados de la actividad antioxidante en mmoles equivalentes de trolox de especies vegetales, estándares y antioxidantes sintéticos Sánchez y Trujillo (2013).

López, (2015) en cambio, para la determinación de compuestos bioactivos en bebidas con capacidad antioxidante, llevó a cabo el ensayo según la metodología descrita por Apak y cols. (2008). Se añadió a cada tubo de ensayo 1 mL de cloruro cúprico 10 mM (Merck), 1 mL de neocuproína (Sigma) 7,5 mM, y 1 mL de acetato amónico 1M (Sigma) (pH 7), formación del complejo  $\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$ . A continuación se añadieron x ml de trolox (0 a 1,1 ml) y 1,1-x ml de agua destilada. Se dejó desarrollar el color durante 30 minutos y se midió su absorbancia a 450 nm. Como estándar también se empleó trolox en un rango de concentraciones entre 0 y  $9 \cdot 10^{-2}$  mM. Los resultados de las muestras también se expresaron en mmol de trolox equivalente por litro de muestra.

La reacción que se produce por acción del antioxidante es de reducción del complejo formado por la neocuproína con el  $\text{Cu}^{2+}$  al complejo de color amarillo de la neocuproína con el  $\text{Cu}^+$  (figura 21).

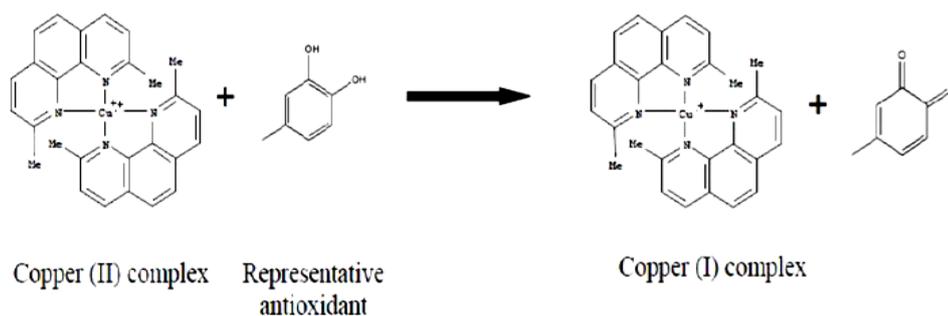


Figura 21. Reacción de reducción del complejo formado por la neocuproina con el  $\text{Cu}^{2+}$  al complejo de color amarillo de la neocuproina con el  $\text{Cu}^+$  por el antioxidante

Este método, a diferencia del FRAP, tiene la ventaja de poder detectar toda clase de antioxidantes, incluso tioles. Por otro lado, los tiempos de reacción varían con los diferentes antioxidantes, por lo que tiene el inconveniente de requerir seleccionar correctamente el tiempo de reacción cuando se tiene una mezcla (Gozzi, 2011).

En los ensayos FRAP y CUPRAC se produce un incremento en la absorbancia a medida que el antioxidante reacciona con el reactivo cromogénico (es decir, los iones de Fe y Cu forman complejos de transferencia de la carga con los ligandos). Por esta razón, en la oxidación inducida por un ion metálico no está claro si la prueba mide la capacidad del antioxidante para interactuar con un radical libre o su capacidad para enlazar los iones metálicos. En este sentido, el método CUPRAC responde mucho más rápido que FRAP a ciertos ácidos hidroxicinámicos. La razón puede encontrarse en las configuraciones electrónicas  $d^5\text{-Fe (III)}$  y  $d^9\text{-Cu (II)}$ , donde el cobre es un oxidante que implica una cinética más rápida.

El potencial redox del Cu es más bajo que el del Fe en presencia de fenantrolina o ligandos similares que estabilizan al Fe (II), esto hace que el método CUPRAC sea más selectivo.

El ensayo FRAP, basado en la reducción del catión férrico a ferroso, no refleja una realidad biológica, ya que el complejo se forma a un pH de 3,6, mucho menor que el pH fisiológico, y además tiene baja respuesta frente a antioxidantes con grupos tioles. También se encuentra limitado a detectar antioxidantes solubles en medios acuosos y los carotenoides no tienen habilidad para reducir al ion férrico (Apak y cols., 2007).

## **II.9.-OTROS MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN ESPECIES VEGETALES**

### **II.9.1.- Cromatografía líquida de alta eficacia**

El método oficial de la asociación oficial de químicos analíticos (AOAC) (1990) para la determinación de carotenoides está basado en la inhibición de la acción del radical peroxilo. Es un método competitivo que emplea una diana fluorescente y se evalúa la intensidad de decaimiento de la fluorescencia. Consiste en una extracción, una saponificación en caliente o en frío, una cromatografía en columna y la elución de los carotenoides. Estos se determinan cuantitativamente mediante espectrofotometría leída a longitud de onda específica.

Algunos autores opinan que el método de la AOAC para el análisis de carotenoides es tedioso y potencialmente inadecuado porque al hacer la saponificación de los extractos de carotenoides, hay pérdida de éstos, y los resultados no representan verdaderamente la composición que existe en los tejidos vegetales.

La cromatografía de líquidos de alta eficacia se caracteriza porque el eluyente es impulsado por medio de una bomba a través de la columna a presiones elevadas. Por lo demás, presenta en común con la cromatografía de gases la columna permanente y reutilizable de alta eficacia (en especial, las capilares), el sistema de termostatación (no imprescindible en HPLC), la circulación continua del eluyente, la detección continua y la visualización gráfica del resultado (cromatograma), siendo la precisión mayor en la HPLC. La cromatografía de líquidos de alta resolución es de las técnicas más comúnmente utilizadas para la cuantificación de componentes antioxidantes y sus ventajas son las siguientes:

- Es una técnica muy precisa
- Detecta mínimas cantidades de analito
- Posee buena resolución para compuestos de polaridad semejante
- Puede aplicarse a aquellas sustancias susceptibles de alterarse químicamente
- No destruye la muestra
- Requiere una mínima preparación de la muestra

El potencial de esta técnica para la separación y cuantificación de carotenoides ha sido demostrado desde hace varios años por Stewart y Wheaton (1971), que

utilizaron columnas de óxido de magnesio para separar carotenos y carbonato de zinc para xantofilas.

La técnica de HPLC usando columnas de C18 (columnas de fase reversa), puede ser utilizada para investigar compuestos carotenoides de muestras naturales y separar carotenoides de un amplio rango de polaridad (xantofilas, dioles, hidrocarburos y ésteres de carotenoides). El disolvente utilizado para la inyección de la muestra en el debe de ser cuidadosamente seleccionado, ya que disolventes para la inyección como cloruro de metileno, cloroformo, tetrahidrofurano, benceno y tolueno pueden distorsionar los picos de los carotenoides en los cromatogramas, si existe incompatibilidad de éstos con la fase móvil (Khachik y cols.,1988).

Por lo anterior, es muy importante tener presente las propiedades de solubilidad y polaridad, tanto del disolvente de inyección de la muestra como de los utilizados como fase móvil. Con lo que se concluye que las propiedades del disolvente de inyección de la muestra y los disolventes que constituyen la fase móvil deberán ser compatibles. Últimamente Hulshofy cols. (1997), en estudios con vegetales, cuantificaron los carotenoides por comparación con estándar externo y seis niveles de calibración se inyectaron antes de la medida de cada muestra. Las muestras fueron inyectadas por duplicado y la elución de los carotenoides se monitoreó a 450 nm incluyendo un blanco de disolvente.

Los carotenoides fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con los de los estándares, así como por su análisis espectral para la medición de la pureza de picos. La concentración de cada carotenoide fue determinada mediante la media de dos análisis, y el área de pico fue seleccionada para la determinación de la concentración de cada compuesto.

Gutiérrez (1997) aplicó la metodología anteriormente descrita a muestras del género *Leucaena* mediante el análisis en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución, utilizando un programa de elución gradiente, con el que se obtuvieron las condiciones cromatográficas óptimas para la separación de compuestos carotenoides de muestras naturales y de un amplio rango de polaridad (xantofilas, dioles, hidrocarburos y ésteres de carotenoides).

Se determinó el contenido de a-caroteno y JS-caroteno por comparación de las áreas de los picos cromatográficos en la recta de calibración.

Se pudo afirmar la existencia de una variación de carotenoides en las hojas, que pudo ser debido a la oxidación (Raymundo y cols., 1976). Se encontró también que en muchos frutos el proceso de madurez incluye en la carotenogénesis y continúa después de la cosecha, algunas frutas al madurarse fuera del árbol sintetizan más carotenoides que cuando se maduran en el árbol y el proceso es independiente de la luz.

Cortés y cols. (2014) en la determinación de la capacidad antioxidante de las flores de *Dalia* también hizo uso del método HPLC para valorar los compuestos fenólicos y flavonoides. En este caso para realizar las curvas estándar, se utilizaron estándares de ácido cafeíco, ácido clorogénico, rutina, quercetina, naringenina, hesperidina, ácido *p*-cumárico, ácido felúrico, ácido sinápico, catequina, ácido 4-hidroxibenzoico, y ácido gálico en diferentes concentraciones. El disolvente utilizado fue metanol.

La identificación de los polifenoles individuales se analizó de acuerdo al color de las lígulas y se efectuó mediante HPLC siguiendo la metodología propuesta por Odriozola y cols. (2008) con modificaciones. El sistema HPLC fue configurado para analizar los resultados a longitudes de onda comprendidas entre 200 y 600 nm. La cuantificación se basó en el área de cada pico identificado tomando en cuenta los tiempos de retención de los compuestos comparados con los picos de cada espectro de los estándares utilizados.

Se demostró que las flores de *Dalia* contienen una gran cantidad de fenoles y que algunos de los compuestos encontrados en las lígulas de *dalia* pertenecen al grupo de los flavonoides, cuya actividad antioxidante resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradora de radicales libres, por lo que se comportan como los secuestradores más fuertes de O<sub>2</sub> generado enzimáticamente. La cuantificación se basó en el área de cada pico identificado tomando en cuenta los tiempos de retención de los compuestos identificados comparados con los picos de cada espectro de los estándares utilizados. La concentración de cada compuesto se expresó en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de lígula analizada.

El método HPLC también se llevó a cabo para la determinación del contenido de compuestos fenólicos presentes en extractos alcohólicos de semilla de chíá (*Salvia hispánica* L.) fue llevada a cabo por Ortega y cols. (2016). Para la escisión hidrolítica de glicósidos siguieron la metodología presentada por Taga y cols. (1984) basada en la hidrólisis ácida de los glicósidos y la extracción de las agliconas con éter dietílico,

las cuales fueron evaporadas a sequedad. El residuo fue resuspendido en 1 mL de metanol 70 % grado HPLC (FERMONT), para su posterior análisis. Se utilizó un equipo de HPLC provisto con detector UV/visible fijado en 350 nm. Se empleó la técnica descrita por Hempel y Bohm (1996) realizando algunas modificaciones en el gradiente de elución, el flujo y el pH de la fase móvil. Los estándares utilizados fueron ácido caféico, ácido clorogénico, miricetina, kaempferol y quercetina.

En los resultados obtenidos se encontró diferencia significativa en el contenido de flavonoides en los extractos; la mayor concentración fue observada en el extracto metanólico con 60.49 % de quercetina. En cuanto al contenido de polifenoles totales también se encontraron diferencias significativas. El extracto etanólico presentó la mayor concentración con 1.33 mg/100 ml de equivalente de ácido gálico (tabla 4).

Tabla 4. Contenido de flavonoides y polifenoles totales en extractos de semilla de chía

Extracto	mg/100 ml de ácido gálico	Porcentaje de quercetina (%)
Etanólico	1.33 ± 0.0002 <sup>a</sup>	28.89 ± 0.02 <sup>a</sup>
Metanólico	1.08 ± 0.0003 <sup>b</sup>	60.49 ± 0.05 <sup>b</sup>

N= Tres muestras independientes analizadas por triplicado  
Los superíndices indican diferencias significativas (p<0.05)

La cuantificación e identificación de los diferentes compuestos fenólicos en semilla de chía en este estudio, superan a las realizadas por otros autores usando otros métodos. Estas diferencias pueden ser atribuidas a la variedad de la semilla, las condiciones de cultivo y las propiedades del suelo en cada caso. La mayor parte de los flavonoles fueron encontrados en forma de glicósidos, el tratamiento de hidrólisis aumentó el contenido de miricetina, kaempferol y quercetina por la liberación de sus agliconas, indicando que solo una fracción de los flavonoles se encontraba en forma libre. Se concluye que la chía puede ser considerada como un buen componente de la dieta ya que presenta un alto contenido de compuestos fenólicos los cuales pueden ser beneficiosos para la salud (Ortega y cols., 2016).

También los compuestos fenólicos ácido cafeico, ácido clorogénico, miricetina, quercetina y kaempferol, se cuantificaron mediante HPLC, tanto para la forma libre de los antioxidantes (agliconas), como para los conjugados con azúcar (glicósidos), mediante una hidrólisis ácida en la determinación del contenido de compuestos fenólicos presentes en extractos alcohólicos de semilla de chía (*Salvia hispánica* L.).

Se encontraron polifenoles en forma de agliconas y glicósidos. Los ácidos clorogénico y cafeico se encontraron en forma libre, mientras que la mayor parte de los flavonoles (miricetina, kaempferol y quercetina) fueron encontrados en forma de glicósido en los extractos.

De acuerdo con lo anterior, la chía puede ser considerada como un buen componente de la dieta, ya que presenta alto contenido de compuestos fenólicos (Ortega y cols., 2016).

### **II.9.2.-Método del pH- diferencial para la determinación de antocianinas**

Las antocianinas han ganado gran importancia como colorantes naturales para alimentos. Son bioactivos importantes que tienen funciones y acciones biológicas, que incluye actividad oxidante, que promueve la prevención de enfermedades crónico-degenerativas. Este tipo de pigmentos de las plantas son metabolitos de tipo fenólico, pertenecen a la familia de los flavonoides y son responsables de la mayoría de colores rojos y azules de las frutas y hortalizas. Los colorantes naturales tales como las antocianinas pueden impartir varios tonos rojos al color del alimento, pero hay limitaciones en su aplicación debido a su solubilidad, su dificultad para igualar el matiz deseado, incompatibilidad con la matriz del alimento y la estabilidad del color con respecto al pH, luz y oxígeno. Es bien sabido que las propiedades de las antocianinas, incluyendo la expresión del color, están altamente influenciadas por la estructura de la antocianina y por el pH. Se ha demostrado que en la región de pH comprendida entre 5-7, las antocianinas más simples son inestables y rápidamente pierden color debido a la hidratación de la posición- 2 del esqueleto de la antocianina. Generalmente se acepta que las antocianinas muestran su color más intenso cuando están en la forma de ion flavilio. Su color rojo es el resultado neto de todas las antocianinas monoméricas, oligoméricas y poliméricas junto con sus formas copigmentadas.

Los espectros de UV-Vis a diferentes valores de pH varían y nos ayudan a determinar si las antocianinas están o no polimerizadas (Giusti y Wrolstad, 2001). La concentración de antocianinas entonces se determina con la absorbancia a un pH diferencial. Estas moléculas presentan dos bandas de absorción en la región UV (260-280 nm) y en la región visible (490-550 nm). Los resultados se expresan como pigmentos de antocianinas monoméricas, generalmente expresados como cianidina-3-glucósido.

El uso de un agente blanqueador elimina dichas interferencias, ya que decolorara a las antocianinas sin afectar a los compuestos interferentes. Se obtiene una medida de la absorbancia máxima en la región del visible, seguida por la decoloración. Los agentes blanqueadores más empleados son bisulfito de sodio y peróxido de hidrogeno.

Las antocianinas desarrollan transformaciones estructurales reversibles con el cambio del pH manifestado por el espectro a diferentes absorbancias. La forma del oxonio coloreado predomina a pH 1.0 y la forma hemiacetal incolora a pH 4.5. El método del pH diferencial se basa en esta reacción y permite segura y rápidamente medir el total de antocianinas monoméricas. La diferencia en la absorbancia de estas dos alícuotas leídas a su longitud de onda de máxima absorción será proporcional al contenido de antocianinas. La concentración en mg/L puede ser determinada si multiplicamos por el peso molecular del pigmento.

La concentración de antocianinas monoméricas se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/L)} = (A)(PM)(FD)(1000)/\epsilon \quad (1)$$

siendo:

A: absorbancia

PM: peso molecular del pigmento

FD: factor de dilución

$\epsilon$  : absorbancia molar o coeficiente de extinción molar

La concentración de antocianinas totales que se obtiene de la ecuación 2:

$$\text{Antocianinas totales (mg/L)} = A'(PM)(FD)(1000)/\epsilon \quad (2)$$

siendo:

A: absorbancia

PM: peso molecular del pigmento

FD: factor de dilución

$\epsilon$  : absorbancia molar o coeficiente de extinción molar

Donde la absorbancia (A') que se calculó como se indica a continuación:

$$A' = (A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{700})_{\text{pH}=1.0} \quad (3)$$

Martínez y cols. (2011) cuantificaron las antocianinas por el método de pH diferencial para evaluar la actividad antioxidante del género *Rubus Adenotrichus*, una planta silvestre cuyo fruto es conocido como mora o zarzamora, basándose en la transformación estructural de las antocianinas con el cambio de pH (pH 1 coloreadas y pH 4.5 incoloras). Se prepararon diluciones del extracto metanólico con solución buffer pH 1.0 de cloruro de potasio y con solución buffer pH 4.5 de acetato de sodio y se midió la absorbancia de cada muestra a la longitud de onda de máxima absorbancia ( $\lambda_{\text{max}}=515 \text{ nm}$ ) y a 700 nm de la muestra diluida (1:10) con soluciones tampón.

El resultado fue 12.3 mg de antocianinas/g de fruto seco. Se determinó el contenido de antocianinas para 5 especies distintas del género *Rubus* mediante el mismo método, 4 de estas especies presentaron valores que van de 5.69 a 11.92 mg/g de materia seca y solo una de ellas (*Rubus Occidentalis*) presentó un mayor contenido de antocianinas (34.65 mg/g) que el encontrado en este estudio para *Rubus Adenotrichus*.

Con los resultados se concluye que los frutos que producen las plantas del género *Rubus* son fuente de metabolitos con actividad antioxidante y este estudio contribuye al conocimiento científico de los frutos silvestres del país al obtener información del contenido de estos metabolitos de trascendencia en el área alimenticia y de salud para el hombre (Martínez y cols., 2011).

Acosta y Díaz (2016) realizaron evaluación de antocianinas en la cáscara de la guanábana mediante este método. Prepararon dos diluciones de las muestras, una con la disolución tampón de cloruro de potasio a pH 1 y otra con la disolución tampón de acetato de sodio a pH 4.5, llevándolas a un volumen de 3 mL, se esperó 15 minutos a que las diluciones se equilibraran y se realizó un barrido en el espectrofotómetro comprendido entre 400-700 nm, esperando una absorbancia de la muestra entre 0.1 y 1.2 y utilizando como blanco agua destilada.

Para la obtención de la concentración de antocianina se utiliza la fórmula de pH diferencial:

$$A = (A_{\lambda \text{ vis-máx.}} - A_{\lambda 700})_{\text{pH } 1} - (A_{\lambda \text{ vis-máx.}} - A_{\lambda 700})_{\text{pH } 4.5}$$

Donde

$A_{\lambda \text{ vis-máx.}}$ : lectura del pico más alto a pH 1 y pH 4.5,

$A_{\lambda 700}$ , es la lectura a  $\lambda = 700 \text{ nm}$ , tanto para pH 1 como pH 4.5

Para calcular la concentración en la muestra original se sigue la siguiente fórmula:

Antocianina monomérica (mg/ 100 g) = (APM FD 100) / ( $\epsilon$  L), donde:

A = absorbancia

PM = Peso molecular, 449.2 g/mol

FD = Factor de dilución

$\epsilon$  = Coeficiente de extinción molar, 26900 g/mol\*cm

L = Longitud de la celda.

Se obtuvieron absorbancias de pequeños picos más representativos obtenidos entre 400 y 700 nm a pH 4.5 y pH 1. La cantidad promedio obtenido de antocianinas aplicando la formula descrita en la metodología fue de  $6.47 \pm 2.41$  mg de cianidina-3-glucosido/100 g de muestra original.

Por lo tanto se concluye que entre los responsables de la actividad antioxidante de esta fruta están las antocianinas (Acosta y Díaz, 2016).

### **II.9.3.- Quimioluminiscencia y electroquimioluminiscencia**

La quimioluminiscencia y la electroquimioluminiscencia son técnicas ópticas que emplean la luminiscencia, la emisión de radiación (Vis/IR) que ocurre cuando una molécula en estado excitado se relaja radiativamente a su estado fundamental (Vis/IR). La producción de ese estado excitado a partir de distintas reacciones químicas origina la llamada quimioluminiscencia (QL), siendo denominada bioluminiscencia (BL) cuando esta emisión de luz se debe a reacciones químicas que tienen lugar en organismos vivos. Si esa reacción, que posteriormente genera emisión, se inicia electroquímicamente, se le denomina electroquimioluminiscencia o luminiscencia electrogenerada (EQL). Esta conversión de energía eléctrica en energía radiante supone la producción de compuestos intermedios reactivos, a partir de precursores estables en la superficie del electrodo, los cuales reaccionan y posteriormente emiten radiación (Ballesta, 2015)

La instrumentación y los componentes esenciales para la medida de la QL son: un luminómetro, una cámara, un fotodiodo y un fotomultiplicador. Y para la producción de EQL son: potencióstato de sobremesa ó portátil y electrodos.

La selectividad es una de las limitaciones analíticas de las medidas QL. Sin embargo, el empleo tanto de QL como de EQL presenta ventajas ya que no requiere de la etapa de excitación por irradiación de la muestra, como es necesario en la fotoluminiscencia, por ello no hay problemas de luz dispersa o de inestabilidad de la fuente, ni es necesario el uso de instrumentación compleja. Tampoco hay problemas de altas señales de fondo por fotoexcitación no selectiva, pudiendo lograrse alta sensibilidad con instrumentación simple. Otra ventaja de la QL es su capacidad para acomodar un tratamiento químico *on-line* para conseguir aumentar la selectividad. También podemos realizar separaciones incluidas en la configuración o combinar la QL con la cromatografía líquida o con la electroforesis capilar.

El interés analítico que estos métodos han despertado en las dos últimas décadas y la falta de predicciones teóricas seguras sobre si un grupo de fenoles y polifenoles va o no a tener un comportamiento quimioluminiscente a partir del producto de una reacción de oxidación, hace necesario la búsqueda de nuevos métodos o estrategias que sean capaces de predecir esta actividad. La Electroquimioluminiscencia está más enfocada a la determinación de actividad antioxidante en el tratamiento de enfermedades dentro de las ramas de farmacología y medicina. Es por ello que a continuación se desarrolla el método de quimiluminiscencia, aplicado a la determinación de capacidad antioxidante en alimentos.

Carrasquero (2010), desarrolló métodos basados en la inhibición de la quimioluminiscencia del luminol, para determinar la actividad antioxidante de alimentos y flavonoides de plantas. El desarrollo de métodos quimioluminiscentes acoplados a sistemas de inyección en flujo para la determinación de la actividad antioxidante y la reacción quimioluminiscente del luminol permitió el desarrollo de varios procedimientos para cuantificar la capacidad antioxidante y antirradical de muestras de diversos orígenes como por ejemplo, téis, pétalos florales o aceites vegetales comestibles.

En este método se utilizó una disolución de luminol amortiguada a pH 10, que además contiene a los iones Co(II) acomplejados con el etilendiamintetraacetato de tetrasodio (EDTA). Esta disolución se mezcla con otra disolución de perborato de sodio a fin de producir la siguiente serie de reacciones, donde en la última reacción se produce el radical hidróxido (HO·), que es el responsable de atacar a la molécula de luminol para general al anión aminoftalato en su estado electrónicamente excitado (figura 22).

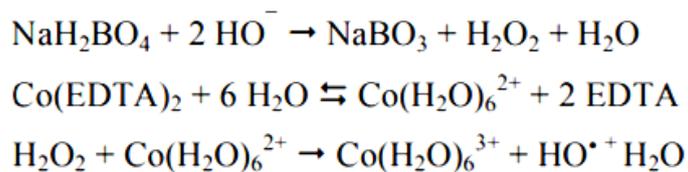


Figura 22. Reacción de complejación del luminol con el complejo de Co(II) y con EDTA

Por medio del sistema de detección se obtenían registros de intensidad en función al tiempo de reacción (figura 23) .El efecto antirradical se cuantifica por medio del porcentaje de inhibición (%Inh), que es calculado por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{Inh} = \frac{I_{\text{máx.}} - I_{\text{min.}}}{I_{\text{máx.}}} \times 100$$

Donde emisión quimioluminiscente inicial, que determina el valor de  $I_{\text{máx.}}$ , seguida de la disminución producida por el efecto antirradical de los componentes de la muestra inyectada, tomando la forma de un pico negativo, donde el valor mínimo corresponde a  $I_{\text{min.}}$ .

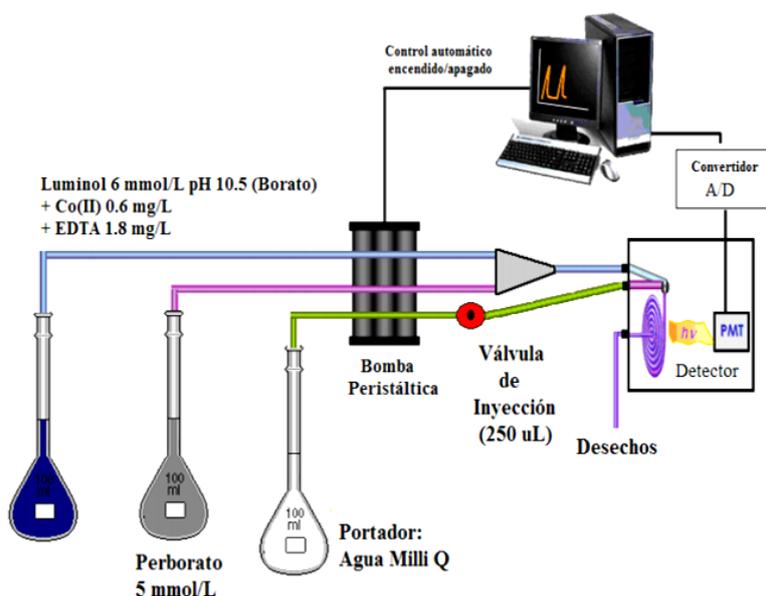


Figura 23. Sistema utilizado para evaluar la actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de una muestra se cuantifica a través del valor de la Concentración de Inhibición (CI50), que se define como la concentración del antioxidante requerida para provocar una disminución del 50 % en la emisión máxima, es decir, aquella que se obtiene en ausencia de compuestos antirradicales. Para determinar el valor del CI50, es necesario preparar un conjunto de disoluciones del antioxidante en un determinado intervalo de concentraciones, seguidamente se inyectan al sistema y se mide el grado de inhibición que producen. La representación gráfica del % Inh en función a la concentración se conoce como curva de inhibición y, por interpolación se obtiene la concentración del antioxidante que produce a un valor de % Inh igual a 50 %.

Por medio de la detección quimioluminiscente fue posible desarrollar métodos analíticos reproducibles, confiables y selectivos para la cuantificación de analitos de importancia medioambiental, así como de productos naturales con propiedades antioxidantes beneficiosas para la salud.

## **II.10 RESUMEN DE LOS MÉTODOS APLICADOS EN LOS TRABAJOS CITADOS**

Tabla 5. Recopilación de los métodos aplicados en los trabajos citados en la memoria

Trabajo citado	Método utilizado	Resultado obtenido	Referencia bibliog.
Elaboración de una bebida a base romero ( <i>rosmarinus officinalis</i> ), y medición de antioxidantes por el metodo DPPH.	DPPH	Alto porcentaje de inhibición del radical	Génesis y Corrales (2015)
Evaluación composicional, capacidad antioxidantes de pulpa y cáscara de la <i>Annonamuricata</i> L.(Guanábana)	DPPH	Porcentaje de inhibición del radical bueno	Acosta y Díaz (2016)
Evaluación de la actividad antioxidante en 18 especies vegetales a través del ensayo DPPH recolectadas en el departamento de Matagalpa durante el periodo marzo-agosto 2013	DPPH	Alto porcentaje de inhibición del radical y alto contenido de polifenoles	Aguirre y cols. (2013)
Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas	DPPH	Alto porcentaje de inhibición del radical	Repo y Encina (2008)
Compuestos bioactivos en bebidas con capacidad antioxidante	ABTS	Alto porcentaje de inhibición del radical	López (2015)
Determinación de la capacidad antioxidante de bayas y frutos del bosque	ABTS	Alto porcentaje de inhibición del radical	Palacios (2017)
Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos.	DMPD	Buena capacidad de inhibición del radical, aunque método poco reproducible	Kuskoski y cols. (2005)
Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de cuatro frutos de interés comercial en Colombia y actividad citotóxica In vitro en la línea celular de fibrosarcoma HT1080	Folin-Cicoaltea	Alto contenido en fenoles y capacidad antioxidante	Barrera (2011)
Compuestos fenólicos y actividad antioxidante en extractos de cuatro especies de orégano	Folin-Cicoaltea	Alto contenido de fenoles	Rivas y cols. (2017)
Evaluación composicional, capacidad antioxidantes de pulpa y cáscara de la <i>Annonamuricata</i> L.(Guanábana)	Folin-Cicoaltea	Fenoles totales en pulpa en cantidades representativas y en cáscara alto contenido	Acosta y Díaz (2016)

Tabla 5. Continuación.

Compuestos bioactivos en bebidas con capacidad antioxidante	FRAP	Alta capacidad antioxidante	López (2015)
Estudio de nuevos antioxidantes naturales. Diseño de un laboratorio de análisis químico agroalimentario	FRAP	Alta actividad antioxidante	Sánchez y Trujillo(2013)
Estudio de nuevos antioxidantes naturales. Diseño de un laboratorio de análisis químico agroalimentario	CUPRAC	Alta actividad antioxidante	Sánchez y Trujillo(2013)
Compuestos bioactivos en bebidas con capacidad antioxidante	CUPRAC	Alta capacidad antioxidante	López (2015)
Determinación cuantitativa de carotenoides del género leucacena	HPLC	Existencia de carotenoides	Gutiérrez (1997)
Actividad antioxidante, composición nutrimental y funcional de flores comestibles de dalia	HPLC	Alto contenido fenólico y algunos flavonoides	Cortés y cols. (2014)
Determinación del contenido de compuestos fenólicos presentes en extractos alcohólicos de semilla de chíá (Salvia hispánica L.)	HPLC	Alto contenido de compuestos fenólicos	Ortega y cols. (2016)
Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes	pH-diferencial	Contenido de antocianinas	Martínez y cols. (2011)
Evaluación composicional, capacidad antioxidantes de pulpa y cáscara de la Annona muricata L.(Guanábana)	pH-diferencial	Contenido de antocianinas	Acosta y Díaz (2016)
Detección quimioluminiscente acoplada a la cromatografía iónica y a sistemas de inyección en flujo para determinar iones metálicos y propiedades antioxidantes de productos naturales	Quimioluminiscencia	Alta concentración de inhibición	Carrasquero (2010)

Dado que en los ensayos mencionados ocurren reacciones de transferencia de electrones y/o hidrógeno, el adecuado conocimiento de la química de tales sistemas es condición primordial para interpretar correctamente los resultados. El método de captura del radical DPPH es utilizado desde hace muchos años por numerosos autores que han ido realizando adaptaciones del mismo a la matriz alimentaria de la que quieren obtener información, como modificar la concentración y el tiempo de incubación o ataque. El uso de este radical se recomienda como criterio preliminar para jerarquizar los distintos extractos o fracciones de las especies vegetales de acuerdo a su poder antioxidante

El ensayo ABTS posee gran estabilidad tiene la ventaja de que puede realizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles, eligiendo el disolvente apropiado en cada caso. Sin embargo, del ensayo DMPD, no hay tanta variedad de biografía respecto al estudio de la capacidad antioxidante de muestras de especies vegetales. En la que en este trabajo se incluye, no presenta buena correlación con otros métodos estudiados, y en otras biografías encontradas con otro objeto de estudio, tampoco presenta buena reproducibilidad.

Los métodos FRAP, CUPRAC y Folin- Cicoaltea funcionan con las propias especies "dianas" normalmente moléculas artificiales y son empleadas como sonda en su forma reducida y se mide su cambio de color. El poder reductor de un compuesto depende de la capacidad de transferir electrones del propio compuesto por tanto, el poder reductor de un compuesto puede servir como un indicador significativo de su potencial actividad antioxidante. Los métodos de reducción de diferentes especies químicas como FRAP y CUPRAC funcionan bastante bien, y de hecho se encuentra amplia bibliografía al respecto.

El método Folin-Cicoaltea es un método, ampliamente utilizado previo a los métodos de determinación de capacidad antioxidante, donde su realización puede ayudar en la selección de las especies que se vayan a estudiar. El contenido fenoles totales y flavonoides se relaciona directamente con la actividad antioxidante de una muestra.

El método HPLC también está entre los métodos analíticos más utilizados en la actualidad como técnica de detección separación y cuantificación compuestos flavonoides. Este método también suele usarse como complemento de otros métodos para determinar qué tipo de antioxidantes componen las especies vegetales de estudio.

Las antocianinas, dentro de los flavonoides han tomado gran importancia debido al poder antioxidante extraordinario que poseen y como reivindicación a su uso como colorante natural frente a los colorantes sintéticos. El método del pH diferencial resulta óptimo para este tipo de flavonoide debido a su simplicidad y reproducibilidad.

Y por último, la reacción quimioluminiscente del luminol se ha comprobado que permite el desarrollo de varios procedimientos para cuantificar la capacidad antioxidante y antirradical de muestras vegetales de diversos orígenes. Además, el sistema propuesto en este trabajo se caracteriza por su simplicidad, bajo costo y poco impacto ambiental. También permite el análisis de forma continua de un número elevado de muestras en un periodo de tiempo relativamente corto si se compara con otras técnicas más laboriosas, por lo que puede ser utilizado como un método complementario en el estudio de fuentes de antioxidantes naturales.

## CAPÍTULO III. CONCLUSIONES

El proceso de envejecimiento prematuro celular depende de varios factores. El estrés oxidativo es un aspecto crucial, ya que una vez iniciado el daño por los radicales libres, éste puede generar una reacción en cadena que, aunada a la incapacidad de los sistemas antioxidantes endógenos para controlar el incremento en la producción de los radicales libres, termina por inducir afecciones letales en la fase de vejez.

La búsqueda de metabolitos de las plantas con capacidad antioxidante, ha ido en incremento en las últimas décadas dado los beneficios que aportan. Además, se ha demostrado que las moléculas con esta capacidad guardan un vínculo estrecho con otras actividades biológicas de importancia, como lo son antitumorales, anticancerígenas, antimicrobianas, antiinflamatorias, antidiabéticas, entre otras, por lo que su aislamiento y estudio son de gran importancia para la agroindustria, industrias farmacéuticas y cosmetológicas.

Tras una revisión de los últimos trabajos relacionados con la determinación de la capacidad antioxidante de especies vegetales, se puede decir que es una determinación analítica que despierta gran interés.

La actividad antioxidante de los extractos es altamente dependiente del disolvente utilizado en la extracción para la preparación de la muestra para análisis.

Los métodos espectroscópicos pueden ser aplicados para la determinación de la capacidad antioxidante en muestras de origen vegetal y son una elección habitual, dada su sencillez y efectividad a la hora de neutralizar un radical libre. Dentro los principales protocolos tenemos, los métodos con mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno, o métodos directos: DPPH, ABTS y el DMPD. Y por otro lado los métodos indirectos o con mecanismo de transferencia electrónica: FRAP, CUPRAC o Folin Cicoaltea.

No podemos establecer una comparativa entre los métodos desarrollados en los trabajos revisados, ya que los resultados de la capacidad antioxidante no sólo dependen del compuesto antioxidante o de la especie vegetal a analizar con cada método y de los recursos tecnológicos, sino también de la calidad original de la planta, pigmentación, origen geográfico, las condiciones climáticas y almacenamiento, lo que explica la diversidad de resultados obtenidos para la capacidad antioxidante. Sí se

puede deducir, la eficacia de los métodos por la reproducibilidad en los resultados que se obtienen.

Actualmente no hay un método que sea único y esté ampliamente aceptado y que pueda aplicarse a una variedad razonable de componentes en matrices alimenticias en materia de antioxidantes. Por ello, un método por sí solo no es suficiente para evaluar la capacidad antioxidante, al menos deben emplearse dos de ellos y más de un estándar para determinar la capacidad antioxidante de una muestra, ya que los antioxidantes responden de distintas maneras a las diferentes especies reactivas, en los distintos ensayos.

En cada comunidad autónoma se tiene la posibilidad de estudiar y procesar una infinita variedad de flora autóctona que procede de buenas y seguras fuentes naturales que pueden tener gran potencial antioxidante. Las hierbas y frutos silvestres estudiados son importantes fuentes naturales de nutrientes y de compuestos bioactivos. Según estos datos, el uso de antioxidantes en la dieta diaria de individuos en etapa de vejez podría disminuir las alteraciones generadas por el estrés oxidativo, no “rejuveneciendo” al sujeto sino mejorando su calidad de vida. Asimismo, debido a su alta capacidad antioxidante, los extractos de estos frutos podrían ser estudiados en futuras investigaciones para ser utilizados para alargar la vida útil de otros alimentos sustituyendo los antioxidantes sintéticos por los naturales y mejorar sus propiedades beneficiosas.

Para finalizar me gustaría citar al médico e investigador español F. Grande Covián con la siguiente frase: *“el hombre primero quiso comer para sobrevivir, luego quiso comer bien e incorporó la gastronomía a su modo cultural. Ahora además, quiere comer salud”*.

## CAPÍTULO IV. BIBLIOGRAFÍA

Acosta, V., R. C., & Díaz, P. B. J. (2016). Evaluación composicional, capacidad antioxidante de pulpa y cáscara de la *Annona muricata* L. (GUANÁBANA). Facultad de Industrias de Perú.

Agudo, L. (2002). Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos. *Autodidacta*, 27-34.

Aguirre, L. A. R., Arroliga, C. M. R., Dalie, P. M. D. (2013). Evaluación de la actividad antioxidante en 18 especies vegetales a través del ensayo DPPH recolectadas en el departamento de Matagalpa durante el periodo marzo-agosto 2013. Universidad nacional autónoma de Nicaragua.

Álvarez, M. V. (2008). Potencial antioxidante de zumos de frutas nativas del Ecuador. Cuenca, Ecuador.

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 27(1).

Apak, R., Güçlü, K., Ozyurek, M., y Celik, S. E. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160(4), 413-419.

Asghar, M. N., Khan, I.U., Arshad, M.N., y Sherin, L. (2007). Evaluation of antioxidant activity using an improved DMPD radical cation decolorization assay. *Acta Chimica Slovenica*, 54(2), 295.

Ballesta, C.J. (2009). La (electro)quimioluminiscencia en técnicas rápidas de análisis: (bio)sensores ópticos y cromatografía a baja presión. Departamento de Química Analítica Universidad de Granada.

Bartozs, G. (2009). Reactive oxigenspecies: Destroyers or messengers? *Biochem. Pharmacol.* 11, 1303-1315.

Barrera B. A. R. (2011). Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de cuatro frutos de interés comercial en Colombia y actividad citotóxica *In vitro* en la línea celular de fibrosarcoma HT1080.

Berker, K. I., Güçlü, K., Demirata, B., y Apak, R. (2010). A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. *Analytical Methods*, 2(11), 1770-1778.

Beverages in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1415-1422.

Carrasquero, D.A. (2010). Detección quimioluminiscente acoplada a la cromatografía iónica y a sistemas de inyección en flujo para determinar iones metálicos y propiedades antioxidantes de productos naturales. Universidad de Castilla La Mancha Facultad de Ciencias Químicas Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos.

Colbert, L. B. & Decker, E. A., J.(1991). Compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(3), 607-616.

Cortés, E.L., Beloso, O.M., Díaz, P.O., Barrera N., L. L., Sánchez L., J. A., & Bautista, S.B. (2014). Antioxidant capacity, nutritional and functional composition of edible dahlia flowers. *Scientific Electronic Library Online*.

Day, B.J., (2004). Catalytic antioxidants: a radical approach to new therapeutics. *Drug Discovery Today*, 9, 557-566.

Decker, E. A., Akoh, C. C., y Min, D. B. (2002). Antioxidant mechanisms. En C. C. Akoh y D. B. Min, (Eds.). *New York, Marcel Dekker. Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Second Edition, Revised and Expanded*, 517-542.

Finkel, T.,(2003).Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology*, 15, 247-254.

Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., y Ritieni, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 1035-1040.

Ganesan, P., Kumar, C.S., Bhaskar, N. (2008). Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red sea weeds. *Bioresource Technology*, 99, 2717–2723.

García, A., de Pascual, T., Santos C. (2004). Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food chemistry*, 84, 13-18.

Garzón G., Narváez C., Riedl K., Schwartz S. (2010). Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale Swartz*) from Colombia. *Food Chemistry*, 122, 980-986.

Gaviria, M.C., Ochoa, O.C., Sánchez ,M.N., Medina, C.C., Lobo, A.M, Galeano, G.G., Mosquera, M.A, Tamayo, T.A, Lopera P. y Rojano B. (2009). Actividad Antioxidante e Inhibición De La Peroxidación Lipídica De Extractos De Frutos De Mortiño (*Vaccinium Meridionale Sw*). *Boletín Latinoamericano del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6), 519-528.

Genesis, N., & Corrales, A. (2014). Elaboración de una bebida a base romero (*rosmarinusofficinalis*), y medición de antioxidantes por el método DPPH. *Facultad de ingeniería química, Guayaquil - Ecuador*.

Gil, M. I., Barberán, F. A. T., Pierce, B. H., Holcroft, D. M., y Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4581-4589.

Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. (2001). Unit F1.2: Anthocyanins. Characterization and measurement with uv-visible spectroscopy. In: Wrolstad RE editors. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York, 1-13.

Gómez, R. M., (2010). Desarrollo y evaluación de estrategias analíticas para la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos funcionales. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.

Gouveia, S., & Castilho, P. C., (2011) Antioxidant potential of *Artemisia argentea* L'Hér alcoholic extract and its relation with the phenolic composition. *Food Research International*, 44 (6), 1620–1631.

Gozzi, M.S. ( 2011). Variabilidad de la capacidad antioxidante de extractos foliares de arándano *vaccinium ashei* obtenidos en diferentes condiciones de extracción.

Gutiérrez, A.D.M., Ortiz, G.C.A., Mendoza, C. A., (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal Simposio de Metrología.

Gutiérrez, M.L. (1997). Determinación cuantitativa de carotenoides del género *leucacena*. Universidad autónoma de Nuevo Leon, Facultad de Ciencias Biológicas.

Halliwel, B., Aerchabach, R., Lologer, J. and Aruoma, O.I., (1995). *Food Chemistry. Toxicol* 33(7), 601-617.

Hayouni, E.A., Abedrabba, M., Bouix, M., & Hamdi, M. (2007). The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*, 125, 1104–1109.

Hempel, J. Bohm, H. (1996). Quality and quantity of prevailing flavonoid glycosides of yellow and green french beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(8), 2114-2116.

Hernández, R.P., Pabón, B.L.C. y Rodríguez, A.M.F., (2015). Propiedades químicas y biológicas de *Arbutus unedo*: una planta con potencial medicinal. 49(1), 144-155.

Hertog, M.G.L., Kromhout, D. & Aravanis, C., (1995). *Archives of Internal Medicines*, 155, 381-386.

Hulshof, P.J., X. Chao, P. van de Bodenkamp, Muhilal y C E. West. (1997). Application of a validated method for the determination of provitamin A carotenoids in Indonesian foods of different maturity and origin. *J. Agric. Food Chem.* (45) pp. 1174-1179.

INE, Instituto Nacional de Estadística, Defunciones según la causa de muerte 2016 [http://www.ine.es/prensa/edcm\\_2016.pdf](http://www.ine.es/prensa/edcm_2016.pdf) (acceso 20/05/2018).

Jumbo, B., N. C., & Guevara, P., A. (2016). Capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de un filtrante de cinco hierbas aromáticas y esteviosido (*steviarebaudina* b) *Ciencias de la Vida Universidad Politécnica Saleciana*, 86-87.

Kanner, J. (1994). *Meat Science*, 36, 169-189.

Karadag, A., Ozcelik, B., y Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41-60.

Khachik, F., G.R. Beecher, J.T., Vanderlice y G. Furrow. (1988). Liquid chromatographic artefacts and peak distortion. Sample solvent interactions in separation of carotenoids. *Analytical Chemistry*, 60, 807-811.

Kostennikova, Z. (1983). UV spectrophotometric quantitative determination of flavonoid in calendula tincture. *Farmatsiya*, 33(6), 83-86.

Kuskoski, E.M., Asuero, G.A., Troncoso, M.A., Mancini, F.J., Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos.

Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*.

López, R. F., (2015). Compuestos bioactivos en bebidas con capacidad antioxidante. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Departamento de Nutrición y Bromatología II.

Magalhaes, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. (2005). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, 613(1), 1-19.

Martínez, C. N. S., Arévalo, N.K., Verde, S.M.J., Rivas, M. C., Oranday, C.A., Núñez, G.M.A., Morales, R. M. E. (2011). Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltdl (Zarzamora). Departamento de Biología Celular y Genética, Laboratorio de Micropropagación. Instituto de Biotecnología.

Martínez, F.S., González, G.J., Culebras, J.M. y Tuñón M.J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes 272-273. *Nutrición hospitalaria*, Departamento de Fisiología, Universidad de León y Hospital de León, España.

Meo, F.D., Lemaur, V., Cornil, J., Lazzaroni, R., Duroux, L., Olivier, Y., Trouillas, P. (2013) Free Radical Scavenging by Natural Polyphenols: Atom versus Electron Transfer. *The Journal of Physical Chemistry A*, 117 (10), 2082-2092.

Moon, J. K., y Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1655-1666.

Odriozola, S.I.; Soliva, F. R.; Martín, B.O. (2008). Phenolic acids, flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity of strawberry juices processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. *European Food Research and Technology*, 228, 239-248.

Ortega, V.A.S., López, H.A.A., González M. B.E. (2016). Determinación del contenido de compuestos fenólicos presentes en extractos alcohólicos de semilla de chía (*Salvia hispánica* L.).

Palacios, C. L. (2017). Determinación de la capacidad antioxidante de bayas y frutos del bosque. Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén.

Paladino, S.C., (2008). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitisvinifera* L.) Tesis de maestría, La Rioja.

Pedrielli, P., Skibted L.H. (2002). Antioxidant Synergy and regeneration Effect of Quercetin, (-)-Epicatechin, and (+)-Catechin on a  $\alpha$ -Tocopherol in Homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7138-7144.

Pekal, A., Pyrzynska K., (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, 1776–1782.

Pernice, R., Borriello, G., Ferracane, R., Borrelli, R. C., Cennamo, F., y Ritieni, A. (2009). Bergamot: A source of natural antioxidants for functionalized fruit juices. *Food Chemistry*, 112(3), 545-550.

Phipps, S. M., Sharaf, M. H., & Butterweck, V. (2007). Assessing antioxidant activity in botanicals and other dietary supplements In *Pharmacopeial Forum*.

Portal antioxidantes, alimentos y salud. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. <http://www.portalantioxidantes.com/antioxidantes> (acceso 15/05/2018).

Prior, R. W. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Ramírez, A., J., (2011). Influencia de las técnicas culinarias sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante en hortalizas de la dieta mediterránea. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.

Raymundo, L.C, C.O. Chichester, y K.L. Smpson. (1976). Light dependent carotenoid synthesis in tomato fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, 59-64.

REAL DECRETO 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización, publicado en el BOE de 20 de febrero de 2002. b) REAL DECRETO 1118/2007, de 24 de agosto, por el que se modifica el Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización.

Repo, C. R. y Encina, Z. C. R. (2008). Determination of antioxidant capacity and bioactive compounds in native peruvian fruits. *Revista Scielo Cielo Perú*.

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Esin Celik S., Bektasoglu, K. Berker I., Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12, 1496 – 1547.

Rivas, P.B.N., Leal, G.I. A., Loaiza, C.L.F., Morillo, Y. E., & Colina, C.J.C. (2017). Phenolic Compounds and antioxidant activity in extracts of four oregano species. *Revista técnica de la facultad de ingeniería. Universidad de Zulia*.

Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*.

Romero del soto, M.D. (2012) .Estudios de farmacotecnia y desarrollo en formas de dosificación de vegetales deshidratados para su aplicación en pediatría y personas de la tercera edad. Tesis doctoral, Granada.

Sánchez, S.I. y Trujillo, H.C. (2013). Estudio de nuevos antioxidantes naturales. Diseño de un laboratorio de análisis químico agroalimentario. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Seeram, N. P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S. M., Feng, L., Dreher, M., y Heber, D. (2008). Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich.

Sestili, Diamantinig, Bediniy (2002). Planta derivado fenólico compuestos impiden que el ADN de una sola hebra de rotura y la citotoxicidad inducida por terc-butilo a través de una plancha-quelante mecanismo. *Biochemical Journal*, 364, 121-128.

Shahidi F, Janitha P. K. & Wanacundara P. D. O. (1992). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32 , 67.

Stewart, I. y Wheaton, T.A. (1971). Continuous separation of carotenoids by liquids chromatography. *Journal of Chromatography A*, 55 , 325-336.

Stratil, P., Klejdus, B., & Kuban, V. (2006). Determination of total content of phenolic

Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J. O., Dommès J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various test. *Food Chemistry*. 113, 1226 – 1233.

Taga M, Miller E, Pratt D. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 61(5), 928-931.

Ulubele A., Topcu G., Kolak U. (2005). Labiatae flavonoids and their bioactiviy. *Studies in Natural Products Chemistry*, 30, 233-302.