

00528
88



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE
COMPUESTOS AISLADOS DE PLANTAS MEXICANAS Y SU
APLICACION PARA LA CONSERVACION DE
CACAHUATE TOSTADO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

MARIA TERESA / SOSA REYES



MEXICO, D.F. EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2003.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

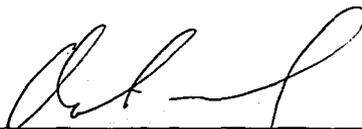
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado:

Presidente: Profra. Francisca Iturbe Chiñas
Vocal: Profra. Ma. de los Angeles Valdivia López
Secretario: Prof. Arturo Navarro Ocaña
1^{er} Suplente: Profra. Berta Julieta Sandoval Guillén
2^o Suplente: Prof. Jorge Aburto Anell

Sitio donde se desarrollo la tesis:

Departamento de Alimentos y Biotecnología
Laboratorio 321, Conjunto "E"
Facultad de Química, Ciudad Universitaria
Universidad Nacional Autónoma de México



ASESOR

Dr. Arturo Navarro Ocaña



SUSTENTANTE

María Teresa Sosa Reyes

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A toda mi familia, mis abuelitos, primos y tíos por el cariño y los valores que siempre se preocuparon por inculcarme, especialmente a mi abuelita Lolita y a mi tía Quina que siempre han estado ahí. A Lorena y a Victor por ser ese complemento tan necesario para mis papás y por el cariño que siempre me han demostrado.

A César por siempre estar, por tu actitud ante la vida, que me contagias y que me hace sentir increíblemente fuerte y capaz de lograr cualquier cosa. Eres parte de este trabajo y de mi vida. Te amo.

A todos mis amigos que han estado cerca a lo largo de mi vida y en momentos importantes. A Itzayana y Argelia. A Jessica, Hania, Marcela y Fernanda que desde el principio me mostraron apoyo e incondicional amistad, las quiero mucho. A Vanessa, Eduardo, Heidi, Bere, Isabel, Ruth y tantos otros, por enseñarme a trabajar en equipo y por los buenos momentos que pasamos juntos.

A mis compañeros del laboratorio y anexos, Sergio y Carlos porque me llena de orgullo contar con personas tan valiosas como ustedes y por lo divertido que es trabajar juntos. A Gabriel, Ángela, Leonardo, Ricardo, Miguel, Joanna, Sandra, Lilia, Daniel, Ernesto, Carmenflu, Alfonso, Dulce, Adriana y Agustín por su amistad y el apoyo para terminar este trabajo.

Al Dr. Arturo Navarro Ocaña por darme la oportunidad de trabajar con él y por su paciencia. A la M.en C. María de los Ángeles Valdivia por sus comentarios y asesoría. A la Q.F.B. Julieta Sandoval por su apoyo en todo momento.

Al subprograma 127 de Formación Básica en Investigación en el periodo 2002-2003 por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

A la Universidad porque me diste y me enseñaste tanto durante estos años, que ahora te llevo conmigo, para siempre.

DEDICATORIAS

A Teresa Reyes, porque eres mi motor, mi compañera y mi confidente eterna. No solo porque has sobrepasado tu labor como madre, sino por tus ganas y entusiasmo infinito para seguir adelante, que me ha impulsado en cada cosa que hago y por la admiración que siento por ti. Gracias mamá.

A Antonio Sosa, por tu valor, que en todo momento ha sido un ejemplo para mi, por la presencia a cada instante a pesar de la distancia, por tu amor maternal, por la confianza que siempre me has dado para hacer cualquier cosa, y porque ¿qué haría yo sin ti? Gracias papá.

Es un orgullo ser su hija, los amo.

A mi hermanita Ana Lorena porque es una alegría tenerte y por el compromiso ante la vida que significas para mí. Espero algún día verte como profesionalista.

INDICE

1. RESUMEN	
2. INTRODUCCIÓN	1
3. ANTECEDENTES	3
	6
3.1 Oxidación lipídica en los alimentos	7
3.1.1 Autooxidación de lípidos	8
3.1.1.1 Etapas de la autooxidación	9
3.1.1.2 Productos secundarios	11
3.1.2 Técnicas para evaluar oxidación lipídica	14
3.1.3 Implicaciones tecnológicas y nutricionales	19
3.2 Antioxidantes	20
3.2.1 Clasificación	21
3.2.2 Mecanismo de Acción	21
3.2.2.1 Sinergismo	24
3.2.3 Antioxidantes Naturales	25
3.2.3.1 Xantonas	34
3.2.3.2 Iridoïdes	35
3.2.3.3 Ésteres de ácidos p-hidroxicinámicos	37
3.2.4 Métodos de evaluación de la actividad antioxidante	39
3.2.4.1 Método FRAP	40
3.2.4.2 Método TRAP	40
3.2.4.3 Método ORAC	41
3.2.4.4 Método radical DPPH	41
3.2.4.5 Método radical ABTS	42
3.2.4.6 Blanqueo con β-caroteno/ácido linoléico	43
3.3 Estabilidad del aceite de cacahuete	44

4. OBJETIVOS	46
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	48
5.1 Diagrama de trabajo	49
5.2 Primera Parte: purificación de los compuestos	50
5.3 Segunda Parte: evaluación de la actividad antioxidante	52
5.3.1 Determinación Cualitativa de Actividad	52
5.3.2 Determinación Cuantitativa de Actividad	53
5.4 Tercera Parte: determinación de periodo de inducción	55
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
6.1 Primera Parte: purificación de los compuestos	58
6.2 Segunda Parte: evaluación de la actividad antioxidante	59
6.2.1 Determinación Cualitativa	59
6.2.2 Determinación Cuantitativa	61
6.3 Tercera Parte: determinación de periodo de inducción	71
7. CONCLUSIONES	76
8. BIBLIOGRAFIA	78

1. RESUMEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ante el gran interés que se ha mostrado en los últimos años, no solo del área científica sino de la sociedad en general, en los compuestos con propiedades antioxidantes, por el efecto benéfico que se les atribuye en la salud y a los estudios diversos que han demostrado que algunos antioxidantes sintéticos que son utilizados como aditivos en alimentos tales como BHA y BHT pueden tener propiedades carcinógenas; surge la inquietud de investigar fuentes alternas de antioxidantes a las que ya se conocen. Aunado a esto, la tendencia por utilizar y consumir compuestos de fuentes naturales y los avances tecnológicos en técnicas de purificación de laboratorio, ha fomentado la investigación de productos naturales y la selección de materias primas para la identificación de nuevos antioxidantes.

En este trabajo se estudió la capacidad antioxidante y secuestrante de seis compuestos aislados de plantas mexicanas, pertenecientes a tres grandes grupos de compuestos naturales. Se trabajó con 1,3,5,6-tetrahidroxi-2(3-3-dimetilalil)xantona (**X1**) y 1,3,5-trihidroxi-2(3-3-dimetilalil)xantona (**X2**), del grupo de las Xantonas; con Catalpol (**CP**), Catalpol acetilado (**CP-A**) y boschnalósido (**BSH**) del grupo de Iridoides y con cafeato de bornilo (**CB**) de los Fenilpropanoides. El estudio se llevó a cabo en tres partes, en la primera se realizó la purificación y caracterización de algunos de los compuestos mediante métodos de separación como cromatografía en columna y en capa fina, recristalizaciones y análisis de espectroscopia IR, EM y RMN H^1 y C^{13} . En la segunda parte se evaluó cualitativa y cuantitativamente la actividad antioxidante y secuestrante de los seis compuestos por tres diferentes métodos: Radical DPPH, ABTS enzimático hidrofílico y blanqueo con β -caroteno/ácido linoléico; en la tercera parte, fueron seleccionados X1, X2 y CB que mostraron mayor actividad en las pruebas cualitativas y fueron adicionados por aspersión en cacahuate tostado molido a concentración de 200 ppm y en mezclas 150:50 ppm con Butilhidroxianisol (BHA) como estándar y para evaluar propiedades sinérgicas. El seguimiento de la oxidación de la grasa del cacahuate se realizó midiendo el índice de peróxidos y de Kreis durante 35 días. CB resulto el compuesto con mayor capacidad antioxidante prolongando el periodo de inducción más de 35 días en comparación con la muestra control, que fue de 14 días y generando una menor producción de hidroperóxidos que las muestras que contenían X1 y X2.

2. INTRODUCCIÓN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El estudio de productos naturales es un área que ha adquirido gran importancia en los últimos años debido a la rapidez con la que se ha desarrollado la tecnología y que ha facilitado el análisis de plantas y extractos, permitiendo desarrollar nuevas técnicas para purificación e identificación de una amplia variedad de nuevos compuestos y para determinar su actividad biológica. Además, la tendencia cada vez más generalizada de utilizar productos naturales que sustituyan a los sintéticos, ha propiciado la búsqueda de fuentes alternas a la síntesis orgánica.

Muchas investigaciones en productos naturales han revelado que existe una gran variedad de compuestos naturales (flavonoides, ácidos fenólicos, terpenoides, etc.) que poseen importantes propiedades antioxidantes y en ocasiones mayores que muchos antioxidantes sintéticos.

Los antioxidantes son compuestos que juegan un papel muy importante en sistemas susceptibles a la oxidación. Diversos trabajos de investigación afirman que muchos productos de oxidación son considerados como tóxicos, ya que se les atribuyen propiedades oxidativas, mutagénicas y carcinógenas, porque pueden reaccionar con algunas proteínas, causando pérdida de la actividad de muchas enzimas, escisión de polipéptidos, daño celular y de ADN, factores que pueden influir en el desarrollo de enfermedades como cáncer, arterosclerosis y alzheimer.

El desarrollo de sustancias antioxidantes a partir de fuentes naturales es de gran importancia para la industria química, especialmente en el área de alimentos, ya que los cambios producidos en el alimento por deterioro oxidativo, generan graves pérdidas económicas. Aunado a esto, el alto consumo de los antioxidantes sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA), terbutilhidroxiquinona (TBHQ) y el butilhidroxitolueno (BHT), que se emplean actualmente en alimentos, ha sido considerado como riesgoso para la salud, ya que diversos estudios han demostrado que poseen propiedades carcinógenas. De acuerdo con esto, la identificación y purificación de compuestos antioxidantes naturales con características de inocuidad, bajo costo, adecuada incorporación y estabilidad térmica y química, es esencial para un mejor uso comercial de aditivos antioxidantes.

Muchos productos naturales que poseen alta actividad antioxidante son ampliamente utilizados como aditivos en alimentos como: el β -caroteno, el ácido rosmarínico, tocoferoles, ácido ascórbico entre otros. Esta situación alienta la búsqueda de compuestos con características especiales en su estructura que permitan obtener nuevas alternativas de aditivos antioxidantes.

Es por esto que este trabajo se enfoca a evaluar la capacidad antioxidante de seis compuestos aislados de fuentes naturales: 2 xantonas, 1,3,5-trihidroxi y 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (**X1**) y (**X2**); tres iridoideas, catalpol (**CP**), catalpol acetilado (**CP-A**) y boshnalósido (**BHS**); y un fenilpropanoide, cafeato de bornilo (**CB**), que por la estructura química que presentan y estudios previos que se han realizado, muy probablemente presenten actividad antioxidante considerablemente alta. Así mismo será evaluado su comportamiento como aditivos en cacahuete tostado, un alimento, que por su alto contenido de grasa (50%) sobretodo en ácidos grasos insaturados y el proceso de tostado al que es sometido, es altamente susceptible a la oxidación, esto lo hace un modelo de estudio adecuado para la evaluación de actividad antioxidante.

3. ANTECEDENTES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.1 Oxidación Lipídica en Alimentos

Los lípidos son uno de los componentes principales en casi todos los alimentos, y junto con proteínas y carbohidratos constituyen el grueso de los componentes estructurales de todas las células vivientes, ya que están presentes en plantas y animales formando parte de las membranas celulares o como lípidos de reserva. Por esta razón, los lípidos requieren de especial atención, ya que debido a su gran reactividad afectan directamente la calidad de los alimentos. En las condiciones en las que generalmente se almacenan los alimentos y los procesos a los que comúnmente son sometidos, la oxidación es una de las reacciones que frecuentemente afectan a los lípidos y por tanto, una de las principales causas de deterioro de los alimentos; ya que al reaccionar con oxígeno del medio, provoca en los ácidos grasos, principalmente los insaturados, cambios en la estructura de los mismos, que se manifiestan en el desarrollo de una gran variedad de compuestos volátiles que tienen una actividad olfatoria extraordinariamente grande que modifican las características sensoriales del alimento y que a menudo son juzgadas como desagradables por los consumidores. Además, la oxidación de lípidos y los productos que se forman a partir de ella, genera también la disminución de la calidad nutricional del alimento por la oxidación de algunas vitaminas y reacciones con proteínas y aminoácidos que resultan en compuestos que son potencialmente tóxicos. Por estas razones, el control de la oxidación de lípidos representa un gran interés económico para la industria alimentaria.

La oxidación de los ácidos grasos está ligada a reacciones como la lipólisis o hidrólisis de triacilglicérol. En la mayoría de los aceites y grasas vegetales los ácidos grasos se encuentran esterificando al glicérol como triacilglicérol; la lipólisis, ya sea enzimática o química, da lugar a la liberación de ácidos grasos por hidrólisis de los enlaces éster, haciendo que los ácidos grasos queden más expuestos a los procesos de oxidación. (Fig. 3.1)

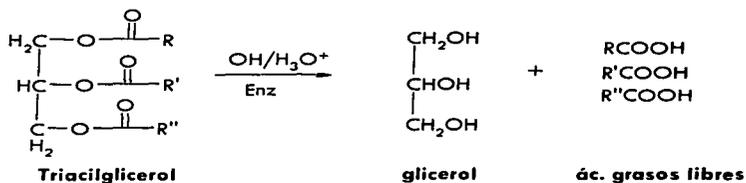


Figura 3.1. Hidrólisis de un triacilglicérol generando glicérol y ácidos grasos libres.

Una vez liberados los ácidos grasos, las reacciones de oxidación ocurren con mayor facilidad. Estas reacciones pueden darse por tres causas: 1. presencia de enzimas lipooxigenasas, que son metaloproteínas con un ion Fe en el centro activo y que catalizan la oxigenación de ciertos ácidos grasos insaturados a monohidroperóxidos; 2. reacciones de autooxidación, en donde ocurre el ataque de oxígeno triplete a los ácidos grasos catalizado por temperatura, luz y iones metálicos del medio, formando radicales de estas moléculas y generando una serie de reacciones en cadena que darán origen a los compuestos responsables del enranciamiento de la grasa; y 3. reacciones de fotooxidación, donde el oxígeno en estado triplete pasa a singulete mediante un fotosensibilizador (generalmente clorofila) y posteriormente reacciona con los ácidos grasos dando productos de oxidación mediante reacciones "ene", que son similares a los productos generados en la autooxidación y que también afectan la calidad de la grasa. En el proceso de fotooxidación la presencia de antioxidantes fenólicos no tiene efecto alguno, a diferencia de la autooxidación, en donde este tipo de antioxidantes actúan deteniendo las reacciones en cadena de radicales libres e impiden la formación de hidroperóxidos. (3,8,31)

En este trabajo se evalúa la actividad antioxidante de compuestos con estructuras similares a los antioxidantes fenólicos y por esta razón se estudiará con mayor puntualidad el fenómeno de autooxidación tomándose en cuenta como el principal causante del deterioro de las grasas en alimentos.

3.1.1 Autooxidación de lípidos

La autooxidación de lípidos es una serie de reacciones en cadena que tienen lugar por un mecanismo típico de radicales libres, que al entrar en contacto con oxígeno molecular y en presencia de algún catalizador como luz, temperatura o iones metálicos, forman radicales intermediarios que actúan autocatalíticamente. El proceso de autooxidación depende de muchos factores, tales como: 1. la composición de los ácidos grasos, ya que el número, posición y geometría de los dobles enlaces influye en la velocidad de oxidación, de la misma manera, los ácidos grasos se oxidan a una velocidad mayor cuando están en forma libre que cuando están esterificando al glicerol; 2. la concentración del oxígeno, si el suministro de oxígeno es ilimitado la velocidad de oxidación es independiente, pero si la presión de oxígeno es muy baja, la velocidad es aproximadamente proporcional a ella; 3. la temperatura, la velocidad de oxidación

aumenta al incrementarse la temperatura, además es importante por el efecto que tiene sobre la presión parcial de oxígeno: a medida que la temperatura aumenta, el oxígeno es menos soluble y por tanto el aumento de la velocidad de oxidación es menos importante, a pesar de que se incremente la concentración de oxígeno; 4. la superficie de contacto, la velocidad de oxidación aumenta proporcionalmente con el área expuesta al oxígeno; 5. la humedad, el incremento del contenido de humedad retarda la oxidación lipídica, este efecto de protección del agua puede producirse por reducción de la actividad de los catalizadores metálicos, por destrucción de los radicales favoreciendo el pardeamiento no enzimático (que da lugar a compuestos con actividad antioxidante) y/o impidiendo el aumento de la movilidad de los catalizadores; 6. presencia de pro-oxidantes, tales como cobalto, cobre, hierro, manganeso y níquel que aceleran el periodo de inducción aumentando la velocidad de oxidación, incluso a concentraciones inferiores a 0.2 ppm; 7. la energía radiante, las radiaciones visibles, UV y γ son también promotores de la oxidación, debido a que son absorbidas por un fotosensibilizador, el cual, reacciona para formar productos intermedios que a su vez reaccionan con oxígeno dando los productos de oxidación; 8. antioxidantes, que retardan o disminuyen la velocidad de oxidación al inhibir la formación de radicales libres que desencadenan las reacciones de autooxidación y comúnmente se encuentran de forma natural en los alimentos.

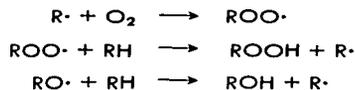
Debido a la gran variedad de factores que intervienen en la oxidación de los lípidos y las numerosas reacciones que ocurren, se ha descrito el proceso de autooxidación por etapas para facilitar su estudio. Etapas en las cuales se pueden apreciar los cambios que sufren los ácidos grasos y los productos que se van generando a partir de ellos.

3.1.1.1 Etapas de la autooxidación

La autooxidación de los ácidos grasos consta de cuatro etapas: iniciación, propagación, multiplicación y terminación. La etapa de iniciación comienza con la generación de radicales libres ($R\cdot$), a partir de moléculas de los ácidos grasos (RH) por medio de algún catalizador (iones metálicos, metaloproteínas) o una fuente de energía externa (calor, luz, o energía radiante).



En la etapa de propagación, el radical libre producido ($R\cdot$) reacciona con oxígeno y genera radicales alcoxi ($RO\cdot$) o peroxi ($ROO\cdot$); los cuales, sustraen de modo selectivo el átomo de hidrógeno más débil unido en la molécula del ácido graso, formando hidroperóxidos ($ROOH$). Esta reacción genera otro radical libre alquilo ($R\cdot$) provocando un fenómeno de autopropagación.



Generalmente los átomos de hidrógeno susceptibles al ataque de radicales, son hidrógenos α -alílicos unidos a dos de los enlaces en la cadena. El radical de carbono formado es estabilizado por deslocalización del electrón, formando un sistema conjugado.

Dada la estabilidad relativa de los radicales peroxi, la propagación de la reacción en cadena por sustracción de un átomo de hidrógeno transcurre muy lentamente, por lo tanto esta fase determina la velocidad de la reacción en cadena de los radicales.

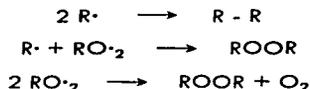
En la etapa de multiplicación, la peroxidación de los ácidos grasos insaturados se acelera autocatalíticamente, porque se forman radicales por escisión monomolecular de los hidroperóxidos.



Y pasado un cierto tiempo en el que la concentración de hidroperóxidos alcanza un nivel alto, se produce la formación de radicales por reacción bimolecular del hidroperóxido.



Por último comienzan las reacciones de terminación, en donde dos radicales se combinan para dar productos estables que no favorecen la propagación. (1,2,3,8)



Los hidroperóxidos formados hasta este momento continúan reaccionando en oxidaciones posteriores, dando lugar a una amplia variedad de productos de descomposición. Cada hidroperóxido origina una serie de productos de ruptura iniciales típicos de cada uno de ellos, que depende de su posición en la molécula del ácido graso original. Estos productos son comúnmente llamados "productos secundarios" y son de gran importancia en el estudio de la oxidación lipídica ya que son un parámetro muy importante para evaluar el grado de deterioro del alimento.

3.1.1.2 Productos Secundarios

Los hidroperóxidos, productos primarios procedentes de la autooxidación de los ácidos grasos, son compuestos inodoros e insípidos y sumamente inestables que reaccionan fácilmente con otros radicales u oxígeno del medio sufriendo reacciones de descomposición. Cuando ocurren estas reacciones, la calidad del alimento comienza a alterarse por la generación de una gran variedad de compuestos volátiles secundarios con umbrales de detección muy bajos, que modifican considerablemente el olor y el sabor del alimento, a pesar de que se produzcan en pequeñas cantidades (desde 2 hasta 900 μ g/g de ácido graso).

Los hidroperóxidos se descomponen según se van formando. Al inicio de la autooxidación, la velocidad de formación es mayor que la velocidad de descomposición, pero al final ocurre lo contrario. Esta descomposición de hidroperóxidos ocurre por etapas; en la primera, se da la ruptura del enlace oxígeno-oxígeno del grupo hidroperóxido, dando lugar a un radical alcoxilo ($RO\cdot$) y a un radical hidroxilo ($\cdot OH$); en la segunda etapa se da la ruptura del enlace carbono-carbono a uno y otro lado del grupo alcoxilo, por lo tanto cada hidroperóxido da lugar a mínimo cuatro productos de descomposición y estos a su vez generan una gran variedad de compuestos que son resultado de oxidaciones, condensaciones y dimerizaciones posteriores (Fig. 3.2).

Los compuestos que se forman con mayor frecuencia son: aldehídos, cetonas, ácidos, epóxidos, alcoholes, alcanos y alquenos. La mayoría de estos compuestos poseen aromas característicos como: sebo, picante, metálicos, amargos, hierba, etc; que le confieren al alimento la característica de rancio.

La detección, identificación y cuantificación de productos secundarios es de suma importancia para el estudio de la oxidación de las grasas, ya que son utilizados en muchos experimentos como indicadores del deterioro de la grasa, para determinar periodos de inducción, y en general como un parámetro de control de calidad. Generalmente se utiliza cromatografía de gases para su identificación, pero existen muchos métodos cualitativos y cuantitativos para la medición directa o indirecta de productos secundarios y que son parte importante de las técnicas que se utilizan para evaluar la oxidación lipídica en alimentos. (3,8)

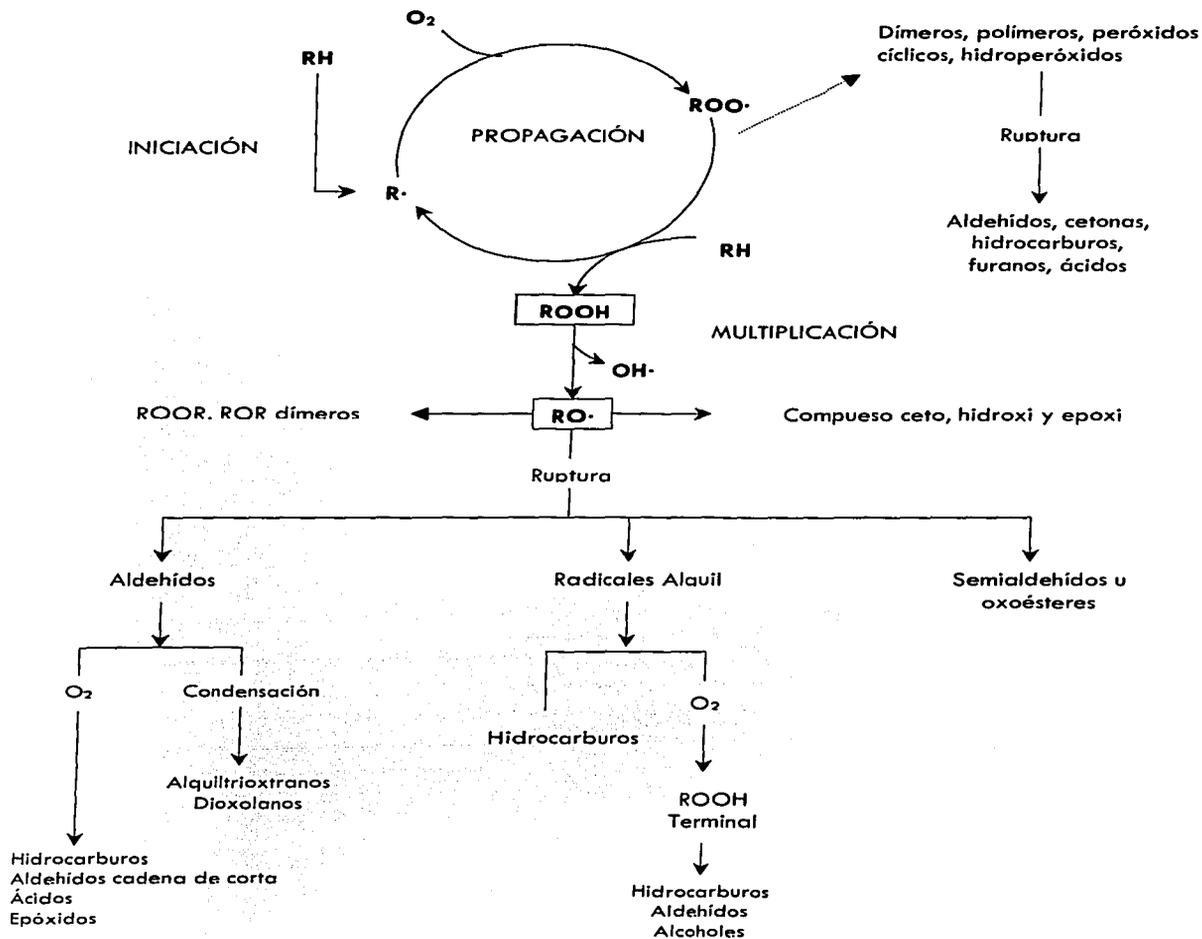


Figura 3.2 Esquema general del proceso de autooxidación de lípidos

3.1.2 Técnicas para evaluar oxidación lipídica

Dada la gran influencia que tiene la oxidación de las grasas en la calidad de los alimentos, se han ideado una gran variedad de técnicas para evaluarla, pero debido a lo complejo del proceso de autooxidación, no se ha encontrado hasta el momento, ninguna prueba que pueda determinar el grado de oxidación de los ácidos grasos en todas las etapas del proceso. Muchas de las pruebas que se han desarrollado se basan en reacciones donde participan alguno de los productos intermediarios o secundarios de la autooxidación que permitan cuantificarlos y tener una idea de la etapa en la que se encuentra el proceso y que tan deteriorado está el alimento. Existen también otras técnicas para evaluar la resistencia de la grasa a la oxidación, este tipo de pruebas se utiliza generalmente para determinar actividad antioxidante.

Algunos de los métodos más comúnmente utilizados para evaluar deterioro oxidativo son:

- Índice de Peróxido

Existen muchos procedimientos analíticos para medir el contenido de peróxidos en la grasa, los más comúnmente empleados se basan en una valoración yodométrica, donde se mide, por una valoración con tiosulfato de sodio, el yodo liberado del yoduro de potasio por la presencia de hidroperóxidos (Fig 3.3).

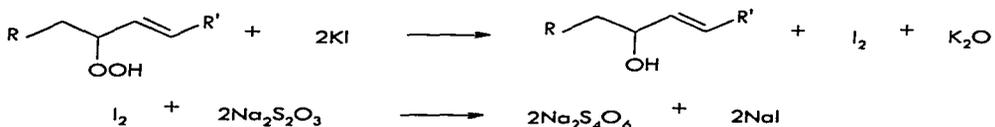


Figura 3.3 Reacciones de valoración yodométrica para determinar índice de peróxidos.

A pesar de ser una técnica empírica donde cualquier variación de las condiciones experimentales afecta directamente el resultado y la reproducibilidad del experimento, es ampliamente aceptada y recurrida para el análisis de grasas. ⁽⁵⁾

- Índice de Kreis

Es uno de los primeros métodos que se utilizaron para determinar oxidación de grasas. El procedimiento consiste en la medición de la absorbancia del color rojo que es generado al reaccionar el epihidrin aldehído u otros productos de oxidación con floroglucinol. Debido a la gran sensibilidad de esta prueba, existe el inconveniente de que a menudo las muestras frescas desarrollan algún color al reaccionar con el reactivo de Kreis. (7)

- Índice de Anisidina

Es otro método para medir la oxidación de ácidos grasos por medio de reacciones con productos secundarios, en especial de aldehídos con dos dobles enlaces conjugados con el doble enlace del grupo carbonilo. La *p*-anisidina reacciona con estos dialdehídos, en presencia de ácido acético, produciendo un color amarillento que se mide espectrofotométricamente a 350nm. La absorbancia aumenta al incrementar el número de insaturaciones, por lo que el resultado varía según el tipo de aceite que se utilice.

- Compuestos Carbonílicos Totales y Volátiles

Los métodos para determinar el contenido total de compuestos carbonílicos se basan en la medida de las hidrazonas producidas en la reacción de los aldehídos y las cetonas, productos secundarios, con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (Fig. 3.4).

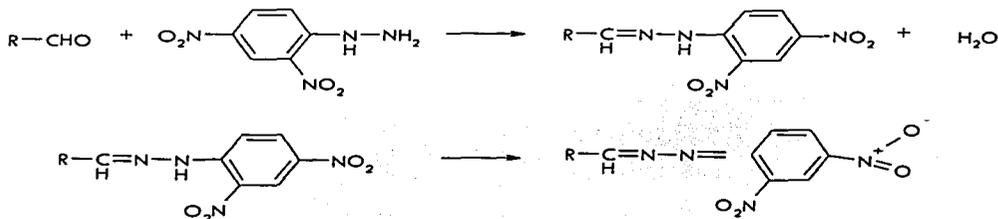


Figura 3.4 Reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina para determinación de carbonilos totales.

Sin embargo, en las condiciones que se realiza este análisis, pueden generarse carbonilos por descomposición de substratos inestables que interfieren en la cuantificación.

- Método de Ácido Tiobarbitúrico (TBA)

Es también uno de las técnicas más utilizados para evaluar oxidación lipídica principalmente en carnes. Indica que tan avanzado se encuentra el proceso de autooxidación, ya que mediante la condensación de dos moléculas de TBA con una molécula de malonaldehído se forma un compuesto cromógeno rojo que es fácilmente detectable por espectrofotometría a 540nm (Fig. 3.5)

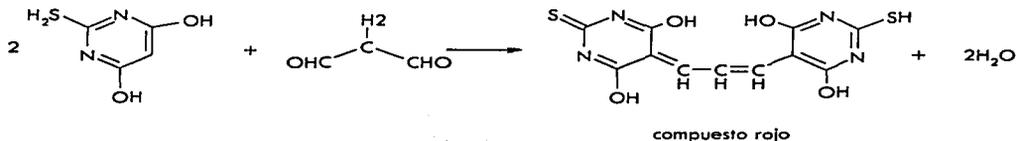


Figura 3.5 Reacción de condensación de malonaldehído y TBA.

El malonaldehído es un producto secundario de la oxidación de ácidos grasos con dos o más dobles enlaces en su cadena, por lo tanto no siempre se encuentra presente en los sistemas oxidados, sin embargo el ácido tiobarbitúrico reacciona también con alcanales, alquenes y dienes generando compuestos amarillos detectables a 450nm. (6)

- Test del Oxirano

Este método se basa en la adición de haluros de hidrógeno al grupo oxirano. El contenido de epóxido se determina valorando la muestra con HBr en ácido acético, en presencia de cristal violeta, hasta obtener un color verde azulado. Este análisis es poco sensible y carece de especificidad. Los haluros de hidrógeno atacan también a los grupos carbonilos α - β insaturados y a los dienos conjugados, y la reacción no es cuantitativa con algunos epóxidos *trans*.

- Índice de Yodo

Este análisis es una medida de los enlaces insaturados de una grasa y se expresa en función del porcentaje de yodo absorbido. La caída del índice de yodo se utiliza a veces para controlar la reducción del contenido de ácidos dienóicos a lo largo del proceso de autooxidación.

- **Métodos Cromatográficos**

Se emplean diversas técnicas de análisis como HPLC por medio de la cual se puede determinar la concentración de peróxidos, hidroperóxidos y productos secundarios ya sea volátiles o no. También se utiliza cromatografía de gases para medir hidrocarburos o aldehídos volátiles liberados por oxidación de productos intermediarios, especialmente el pentano y el hexanal, que son dos de los productos volátiles mayoritarios generados y funcionan como indicadores de deterioro de la grasa. Uno de los inconvenientes de la cromatografía de gases es que la temperatura que se utiliza puede generar reacciones de peróxidos o de los productos secundarios que alteren el resultado real.

- **Determinación del periodo de inducción**

Al monitorear el proceso de autooxidación de las grasas se observa claramente que se divide en tres fases. Durante la primera, las reacciones de oxidación y generación de radicales ocurren lentamente y a una velocidad uniforme, donde las etapas de iniciación y propagación son las que ocurren con mayor frecuencia, en esta fase los cambios en la composición y características sensoriales de la grasa son difícilmente detectables. En la segunda fase, las reacciones de multiplicación y terminación se incrementan rápidamente, generando una mayor concentración de hidroperóxidos y aumentando la velocidad de oxidación muchas veces más que en la primera fase, esto sucede por un periodo de tiempo muy corto, hasta llegar a un punto en donde la velocidad de producción de hidroperóxidos comienza a descender por las reacciones de terminación y la descomposición de hidroperóxidos a productos secundarios.

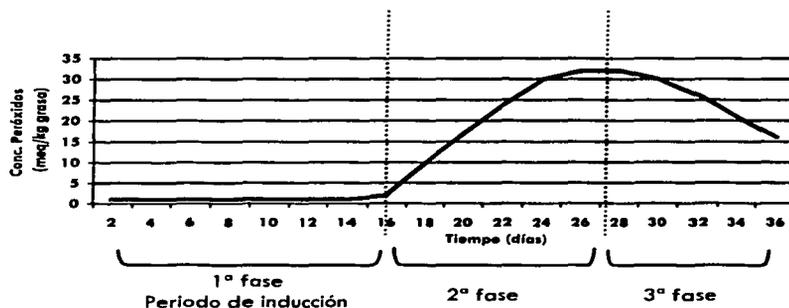


Figura 3.6 Gráfica de la cinética del proceso de autooxidación. Medición del periodo de inducción.

A la primera fase se le llama periodo de inducción, el tiempo en que tarda la oxidación de un ácido graso en producir hidroperóxidos, su medición es de suma importancia ya que además de indicar la resistencia de la grasa a la oxidación, aquí se puede evaluar que tan efectivo resulta un antioxidante, ya que se mide que tanto incrementa el periodo de inducción en comparación con un control. (2) Existen muchos métodos y aparatos para evaluar la resistencia a la oxidación de las grasas y determinar el periodo de inducción, todos se basan en la evaluación del comportamiento de la grasa con respecto al tiempo y algunos de ellos se complementan con técnicas para medir deterioro oxidativo. Entre los métodos mas utilizados tenemos:

- Test de Schaal Oven

En esta prueba la muestra se almacena a 65°C y se examina periódicamente mediante algún método para evaluar deterioro oxidativo. El índice de peróxidos es el más recomendado. De esta forma se obtiene una curva de la velocidad de oxidación de la grasa, al graficar el índice de peróxidos y el tiempo transcurrido en cada medición. En la etapa inicial del experimento la oxidación es muy lenta, a lo que se le llama periodo de inducción el cual termina con un incremento repentino en el índice de peróxido. (7)

- Método de Oxígeno Activo

En este método la muestra se mantiene a 98°C, mientras se le burbujea continuamente aire a velocidad constante, determinándose el tiempo requerido para obtener un índice de peróxido dado.

- Prueba Sylvester o de Absorción de Oxígeno

Una forma de medir la estabilidad de una muestra es medir la cantidad de oxígeno absorbido dada por el tiempo necesario para hacer bajar la presión específica en una cámara cerrada, o por el tiempo para absorber una cantidad preestablecida de oxígeno en condiciones de oxidación específicas. Un método muy utilizado es el de la bomba de oxígeno, en donde la muestra se dispersa en una masa filtrante en el recipiente de vidrio de una bomba cerrada a una presión de oxígeno de 50 psig. La bomba se introduce en agua hirviendo y se mide el tiempo necesario para reducir la presión a 2 psig. Para estas pruebas suelen utilizarse distintos aparatos que miden la presión de oxígeno y grafican automáticamente los periodos de inducción. (1,2,5,6,7,8)

3.1.3 Implicaciones tecnológicas y nutricionales

La oxidación lipídica en los alimentos es generada principalmente por enzimas presentes en los mismos o por procesos a los que son sometidos donde generalmente existe algún tipo de calentamiento, que en combinación con el oxígeno del medio, da lugar a una multitud de compuestos intermedios y productos finales de descomposición que varían ampliamente en sus propiedades físicas y químicas y que producen cambios en el sabor, aroma, aspecto, valor nutritivo y toxicidad del alimento.

Estos cambios en ocasiones son deseables, ya que le confieren al alimento las cualidades típicas de aroma, sabor y color de un proceso de horneado, calentamiento o fritura, que son muy agradables al paladar. Sin embargo, cuando estos cambios surgen como resultado de una falta de control en las condiciones del proceso, se presenta una descomposición de la grasa, que puede ser una fuente potencial de daño, no solo para las cualidades organolépticas del alimento al desarrollar aromas desagradables de enranciamiento, sino también para su valor nutritivo dado que muchas vitaminas, aminoácidos y proteínas son inactivadas al reaccionar con los productos secundarios. (8)

Además, muchos estudios han revelado que los productos generados por la autooxidación de las grasas son potencialmente tóxicos. Ya que a partir de los productos secundarios se forman otros como ácidos carboxílicos hidroxilados, monómeros cíclicos, dímeros y polímeros, hidrocarburos aromáticos policíclicos, esteroides oxidados y aminas heterocíclicas, que son considerados como tóxicos por sus propiedades oxidativas, mutagénicas y carcinógenas.

Se ha encontrado que estos compuestos causan afecciones como: disminución de crecimiento corporal, en el desarrollo óseo y en algunas funciones inmunológicas (10), diarrea aguda, formación de tejido conectivo en músculo cardíaco (miopatías), anemia hemolítica, deficiencias en vitaminas A y E, cáncer en estómago, próstata y colon, insuficiencia renal, arterosclerosis(11), anorexia, entre otras. (1,2,8)

Si bien es cierto que el ser humano cuenta con sistemas metabólicos de defensa ante procesos oxidativos tales como: enzimas superóxido dismutasa, glutatión oxidasa, catalasa y vitaminas E y C con propiedades antioxidantes; un alto consumo de grasas oxidadas genera un desequilibrio

en este sistema de defensa, lo que representa un riesgo a la salud. Es por esta razón la gran importancia de los antioxidante en nuestra dieta.

3.2 Antioxidantes

Se define como antioxidante a toda sustancia química que retarda el comienzo o disminuye la velocidad de oxidación de materiales autooxidables. En el caso de los lípidos, el uso de antioxidantes como aditivos se ha convertido en una de las alternativas más viables para su conservación, a pesar de que existen muchas otras opciones para aumentar la vida de anaquel de los alimentos, por ejemplo: empaque al vacío o bajo atmósferas controladas, refrigeración o congelación; sin embargo estos procesos no siempre pueden ser aplicables o significan un costo adicional al proceso muy alto. Es por esto que el uso de antioxidantes representa grandes ventajas como el aumento de la vida de anaquel del producto, menores costos y desechos y mayores posibilidades de utilizar diferentes tipos de materias primas y procesos.

En un antioxidante se busca inocuidad al ser consumido, que no imparta olores o sabores al alimento, efectividad a bajas concentraciones, facilidad de incorporación (solubilidad, punto de fusión), resistencia a procesos de calentamiento y bajo costo.

En general, un compuesto antioxidante (AH) funciona donando el electrón faltante de la especie oxidada (R·) y así interrumpir la cadena de reacciones de radicales libres.



La eficacia de un antioxidante está relacionada con muchos factores como la energía de activación, las constantes de velocidad, el potencial de óxido-reducción, la facilidad con la que se puede destruir o perder el antioxidante, su solubilidad en el aceite y su volatilidad. (2,8).

Existen muchos tipos de compuestos antioxidantes que manifiestan diferencias sustanciales en su eficiencia según el tipo de aceite o alimento al que sean añadidos o en diferentes condiciones de procesamiento o manipulación. Es por esto que son clasificados para tener mayor facilidad al emplearlos como aditivos.

3.2.1 Clasificación

Existe una gran variedad de compuestos, tanto naturales como sintéticos, con propiedades antioxidantes que difieren en la forma de captar los radicales libres e impedir el proceso de oxidación. En base a su mecanismo de acción, son clasificados en dos grupos: antioxidantes primarios y secundarios, dividiéndose estos a su vez en inhibidores, receptores de oxígeno y agentes quelantes.

3.2.2 Mecanismo de Acción

Los antioxidantes primarios actúan deteniendo la cadena de reacciones de radicales libres de la autooxidación, donando átomos de hidrógeno o electrones a los radicales libres, convirtiéndolos en productos estables o formando complejos lípido-antioxidante. Los compuestos que se encuentran dentro de este grupo son compuestos de naturaleza fenólica, que tienen la capacidad de reaccionar con especies deficientes de electrones por medio de reacciones de sustitución electrofílica, que al entrar en contacto con radicales libres se forma un radical fenoxi que es estabilizado por deslocalización del electrón en el anillo aromático. (1,4,12)

Los compuestos fenólicos se oxidan con mayor facilidad con grupos hidroxilo o amino como sustituyentes en posiciones *orto* o *para* (Fig. 3.7). Las estructuras de resonancia son las siguientes:

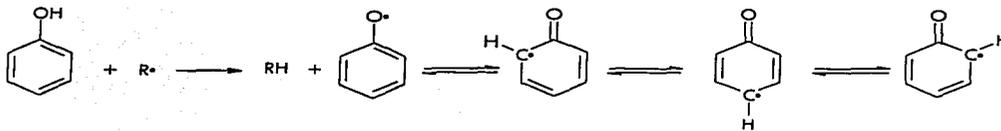


Figura 3.7 Estructuras de resonancia de un radical fenoxi.

Entre los antioxidantes primarios más conocidos tenemos: butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroxiquinona (TBHQ), $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ tocoferoles, goma guayac, galatos, hidroxiquinonas, ácido norhidroguayarático, trihidroxibutiroquinona (THBP), Trolox-C, entre otros (Fig. 3.8).

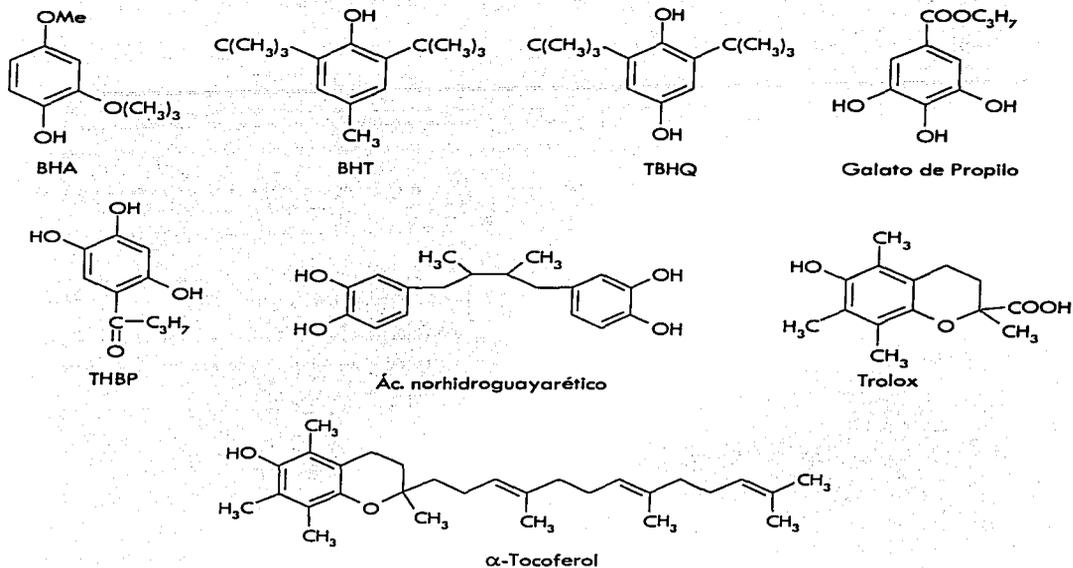
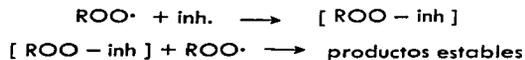


Figura 3.8 Ejemplos de algunos antioxidantes primarios.

Los antioxidantes secundarios pueden reaccionar de diferentes maneras; pueden actuar como inhibidores al reaccionar con un radical formando un complejo entre el inhibidor y el radical y posteriormente reaccionar con otro radical formando productos estables.



Los compuestos aceptores de oxígeno, reaccionan con oxígeno singulete atrapándolo en un sistema cerrado y eliminándolo de la reacción. Los antioxidantes que presentan esta propiedad son: ácido ascórbico, sulfitos, palmitato de ascorbilo y eritorbatos.

Los compuestos quelantes, aunque no propiamente son antioxidantes, desempeñan un papel fundamental en la estabilización de alimentos al reaccionar con los iones metálicos que son importantes catalizadores de la oxidación lipídica. Un par de electrones no compartidos en estos compuestos fácilmente se puede coordinar o formar complejos con iones metálicos (Fig. 3.9). Los más comúnmente utilizados en alimentos son: ácido cítrico, tartárico, fítico, diferentes fosfatos, lecitina y sales del ácido etilendiaminotetracético (EDTA).

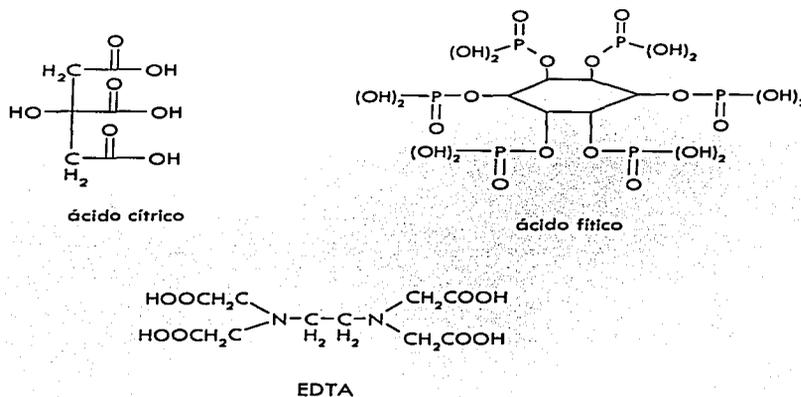


Figura 3.9 Estructuras de algunos agentes quelantes.

Existen también antioxidantes que capturan radicales alcoxí y peroxí, formando radicales que son estabilizados por resonancia y que no inician peroxidación. Un ejemplo de este tipo de compuestos son los carotenos (Fig. 3.10).

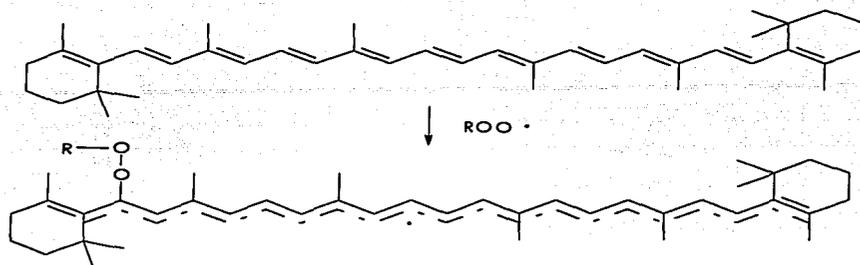


Figura 3.10 Reacción de β -caroteno con un radical peroxi.

Muchos otros compuestos antioxidantes no son empleados como aditivos pero actúan como antioxidantes de forma similar a los antioxidantes primarios y secundarios, a diferentes niveles en el organismo y que son sintetizados o ingeridos en la dieta. Como ejemplo se conocen el zinc, selenio, nitritos, aminoácidos, enzimas (glucosa oxidasa, catalasa, superóxido dismutasa), lípidos, flavonoides, vitamina A, extractos de plantas, etc. Actualmente se utilizan otro tipo de compuestos aumentan la capacidad antioxidante de algunos aditivos, se dice que este tipo de compuestos presentan propiedades sinérgicas.

3.2.2.1 Sinergismo

El fenómeno de sinergismo se produce cuando una mezcla de antioxidantes tiene una actividad más pronunciada que la suma de las actividades de los antioxidantes utilizados por separado. Por lo general los compuestos sinérgicos se emplean junto con antioxidantes primarios para potenciar la actividad antioxidante. Un compuesto sinérgico puede desempeñar una o varias funciones. Pueden actuar como donadores de iones hidrógeno a los radicales fenoxi, como secuestrantes de oxígeno, como agentes quelantes o proporcionando un medio ácido que incrementa la estabilidad de antioxidantes primarios. En general los compuestos sinérgicos facilitan o complementan la función de los antioxidantes primarios. Gran parte de los antioxidantes secundarios presentan actividad sinérgica. Ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, EDTA, ácido cítrico y fosfatos son algunos de los más importantes en la industria de alimentos.

3.2.3 Antioxidantes Naturales

Ante el gran interés que se ha mostrado en los últimos años, no solo del área científica sino de la sociedad en general, en los compuestos con propiedades antioxidantes y el efecto benéfico que se les atribuye en la salud; surge la inquietud de investigar fuentes alternas de antioxidantes a las que ya se conocen. Aunado a esto, la tendencia por utilizar y consumir compuestos de fuentes naturales que sustituyan compuestos sintéticos, ha fomentado la investigación de productos naturales y la selección de materias primas para la identificación de nuevos antioxidantes.

Muchos ingredientes comunes en alimentos como aceites, semillas, cereales, frutas, vegetales, especias, té, etc; son ricos en compuestos antioxidantes, pero estos ingredientes únicamente pueden emplearse en productos que les sean compatibles en textura, olor, color y sabor del producto terminado. Es por esto que la identificación y purificación de compuestos antioxidantes es esencial para un mejor uso comercial de antioxidantes naturales.

Muchos estudios en productos naturales han revelado que existe una gran cantidad de compuestos que presentan actividad antioxidante incluso mayor que muchos compuestos sintéticos que se utilizan como aditivos actualmente. Estos compuestos varían mucho en su estructura química, polaridad y mecanismos de acción. Entre los grupos de compuestos que más se han estudiado y se sabe que presentan propiedades antioxidantes tenemos: compuestos fenólicos, carotenos, tocoferoles, ascorbatos, proteínas, aminoácidos y algunos productos de la reacción de Maillard, que serán descritos con detalle a continuación.

- **Compuestos fenólicos**

Comprenden uno de los más grandes y variados grupos de metabolitos de plantas. Son sintetizados para proteger a la planta de estrés fotosintético, especies reactivas de oxígeno, heridas y ataque de herbívoros. Muchos estudios han demostrado que algunas subclases de estos compuestos poseen importante actividad antioxidante, anticancerígena y antiinflamatoria, tal es el caso de los ácidos fenólicos (benzoicos, cinámicos y derivados hidroxilados), flavonoides, lignanos y estilbenos. Como antioxidantes, participan interviniendo en las reacciones en cadena de radicales libres de la peroxidación lipídica, por lo que podrían ser clasificados como antioxidantes primarios, aunque en ocasiones actúan atrapando oxígeno y como quelantes de algunos iones metálicos. (22)

Los ácidos fenólicos como los ácidos benzoicos y cinámicos y sus derivados hidoxilados son parte muy importante en el grupo de compuestos fenólicos por la abundancia con la que se presentan en alimentos y plantas. Entre los hidroxibenzoicos encontramos al ácido salicílico, gentísico, gálico, vainillínico y egálico (Fig. 3.11), que se encuentran principalmente frutos como fresa, uva, naranja, toronja y limón. (23,24,25)

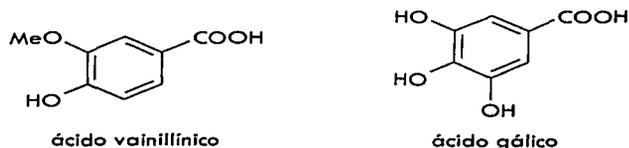


Figura 3.11 Ejemplo de ácidos benzoicos.

Los ácidos *p*-hidroxicinámicos más conocidos son el ácido caféico, ferúlico, *p*-cumárico y sinápico (Fig. 3.12); los derivados generalmente se encuentran como ésteres en combinación con glicerol, monoalcoholes de cadena larga, hidroxiacidos y dioles, en este grupo encontramos al ácido clorogénico, que es un éster de cafeato y a la curcumina formada por dos moléculas de ácido ferúlico unidas por un metileno.

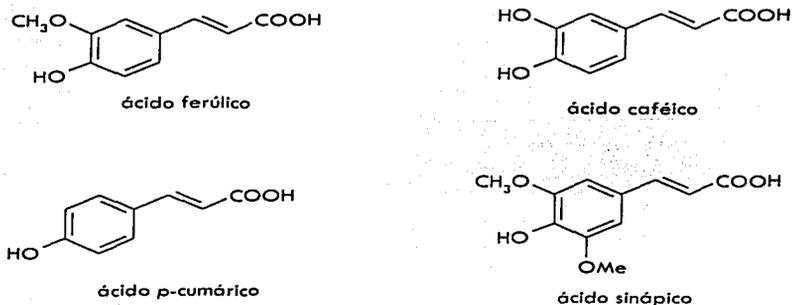


Figura 3.12 Ejemplo de ácidos hidroxicinámicos.

El ácido caféico se encuentra principalmente en manzanas, ciruelas, tomates, uvas y café; uno de sus derivados es el ácido clorogénico que se encuentra también en muchas frutas, pero principalmente en frijoles y café. El ácido ferúlico es un ácido hidroxicinámico que se aísla de cortezas de árboles, cereales, caña, café, etc. Un derivado muy importante y con alto poder antioxidante es la curcumina que se obtiene de la semilla de mostaza. La actividad antioxidante de estos compuestos depende de la posición en la que se encuentran los grupos hidroxilo, ya que activan el anillo aromático por efecto de resonancia. ⁽³²⁾ Otro grupo de gran importancia dentro de productos naturales con propiedades antioxidantes por la abundancia en la que se presentan en la naturaleza y evidentemente en la dieta humana, son los flavonoides. ⁽³³⁾

Los flavonoides constituyen el mayor grupo dentro de los compuestos fenólicos, más de 5000 compuestos diferentes se han descrito. Se encuentran en todas partes de la planta (tallos, hojas, semillas, frutos). Su actividad antioxidante es atribuida al número de hidroxilos que tiene la molécula y las estructuras de resonancia tan estables que permiten capturar radicales libres y crear complejos metálicos. Dentro de los flavonoides, las flavonas, flavanoles, isoflavonas, flavonoles y antocianinas son los compuestos que presentan una mayor actividad antioxidante. ⁽²²⁾

Las flavonas son un tipo de flavonoides con propiedades antioxidantes muy potentes. Las más comúnmente encontradas en alimentos son Apigenina y Luteolina (Fig. 3.13), de las cuales se sabe que Luteolina es significativamente más potente que BHA en un ensayo con β -caroteno. Se encuentran en alimentos como: cilantro, aceitunas, pimienta, arroz, cacahuete, avena, hojas de cebada.

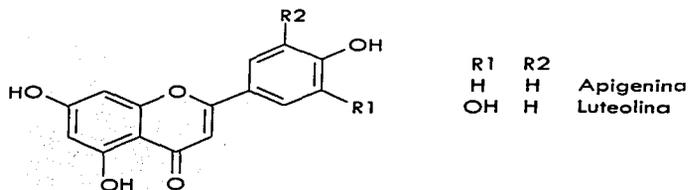


Figura 3.13 Estructura general de algunas Flavonas comúnmente encontrados en alimentos.

Otro grupo de flavonoides son los flavanoles, algunos de los más conocidos son epicatequina, epigalocatequina, epicatequin-3-galato, entre otros (Fig. 3.14). Generalmente se encuentran en gran abundancia en alimentos como: té negro y verde, vino tinto, manzanas, ciruelas, chocolate, uvas.

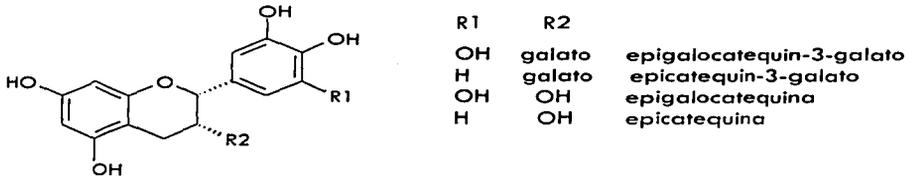


Figura 3.14 Estructura general de algunos Flavanoles comúnmente encontrados en alimentos.

Quercetina, miricetina y gossipetina son ejemplos de flavonoles (Fig. 3.15), otro grupo muy importante de flavonoides, que poseen importantes propiedades antioxidantes. Quercetina y gossipetina han sido reportados como los antioxidantes más potentes en sistemas no acuosos. Las fuentes que generalmente contienen flavanoles son: cebolla roja, col, apio, avena, manzanas, ciruelas, arándano, fresas, uvas, brócoli, jitomate, vino tinto, té negro y verde.

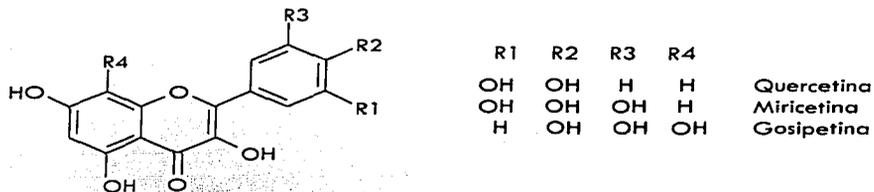
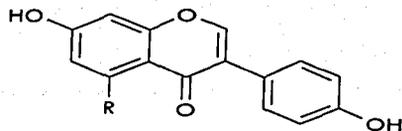


Figura 3.15 Estructura general de algunos Flavonoles comúnmente encontrados en alimentos.

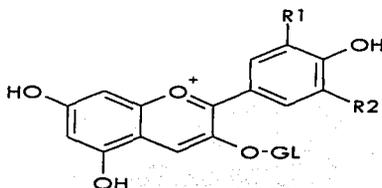
Las isoflavonas son otro grupo de compuestos muy importante dentro de los flavonoides, como la genisteína y la daidzeína (Fig. 3.16); aunque sus propiedades antioxidantes son en general menores a la de los flavanoles, flavonoles y flavonas. Pero se ha encontrado que poseen propiedades sinérgicas con fosfatidiletanolamina. Son escasas las fuentes de isoflavonas, generalmente se encuentran presentes en soya y garbanzos.



R=OH Genisteina
R=H Daidzeina

Figura 3.16 Estructura general de algunas Isoflavonas comúnmente encontrados en alimentos.

Por último las antocianinas, que pertenecen también a los flavonoides y además son uno de los pigmentos más abundantes en las plantas superiores, es otro grupo de compuestos que poseen importantes propiedades antioxidantes. Los compuestos más representativos de este grupo, por su abundancia, son el malvidin-3-glucósido y el cianidin-3-glucósido y que generalmente son parte importante de alimentos como chicharos, uva tinta y negra (Fig. 3.17).



R1 R2
OH H Cianidin-3-glucósido
OCH₃ OCH₃ Malvidin-3-glucósido

Figura 3.17 Algunos Flavonoles comúnmente encontrados en alimentos.

Los estilbenos y lignanos son otro tipo de compuestos fenólicos que poseen también importante actividad antioxidante. Los estilbenos son compuestos formados por dos fenilos conectados por un puente metilénico. No son abundantes en la naturaleza ya que son sintetizados por la planta a causa de lesiones o enfermedades. El estilbeno más conocido es el trans-reservatrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) que se encuentra frecuentemente en uvas, vino y cacahuete. Los lignanos son compuestos difenólicos, el seicosolariciresinol diglicósido, sesamol y el matairesinol son los más importantes en este grupo; generalmente se encuentran en harina de maíz y aceite de semilla de ajonjolí. (22,23,1)

• Carotenos

Los carotenos son hidrocarburos poliénicos, formados hasta por ocho unidades isoprenoides; esta estructura les permite atrapar radicales libres y oxígeno singulete del medio y estabilizar por resonancia en sus dobles enlaces conjugados a los radicales libres formados y evitar la propagación de las reacciones de autooxidación.⁽⁴⁶⁾ Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, sobretodo en flores y frutos. Son pigmentos amarillos, naranjas o rojos sintetizados por plantas superiores, algas, hongos y bacterias fotosintéticas (Tabla 3.1).

CAROTENOS		
Anteraxantina	β -zeacaroteno	Luteína
Auroxantina	Criptoflavina	Luteína-5,8-epóxido
α -criptoxantina	Capsantina	Luteoxantina
α -caroteno	Fitoeno	Mutacromo
β -caroteno	Fitoflueno	Mutatoxantina
β -caroteno-5,6-epóxido	Licopeno	Neoxantina
β -criptoxantina	Licoxantina	Zeaxantina
	Violaxantina	ζ -crofeno

Tabla 3.1 Carotenos presentes en frutos con actividad antioxidante.

El β -caroteno (Fig.3.18) es uno de los carotenos más importantes para la industria de alimentos porque además de ser excelente colorante y no tóxico, tiene un alto poder antioxidante ya que actúa atrapando los radicales libres formados por la estructura resonante que fácilmente adopta.

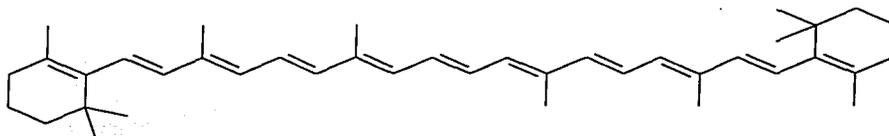
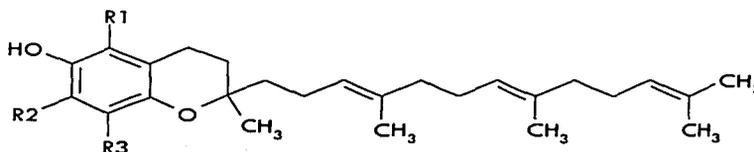


Figura 3.18 Estructura del β - caroteno

- Tocoferoles

Los tocoferoles y tocotrienoles son otro grupo importante de antioxidantes naturales. Son lípidos, derivados metilados del tocol, el 2-metil-2(4',8',12'-trimetil-tridecil)-croman-3-ol (Fig 3.19). Estos compuestos donan iones H a radicales peroxi y forman compuestos dimeros estables. Los cereales, frutos secos y aceites de semillas, frijoles, chícharos, zanahorias son fuentes ricas en tocoferoles.



	R1	R2	R3
α	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β	CH ₃	H	CH ₃
δ	H	CH ₃	CH ₃
γ	H	H	CH ₃

Figura 3.19 Estructura de $\alpha, \beta, \delta, \gamma$ tocoferol.

La actividad antioxidante de los tocoferoles aumenta en la serie $\alpha \rightarrow \gamma$, sin embargo en la velocidad de reacción con radicales peróxido ocurre lo contrario. La actividad relativa de estos compuestos se ve muy influenciada por la luz y la temperatura. (3,47)

- Ascorbatos

Los ascorbatos como ascorbato de sodio y calcio, ascorbil palmitato, estereato y ácido ascórbico (Fig. 3.20), son compuestos muy comunes en productos naturales y que poseen actividad antioxidante, actúan como sinergistas ya que son potentes agentes quelantes. El ácido ascórbico o vitamina C se utiliza ampliamente como aditivo en alimentos. (8,46)

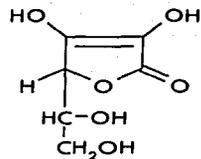


Figura 3.20 Estructura del ácido ascórbico 2,3-dienol-L-glucónico.

• Proteínas y Aminoácidos

Las proteínas, péptidos y aminoácidos actúan como antioxidantes primarios y sinergistas, sus propiedades dependen de su concentración y del pH del medio. Los aminoácidos glicina, metionina, triptofano, histidina, prolina y lisina son eficaces antioxidantes que son utilizados en productos cárnicos y lácteos y en la prevención de reacciones de oscurecimiento. Algunos de estos aminoácidos tienen la desventaja de que al descomponer los hidroperóxidos, forman compuestos carbonílicos que pueden conducir a un oscurecimiento no enzimático del alimento a través de reacciones de Millard.^(46,33)

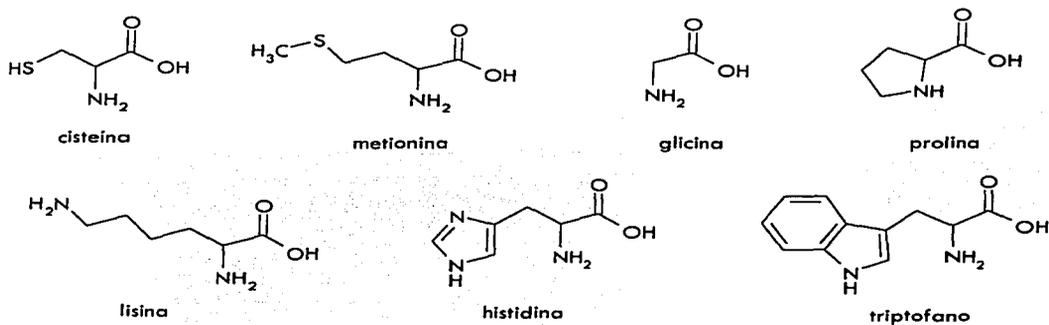


Figura 3.21 Aminoácidos con actividad antioxidante

Se sabe que el hidrolizado de soya y las proteínas de levadura, gluten, albúmina de huevo y caseína funcionan como sinergistas con antioxidantes primarios, esta propiedad ha sido atribuida a la presencia de grupos sulfhidrilo libres, como en el caso de cisteína o metionina y a los sustituyentes hidroxilo en el resto de los aminoácidos. (34)

- Productos de Maillard

A pesar de que no está muy definida la naturaleza de los productos de la reacción de Maillard que poseen actividad antioxidante, se sabe que sustancias de alto peso molecular como las melanoidinas son los principales responsables de las propiedades antioxidantes de las reacciones de oscurecimiento no enzimático. Generalmente se conocen los sistemas con los que se generan los compuestos antioxidantes, pero aún no se conoce exactamente la naturaleza de cada compuesto. Se sabe que la capacidad antioxidante de los compuestos formados depende de factores como la cantidad y tipo de compuestos amino y de azúcares involucrados en la reacción, la temperatura, pH y actividad acuosa. Existe evidencia de que actúan formando complejos inactivos secuestrando radicales de oxígeno, quelando iones metálicos, especialmente hierro. También se les ha asociado propiedades sinergistas en combinación con antioxidantes fenólicos. Se ha encontrado que varios compuestos heterocíclicos con heteroátomos nitrógeno y/o azufre, que son los principales compuestos generados en las reacciones de Maillard, presentan actividad antioxidante, tal es el caso de los alquiltiofenos, fufuralmercaptano, 2-tiazolidin, imidazol, 2-metilfurano, 2-metiltiofeno, 1-metilpirrol y algunas aminoreductonas. En las reacciones de Maillard se generan cientos de productos que pueden tener propiedades antioxidantes, pero entre estos también existen compuestos altamente tóxicos. (35,36)

Es de especial interés para este trabajo estudiar con mayor detalle tres grupos diferentes de compuestos naturales a los que pertenecen los seis compuestos que serán evaluados: xantonas, iridoides y fenilpropanoides. A estos grupos de compuestos no se les ha estudiado mucho en relación a sus propiedades antioxidantes pero, por sus características estructurales puede asociárseles una alta capacidad antioxidante.

3.2.3.1 Xantonas

Existe una amplia distribución de xantonas en la naturaleza, se encuentran distribuidas en más de una docena de familias en plantas superiores, se tienen reportes de alrededor de setenta diferentes xantonas que han sido aisladas de plantas. Esta variedad tan amplia corresponde a los diversos patrones de hidroxilación de la estructura básica de las xantonas derivada de la benzofenona (Fig. 3.22). En la mayoría de las xantonas, el anillo A presenta un claro patrón de oxigenación 1,3,5. En el anillo B se encuentra la variación para estos compuestos, ya que no existe ninguna patrón claro de sustitución, excepto la tendencia de los sustituyentes por posiciones *orto* o *para*, a diferencia de la posición *meta* que se presenta en el anillo A. Las xantonas son compuestos que pueden ser simples o modificadas, en este último caso por la presencia de un sustituyente isopreno (a) 2,2 dimetil o un cromeno (b); además por el grado de oxigenación que presentan pueden ser clasificadas como mono, di, tri, o tetraoxigenadas. ⁽²⁵⁾

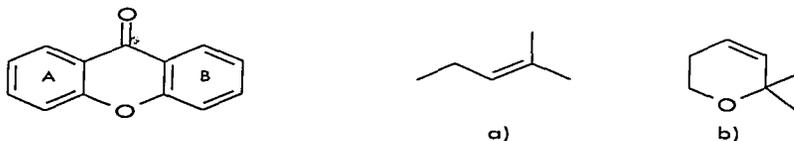


Figura 3.22 Estructura básica de las Xantonas. Sustituyentes a) isopreno y b) cromeno de xantonas modificadas.

Estudios recientes han demostrado que las xantonas son compuestos con gran actividad biológica, se les atribuye propiedades anti-inflamatorias, antihepatotóxicas, antivirales, antialérgicas, fungicida, antidepresiva y antioxidante.

Gran parte de estas propiedades biológicas, incluyendo la actividad antioxidante se debe a que las xantonas presentan en su mayoría grupos funcionales de tipo fenólico en un anillo tricíclico que favorece la estabilización de radicales por resonancia. ⁽⁴⁸⁾

En estudios fitoquímicos se ha observado que el género *Calophyllum* posee un alto contenido en xantonas, flavonoides, biflavonoides, neoflavonoides, terpenos, triterpenos, esteroides y cumarinas. En la madera del árbol tropical *Calophyllum brasiliense* perteneciente a la familia

Clusiaceae, se han aislado diversas xantonas preniladas. (26, 27, 28) En este trabajo se estudiará la actividad antioxidante de dos de ellas: 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (Xantona 1) y 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (xantona 2) (Fig. 3.23).

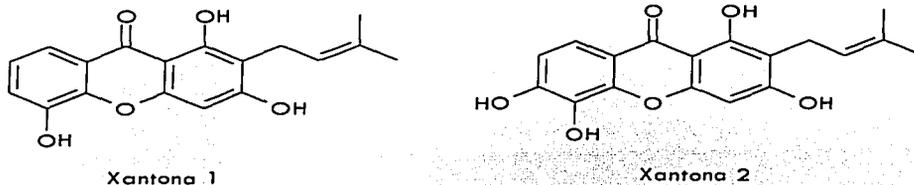


Figura 3.23 Estructuras de 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (Xantona 1) y 1,3,5,6-tetrahidroxi-(3,3-dimetilalil)-xantona (xantona 2).

3.2.3.2 Iridoides

Los iridoides son compuestos naturales que se encuentran presentes en gran variedad de plantas. Son compuestos derivados de monoterpenos que constan de un esqueleto básico de ciclo-pentapirano. Se les llama iridoides por los primeros tres compuestos aislados de hormigas australianas del género *Iridomyrmex spp.* que fueron reportados con esta estructura de ciclo-pirano: iridoideal, iridolactona e iridomercina.⁽²⁵⁾

Los iridoides son sintetizados por angiospermas dicotiledóneas, se encuentran en más de setenta familias *Labiatae*, *Plantaginaceae*, *Scrophulariaceae* y *Valerianaceae* son algunas de ellas. (29) Se pueden dividir en cuatro grandes grupos: 1. iridoides glicosidados, 2. no glicosidados o alquicones, 3. acetaléster iridoides y 4. secoiridoides. Generalmente en plantas se encuentran como iridoides glicosidados o alquicones (Fig. 3.24).

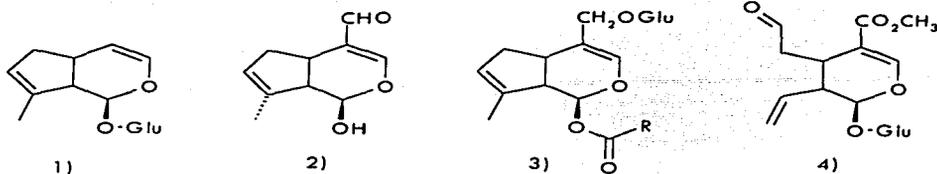


Figura 3.24 Estructuras de Iridoides 1) glicosilados, 2) no glicosilados o aglucones, 3) acetaléster y 4) secoiridoides.

En medicina tradicional los iridoides se han empleado ampliamente como tónicos sedantes, antiinflamatorios, contra la fiebre, tos, remedios para heridas, desórdenes epidérmicos y estomacales. En diversas investigaciones los iridoides han demostrado que poseen una amplia actividad farmacológica. Se les atribuyen propiedades como: actividad cardiovascular, antihepatotóxica, hipoglucémica, hipolipidémica, antiinflamatoria, antiespasmódica, antitumoral, antioxidante y antiviral. (30,37,25) Algunos trabajos de investigación reportan iridoides aislados de diferentes plantas que poseen actividad antioxidante, tal es el caso de cuatro iridoides (blumeósidos) aislados de *Fagraea blumei*, picrósido I y kulkósido aislados de *Picirrhiza kurroa*, geniposido y oleuropeína son los principales compuestos antioxidantes de *Gardenia jasminoides* y *Olea europaea* respectivamente. Esta actividad se les atribuye por los sustituyentes hidroxilo unidos a anillos que facilitan estructuras resonantes al momento de donar un átomo de hidrógeno o captar radicales libres. (44)

En este trabajo se evaluará la actividad antioxidante de tres iridoides: catalpol (1), catalpol acetilado (2) y boshnalósido (3) (Fig. 3.25).

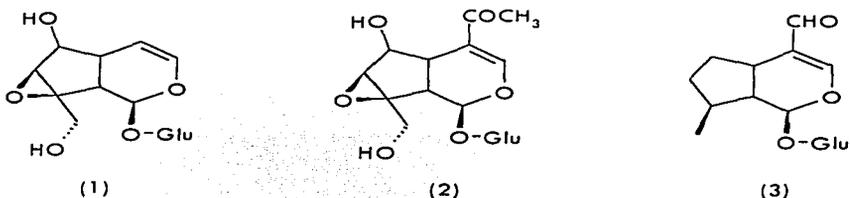


Figura 3.20 Estructuras de tres iridoides: catalpol (1), catalpol acetilado (2) y boshnalósido (3).

3.2.3.3 Ésteres de ácidos *p*-hidroxicinámicos

Las plantas superiores acumulan gran cantidad de compuestos fenólicos, que en su mayoría son derivados del ácido cinámico, el cual es sintetizado a partir de la fenilalanina. La mayoría de estos derivados poseen estructuras C_6-C_3 , y son llamados fenilpropanoides. Estos compuestos son metabolitos intermediarios en la biosíntesis de lignina y su concentración varía considerablemente dependiendo de muchos factores internos y externos como la edad de la planta, características del tejido, época del año, etc. Los derivados hidroxilados del ácido cinámico, ácidos hidroxicinámicos, más comunes son el ácido *p*-cumárico, caféico, ferúlico, 5-hidroxiferúlico y sinápico (en 3.2.3 se explica con mayor detalle); generalmente se encuentran en las plantas formando ésteres (Fig. 3.26) con otros ácidos fenólicos o con glucosa. ^(25,37)

Al igual que los ácidos, los ésteres *p*-hidroxicinámicos presentan actividad antioxidante influenciada por el número y cantidad de sustituyentes hidroxilo presentes en el anillo aromático, además el grupo carbonilo favorece el fenómeno de resonancia cuando algún OH done un átomo de hidrógeno favoreciendo las reacciones de reducción. Se tiene evidencia de que algunos ésteres hidroxicinámicos como el cafeato e hidrocafeato de propilo, ferulato de propilo y propil isoferulato poseen importante actividad antioxidante. ⁽⁴⁵⁾

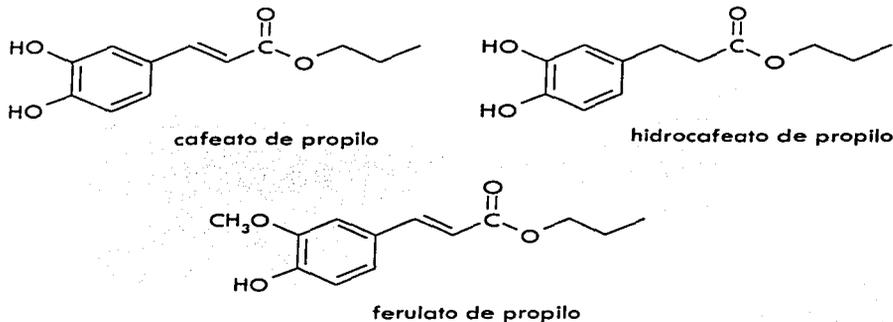


Figura 3.26 Ejemplos de algunos ésteres hidroxicinámicos.

El galato de propilo es un aditivo antioxidante muy potente, ampliamente utilizado en alimentos y a pesar de no ser un éster hidroxicinámico posee una estructura muy similar al cafeato de propilo. Se han realizado experimentos comparando la capacidad antioxidante entre ambos, resultando más potente el galato en un 15%.⁽⁴⁵⁾ La diferencia es que el galato es un ácido benzoico con tres hidroxilos y es aquí en donde probablemente se presenta la diferencia en actividades. La razón por la que se torna interesante el estudio de ésteres hidroxicinámicos es que pueden ser mucho más solubles en medios polares que el galato.

En este trabajo se evaluará la capacidad antioxidante del cafeato de bornilo, que es otro ejemplo de un ácido hidroxicinámico esterificado con un grupo bornilo y con sustituyentes OH en posiciones 4 y 5 del anillo aromático (Fig. 3.27). Mediante el estudio se determinará si estos cambios en su estructura aumentan o disminuyen la capacidad antioxidante.

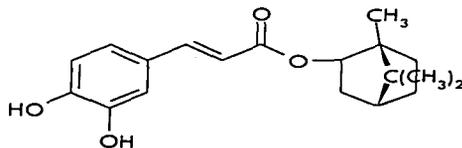


Figura 3.27 Estructura del cafeato de bornilo.

Si bien es cierto que el uso de antioxidantes naturales tiene muchas ventajas ya que permite una mayor aceptación del consumidor y que no requieren tantas pruebas de seguridad si el antioxidante es componente de un alimento GRAS, a diferencia de los antioxidantes sintéticos; también existen desventajas como el costo por purificación de los compuestos, ya que si un compuesto no es debidamente purificado puede variar sus propiedades antioxidantes, muchas veces se confunde el término natural con seguro y en ocasiones pueden impartir olores o sabores que alteren las características organolépticas del producto. Se han realizado diversos estudios que indican que el consumo en exceso de algunos de los compuestos descritos anteriormente pueden comportarse como pro-oxidantes y tener efectos tóxicos en el organismo.^(23,24,25)

Dadas las diferentes características estructurales y químicas de cada compuesto, es necesario para evaluar su actividad antioxidante, saber que métodos son los más adecuados y que proporcionen la información química que esté directamente relacionado con el deterioro oxidativo y la capacidad antioxidante o secuestrante del compuesto, a continuación se explican algunos de los métodos más utilizados para evaluar actividad antioxidante.

3.2.4 Métodos de evaluación de la actividad antioxidante

Se han desarrollado una gran cantidad de métodos para determinar la actividad antioxidante, de compuestos tanto naturales como sintéticos, que consisten en la inhibición de ciertas reacciones. Estos métodos pueden ser clasificados de acuerdo a la estrategia de detección y de cuantificación.

Los métodos más comúnmente utilizados se basan en la generación de diferentes radicales libres cromóforos que son eliminados por la presencia de un antioxidante mediante reacciones fácilmente monitoreadas por técnicas fotométricas. ⁽¹⁸⁾



Los radicales se emplean como factores de cuantificación ante la presencia de antioxidantes. La reacción entre el radical y el antioxidante provoca una disminución en la señal que puede relacionar la concentración del antioxidante y el avance de la reacción de reducción.

Los radicales que suelen utilizarse deben cumplir con características muy importantes para los ensayos: alta estabilidad, solubilidad en el mismo medio donde es soluble el antioxidante, absorción en UV-visible.

Estos métodos pueden ser cualitativas o cuantitativas, la variación radica en la técnica que se emplea para la medición. Las más comúnmente utilizadas son: espectroscopía, espectrofluorometría, cromatografía de gases y HPLC. La efectividad de un antioxidante también puede ser valorada mediante el monitoreo de la estabilidad a la oxidación del alimento, utilizando métodos químicos, instrumentales o sensoriales que permitan obtener una medida de la

extensión del periodo de inducción por la adición del antioxidante. A pesar de que casi todos los métodos tienen fundamentos similares, es necesario conocer las características de cada uno de ellos, ya que dependiendo del tipo de antioxidante que se evalúe será el método a utilizar.⁽³⁸⁾

A continuación se describen algunos de los métodos más utilizados actualmente en investigación para determinar capacidad secuestrante y antioxidante, entre estos se expondrá con mayor detalle los métodos de Radical DPPH, ABTS enzimático y blanqueo con β -caroteno/ácido linoléico que fueron utilizados en este trabajo.

3.2.4.1 Método FRAP

El método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) mide directamente la capacidad de las sustancias antioxidantes para reducir el complejo de hierro y tripiridiltriiazina a pH bajo. El color azul resultante de la reacción redox es medido espectrofotométricamente a 593 nm. La capacidad reductora de los antioxidantes se relaciona directamente con el decremento en el color. La principal desventaja de este método es que como no incluye un sustrato oxidable, existe poca evidencia del efecto protector de los antioxidantes.⁽⁴⁹⁾

3.2.4.2 Método TRAP

El método TRAP (Total Radical-Trapping Parameter) fue desarrollado para determinar la capacidad antioxidante total en plasma. Este ensayo utiliza clorhidrato de 2'2-azobis(2-aminopropano) que genera radicales peroxi de material oxidable presente en plasma. La oxidación es monitoreada determinando el periodo de inducción por absorción de oxígeno. Generalmente se utiliza Trolox como estándar por ser un antioxidante soluble en agua. La desventaja de utilizar un compuesto azo soluble en agua como generador de radicales para determinar capacidad antioxidante en plasma es que no provee información sobre la actividad protectora de quelantes como uratos y de antioxidantes lipofílicos como vitamina E. Este método fue modificado posteriormente utilizando técnicas de luminiscencia, pero no se obtuvo una mejora en los resultados.⁽⁴⁹⁾

tiempo determinado midiendo la pérdida de color por medio de la absorbancia de la mezcla a 517nm.⁽¹³⁾ Algunas desventajas de este método son que el DPPH únicamente puede ser disuelto en medios orgánicos, especialmente en medios alcohólicos, no acuosos, lo que representa una limitación importante del método cuando se miden actividades de antioxidantes de naturaleza hidrofílica, además presenta poca correlación con resultados de otros métodos.^(14,15,38)

3.2.4.5 Método Radical ABTS

Este método es similar al ensayo de DPPH, ya que el fundamento es el mismo; una reacción entre el radical ABTS[•] y el antioxidante que es el donador de electrones.

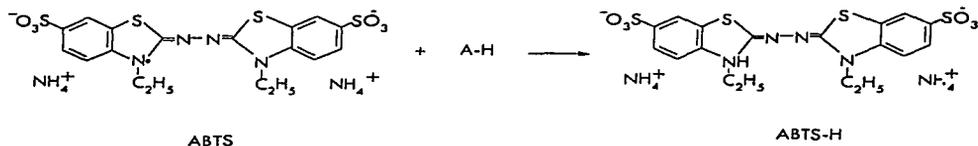


Figura 3.29 Reacción de reducción del radical ABTS[•] por un agente secuestrante.

La única diferencia es que, antes de reaccionar con el antioxidante, el radical ABTS[•] debe ser generado por oxidación del ABTS (ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)). Esta reacción de oxidación puede ser generada químicamente utilizando agentes oxidantes como persulfato de potasio o dióxido de manganeso o enzimáticamente empleando enzimas como mioglobina o peroxidasa tipo II (HRP). La reacción entre el persulfato de potasio y el ABTS tiene una estequiometría de 1:0.5, lo que provoca una oxidación incompleta del ABTS para formar el radical ABTS[•], esta reacción dura 24 horas.⁽¹⁶⁾ En la reacción enzimática, el sistema peroxidasa/peróxido de hidrógeno/ABTS genera el radical, obteniendo dos moles de radical a partir de una mol de peróxido de hidrógeno, esta reacción dura algunos segundos. El radical formado en ambos casos es muy estable en un intervalo de temperatura de 5-35°C y pH de 3.0-6.5, es soluble en agua y en medios orgánicos y debe tener una absorbancia entre 0.8 y 1.2. El método enzimático es preferido para la determinación de actividad, ya que es mucho más

rápido, hay menos interferencias y se utiliza una menor cantidad de muestra, sin embargo en el método químico se utilizan reactivos de menor costo y se logra una mayor reproducibilidad en las mediciones.^(14,17) Se puede utilizar también una variación en el método enzimático para determinar la actividad lipofílica o hidrofílica de los compuestos antioxidantes. ⁽³⁹⁾

En este método únicamente se realizan pruebas cuantitativas, en donde, al igual que el ensayo de DPPH, se monitorea la disminución de la absorbancia a 730nm por el cambio de color verde (ABTS forma oxidada) a amarillo (ABTS forma reducida), que corresponde a la reacción del radical y el antioxidante. La prueba cualitativa en cromatografía de capa fina no es muy empleada, ya que en el revelado de los compuestos antioxidantes, no siempre se aprecia la misma coloración ni homogeneidad de las manchas, y al contacto con el aire, el ABTS se descompone fácilmente.^(13,18,19,20,38)

3.2.4.6 Método Blanqueo de β -caroteno/ácido linoléico

En esta prueba se utiliza el β -caroteno como indicador de la capacidad antioxidante. Se prepara una emulsión de β -caroteno y ácido linoléico, en donde se forman radicales libres por oxidación del ácido linoléico que atacan al β -caroteno y provocan una disminución en el color amarillo característico de este compuesto. El antioxidante se pone en contacto con esta emulsión y se monitorea la pérdida del color midiendo la absorbancia de la solución a 470nm. Un antioxidante eficaz evitara una disminución mayor en la absorbancia.

El blanqueo de β -caroteno/ácido linoléico es ampliamente utilizado debido a su sensibilidad, bajo costo de los reactivos y poco tratamiento que requiere la muestra. Algunas de las desventajas que presenta el método son: la preparación de la emulsión debe darse bajo las mismas condiciones en cada ensayo, ya que puede afectar la reproducibilidad de los resultados; al utilizar un lípido emulsificado existen un gran número de variables que interfieren en la oxidación que son difícilmente controlables; el efecto interfacial que se presenta afecta el comportamiento del antioxidante y el tiempo que requiere el ensayo es mucho mayor que el tiempo que toman otras pruebas.⁽¹⁵⁾

Este método se emplea frecuentemente para determinar actividad antioxidante únicamente en compuestos poco polares, ya que los antioxidantes polares presentan mucho menor o actividad nula, lo que en comparación con otras pruebas de actividad antioxidante resulta ser equivocado. Este fenómeno se debe a que los compuestos poco polares se concentran en la superficie lipídica lo que permite una mayor protección a la oxidación, y por el contrario los compuestos polares permanecen en la fase acuosa dificultándoseles el contacto con los radicales libres del ácido linoléico. ⁽²¹⁾

En todos estos métodos se pueden evaluar extractos de plantas o alimentos, o compuestos puros, pero los resultados que se obtienen carecen de una correlación directa con el aporte antioxidante real de las propiedades protectoras de un sistema lipídico. Además un factor de variación importante de estos ensayos es que las muestras coloridas pueden interferir en la medición dando valores mayores en la absorbancia, por ejemplo al medir actividad antioxidante de vinos o extractos de frutas. ⁽¹⁵⁾

Como se puede observar, cada método tiene características especiales que lo hacen apropiado o no para evaluar un compuesto en especial y la información que proporciona cada uno puede complementarse obteniendo así información más concisa y global de la actividad de un compuesto antioxidante. ⁽¹⁸⁾

3.3 Estabilidad del Aceite de Cacahuete

El cacahuete (*Arachis hypogaea*) es una semilla oleaginosa considerada un alimento de alto valor nutritivo por su contenido en lípidos, proteínas, carbohidratos, fibra y vitaminas.

El cacahuete es un alimento muy consumido en México y el mundo. Se cultivan cerca de 22.3 millones de hectáreas de cacahuete en el mundo con un rendimiento de 29.2 toneladas de vainas. En México se cultiva en 16 estados, destacando por su superficie sembrada y cantidad de semilla recolectada: Puebla, Oaxaca, Sinaloa, Chihuahua, Chiapas, Guerrero, Morelos, S.L.P. y Nayarit.

Uno de los mayores problemas que enfrentan los productores y los fabricantes de alimentos que utilizan cacahuete es la rancidez que desarrolla durante su almacenamiento y proceso. Esta susceptibilidad a la rancidez se debe a que se trata de un alimento con un alto contenido de aceite (44-56% p/p) y con una cantidad apreciable de ácidos grasos poliinsaturados (>25% en la variedad Virginia). Aunado a esto, el proceso de tostado a que generalmente es sometido y el tipo de almacenamiento, la concentración de oxígeno y la humedad del medio contribuyen también a la oxidación del aceite de cacahuete. ⁽⁴⁰⁾

Actualmente existen diferentes alternativas para reducir el deterioro por oxidación en cacahuete como son atmósferas modificadas, empaque al vacío, adición de antioxidantes o control de humedad. Se han realizado gran cantidad de estudios modificando estas variables para controlar la oxidación y se ha encontrado que una de las más eficaces y económicas es la adición de antioxidantes. En la industria se utilizan generalmente TBHQ y BHA a concentración de 200 ppm que es el límite que marcan las normas oficiales y el Codex Alimentarius. ^(41,42,43)

En este trabajo se utiliza al cacahuete como una medida de evaluación de la capacidad antioxidante de los seis compuestos que se están probando, según los resultados que se obtengan y después de realizar pruebas de toxicidad se podrá sugerir a alguno de los compuestos como una posible alternativa de aditivo para cacahuete tostado.

4. OBJETIVOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Objetivo general

Identificar de un grupo de productos naturales, los compuestos con mayor actividad antioxidante y evaluar su comportamiento en un sistema alimenticio, como alternativa para su uso como aditivos.

Objetivos particulares

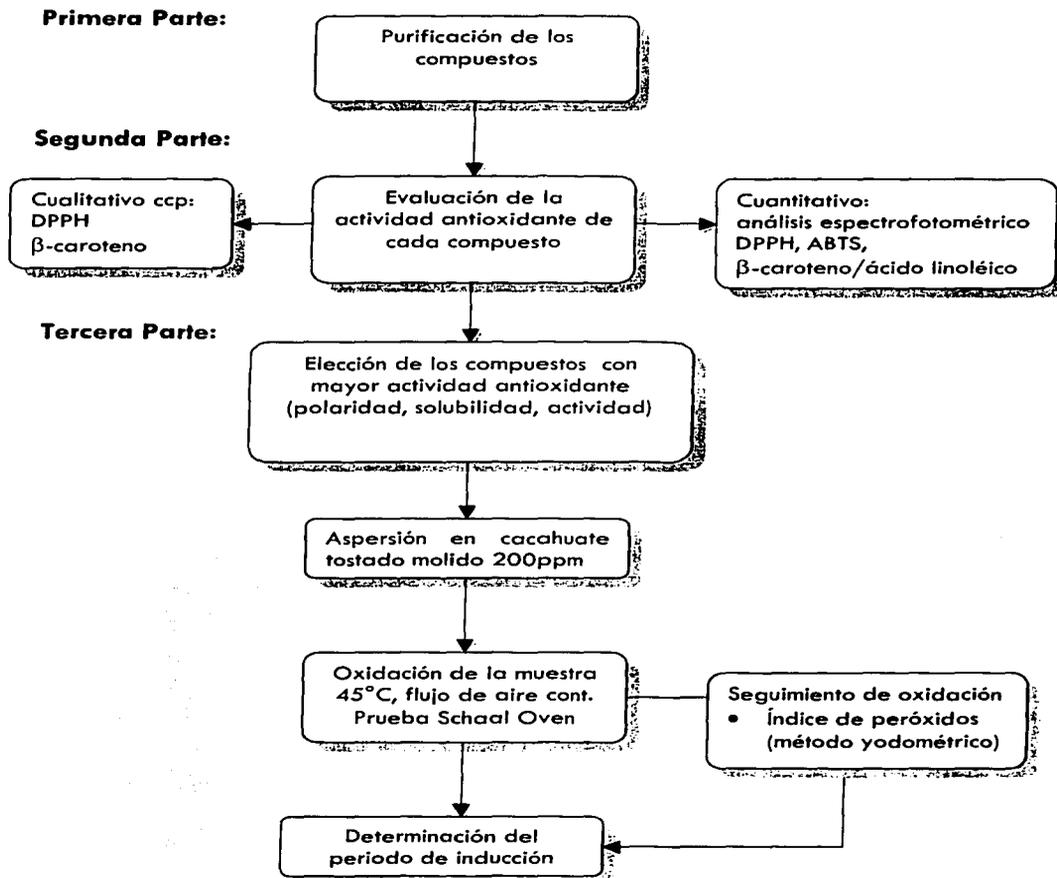
- Obtención de una fracción rica en xantonas a partir de la planta *Callophyllum brasiliensis*.
- Determinar la capacidad antioxidante de cada compuesto cualitativa y cuantitativamente, empleando las técnicas radical DPPH, radical ABTS método enzimático y blanqueo de β -caroteno/ácido linoléico.
- Comparar la información obtenida de cada uno de los ensayos y determinar, según las características de polaridad y solubilidad de los compuestos con mayor actividad, el método de incorporación y el sistema en el cual serán evaluados.
- Monitorear la oxidación de la grasa del alimento en presencia de los compuestos antioxidantes a diferentes concentraciones y determinar la modificación en el periodo de inducción por cada uno.
- Evaluar la posible actividad sinérgica usando mezclas del compuesto y antioxidantes comerciales.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.1 Diagrama General de Trabajo

Considerando los objetivos planteados, la estrategia a seguir en este trabajo se dividió en tres partes.



5.2 Primera Parte: Purificación de los compuestos

En esta primera parte se realizó la purificación e identificación de las dos xantonas mediante técnicas de separación como cromatografía en capa fina y en columna, espectroscopía IR, masas y RMN. El resto de los compuestos fueron aislados y purificados con anterioridad y proporcionados para este experimento. Todos los compuestos se obtuvieron de diferentes plantas mexicanas, el proceso de aislamiento purificación e identificación de cada uno se describe a detalle en otras publicaciones (Tabla 5.1).

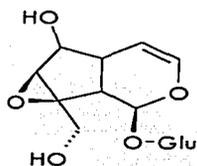
Compuesto	Fuente	Parte	Lugar	Referencia
Xantonas				
Xantona 1 (X1)	<i>Callophyllum barsiliensis</i>	Tronco	Chiapas	Reyes Chilpa ⁽²⁷⁾
Xantona 2 (X2)	<i>Callophyllum barsiliensis</i>	Tronco	Chiapas	Reyes Chilpa ⁽²⁷⁾
Iridoides				
Catalpol (CP)	<i>Pestemon barbatus</i>	Hojas	Edo. Mex.	Lira Rocha ⁽⁵⁰⁾
Catalpol acetilado (CP-A)	<i>Pestemon barbatus</i> /acetilación	Hojas	Edo. Mex.	Lira Rocha ⁽⁵⁰⁾
Boshnalósido (BHS)	<i>Pestemon roseus</i>	Hojas	Edo. Mex.	Navarro O ⁽⁵²⁾
Éster hidroxicinámico				
Cafeato de Bornilo (CB)	<i>Coreopsis mutica</i>	Hojas	Hidalgo	Maldonado, E. (51)

Tabla 5.1 Fuentes de obtención de los seis compuestos de estudio y referencias de estudios previos.

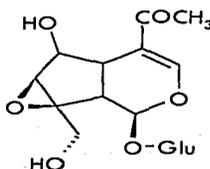
Para la obtención de las xantonas o fracciones ricas en estas, se realizó el fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto acetona/metanol 2:1 de la madera de *C. barsiliensis*. Se tomaron 20g del extracto, se preabsorbieron en celita y se colocaron en una columna de vidrio (3 x 20 cm) preempacada con 100g de sílica gel (Kresagel). Se colectaron 64 fracciones de 1.50 ml utilizando un gradiente de éter de petróleo-acetato de etilo como fase móvil. De las fracciones 4 y 5 se obtuvo un precipitado amarillo con cristales pequeños de forma cuadrangular, estas fracciones se juntaron y se recrystalizaron con hexano/acetona, formando cristales opacos de color amarillo, este compuesto se tiene reportado como 6-desoxijacareubina. ^(26,27) A la fracción 6 se le realizó una cromatografía en capa fina y se observó un compuesto puro, que fue

confirmado por espectroscopía de masas como 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3-metilalil)-xantona (X1). De las fracciones 7 a 9 se obtuvieron 2.9257g de cristales amarillos opacos en forma de aguja, estos fueron preabsorbidos en celita y empacados en otra columna de vidrio (3 x15) con 45.6g de sílica gel. Se obtuvieron 80 fracciones de 20 ml con fase móvil éter de petróleo-acetato de etilo. Las fracciones 61 a 73 se purificaron por recristalización acetato de etilo-hexano, esta fracción fue identificada como 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-metilalil)-xantona (X2).

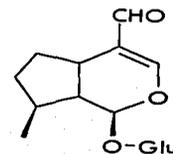
Los iridoideos catalpol y catalpol acetilado fueron aislados de un extracto metanólico de las hojas de la planta *Penstemon barbatus*. Mediante cromatografías en columna se aisló un sólido que precipitó con acetona y se obtuvo en mayor cantidad al ser acetilado con anhídrido acético y piridina. Fue identificado por RMN H^1 y C^{13} como catalpol (CP) y su derivado catalpol acetilado (CP-A). El iridoide boshnalósido (BHS) se obtuvo a partir de las partes aéreas de la planta *Penstemon roseus* mediante extracciones con metanol y agua, una extracción con acetona-metanol 5% y por último una cromatografía en columna del extracto de donde se obtuvo el compuesto puro.^(50, 52)



CP
p.f. 135-135



CP-A
p.f. 72-73



BHS
p.f. 102-103

Figura 6.2 Estructuras y puntos de fusión de los iridoideos aislados de *Penstemon barbatus* y *Penstemon roseus*, catalpol (CP), catalpol acetilado (CP-A) y boshnalósido (BHS).

De la planta *Creopsis mutica*, colectada en el estado de Hidalgo, fue aislado un fenilpropanoide a partir del extracto con acetato de metilo de las hojas de la planta. Fue identificado mediante RMN ^1H y ^{13}C como cafeato de bornilo. ⁽⁵¹⁾

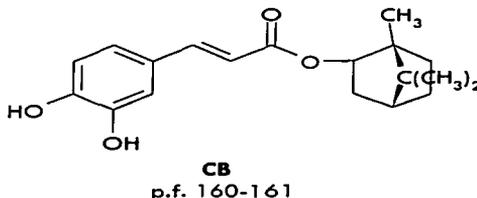


Figura 6.3 Estructura y punto de fusión del éster hidroxicinámico cafeato de bornilo (CB).

5.3 Segunda Parte: Evaluación de la Actividad Secuestrante y Antioxidante

En esta segunda parte se tiene como objetivo determinar la capacidad secuestrante y antioxidante de cada uno de los seis compuestos a diferentes concentraciones y de cuatro estándares: BHA, TBHQ, ácido ascórbico (AA) y Trolox (TX), para esto se realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas de actividad, utilizando tres métodos: radical DPPH, radical ABTS enzimático y blanqueo de β -caroteno/ácido linoléico.

5.3.1 Determinación Cualitativa de Actividad

La determinación cualitativa se realizó mediante cromatografía en capa fina de sílica gel con indicador de fluorescencia con mezclas de eluyente AcOet/MeOH, en donde una vez eluidos los compuestos y los estándares se aplicaron las siguientes pruebas:

a). Radical DPPH: en esta prueba se asperjan las cromatoplasmas con una solución de DPPH al 0.2% en metanol, al cabo de unos minutos la prueba positiva se puede apreciar por la decoloración de púrpura a amarillo en el área donde se encuentra el compuesto.

b). β -caroteno/ácido linoléico: las cromatoplasmas son asperjadas con una solución de β -caroteno/ácido linoléico/cloroformo y expuestas a luz UV durante tres horas, hasta que desaparezca el color anaranjado en el fondo de la cromatoplasma, la aparición de una mancha amarilla en donde se encuentra el compuesto indica prueba positiva.

5.3.2 Determinación Cuantitativa de Actividad

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo mediante tres métodos espectrofotométricos: para determinar actividad secuestrante método de radical DPPH y de radical ABTS, para evaluar actividad antioxidante blanqueo con β -caroteno/ácido linoléico.

- Método del Radical DPPH

Los seis compuestos y los estándares a cuatro concentraciones (50, 100, 150 y 200ppm) se pusieron a reaccionar con una solución de DPPH 3×10^{-5} M en dimetilsulfóxido en series de cuatro tubos: la reacción, dos controles y un blanco (tabla 4.2), cada uno por triplicado. Estos tubos se burbujearon con N_2 para desplazar el oxígeno disuelto y se dejaron reaccionar durante 30 min.

Reactivo	Tubo 1 Ai	Tubo 2 Aj	Tubo 3 Ac	Tubo 4 Blanco
Extracto 50,100,150,200 ppm	1 ml	1 ml	--	--
DMSO	--	1 ml	1 ml	2 ml
DPPH 3×10^{-5} M en DMSO	1 ml	--	1 ml	--

Tabla 4.1. Prueba cualitativa de actividad secuestrante radical DPPH

Se midió el decremento en la absorbancia de la solución de DPPH a 517nm por la reducción del radical. De los valores de absorbancia se determinó el porcentaje de actividad secuestrante de cada compuesto mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de actividad} = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100$$

donde:

A_i = absorbancia del tubo con extracto + DPPH

A_j = absorbancia del tubo con extracto + DMSO

A_c = absorbancia del tubo con DPPH + DMSO

- Método enzimático del radical ABTS

Mediante este método se evaluó la actividad secuestrante de los compuestos polares: X2, CP, BHS y CB a concentraciones de 50, 100, 150 y 200ppm. Esta prueba se divide en dos partes, la primera es la generación del radical en donde se mezclaron 0.5ml de ABTS en agua destilada + 0.5 ml de H_2O_2 0.5mM + 0.5 ml de enzima HRP tipo IV 0.25 μ M en buffer de fosfatos 50mM pH = 7.5. La formación del radical se observa leyendo el aumento en la absorbancia a 730nm durante 3 minutos o hasta estabilizarse las lecturas. En la segunda parte, una vez estabilizada la absorbancia, 3 min. después aproximadamente, se agregó 0.1ml del compuesto en la celda y se registró cada minuto el decremento en la absorbancia por la reducción del ABTS durante 10 minutos. Se corre un control agregando 0.1ml de metanol para registrar el decremento en la absorbancia por efecto la dilución y degradación del radical ABTS. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Se reporta la media de las determinaciones como porcentaje de disminución de absorbancia.

$$\% \text{ de disminución de la Absorbancia} = (\text{Abs final} / \text{Abs inicial}) \times 100$$

- Blanqueo con β -caroteno/ácido linoléico

En esta prueba se preparó una emulsión con 1.0 ml solución de β -caroteno (2mg/10ml cloroformo) + 20mg de ácido linoléico + 200mg de Tween 80, posteriormente se eliminó el cloroformo en rotavapor a 40°C y se añadieron 50 ml de agua destilada aireada. De esta emulsión se hizo reaccionar 5.0 ml con 0.2 ml del compuesto tomando inmediatamente lectura de absorbancia a 470nm (t_0), después se incubó a baño maría a 50°C durante 120 min. y se volvió a leer la absorbancia (t_f). El control se preparó con 0.2 ml de metanol o etanol (según el disolvente en el que se encontrara disuelto el compuesto) con 5.0 ml de emulsión de β -caroteno, el blanco contenía 0.2 ml de metanol y 5.0 ml de agua destilada. Se evaluaron los compuestos y los estándares a 50, 100, 150 y 200 ppm y por triplicado cada uno. El coeficiente de actividad antioxidante (CAA) se determina mediante la siguiente ecuación:

$$CAA = \left[(\text{Abs. muestra } t_f - \text{Abs control } t_f) / (\text{Abs control } t_0 - \text{Abs control } t_f) \right] \times 100$$

5.4 Tercera parte: Determinación del periodo de inducción

En esta parte del experimento se elegirán los compuestos más activos de acuerdo con los resultados obtenidos de la medición de actividad secuestrante y antioxidante en las pruebas cualitativas y cuantitativas y a sus características de polaridad y resistencia a la temperatura. De esta forma se evaluará la capacidad antioxidante de los compuestos elegidos mediante el monitoreo de la oxidación de los lípidos de un sistema alimenticio de origen graso.

El seguimiento de la oxidación se llevó a cabo midiendo índice de peróxidos cada tercer día durante los primeros 10 días y diariamente a partir de día 11.

- Índice de peróxidos

Extracción de grasa: de cada charola se pesan 25g y se adicionan 50ml de éter etílico. Dejar en agitación durante 3 horas. Separar las fases y evaporar el éter en rotavapor a 39°C max.

Determinación de peróxidos: pesar 5.0 + 0.1g de aceite y disolver en 30 ml de la mezcla ácido acético/diclorometano 3:2, agitar. Añadir 0.5 ml de una solución de KI saturada y dejar reposar 1 min. en la oscuridad. Agregar 30 ml de agua desionizada hervida y fría y 0.5 ml de una solución de almidón. Titular con tiosulfato de sodio 0.1N hasta desaparición de color azul-verde. La cantidad de peróxidos se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$\text{meq peróxido/kg grasa} = [(\text{ml gastados} - \text{ml blanco}) \times N \times 100] / \text{g muestra}$$

6. RESULTADOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Según la metodología planteada, los resultados se obtuvieron en tres partes. En la primera se realizó el aislamiento y purificación de los seis compuestos a partir de diversos extractos de plantas. En la segunda y tercera parte, se realizó la evaluación de la actividad secuestrante y antioxidante de los compuestos, primero mediante pruebas cualitativas y cuantitativas de actividad y después midiendo la resistencia a la oxidación de muestras de cacahuete molido con los compuestos previamente adicionados. A continuación se muestra los resultados obtenidos en cada etapa.

6.1 Primera Parte: Purificación de los compuestos

En esta parte fueron aisladas únicamente las xantonas. El resto de los compuestos fue proporcionado por diferentes fuentes. A continuación se describe el procedimiento de purificación de xantona 1 y xantona 2. Las referencias de la purificación de los otros compuestos se mencionaron en el capítulo de desarrollo experimental.

Las dos xantonas con las que se trabajó, fueron obtenidas mediante separación por cromatografía en columna de un extracto acetona/metanol de la madera de la planta *C. Brasiliensis*. De las primeras 4-6 fracciones eludías se obtuvo un precipitado amarillo, el cual fue recristalizado y analizado por espectroscopia de masas e identificado como 1,3,5-trihidroxi-2(3,3-metilalil)-xantona (X1). De las fracciones 7-9 se realizó otra cromatografía en cromatografía en columna, en donde las fracciones 61-73 se purificaron por recristalización y se identificó esta fracción como 1,3,5,6-tetrahidroxi-2(3,3-metilalil)-xantona (X2).

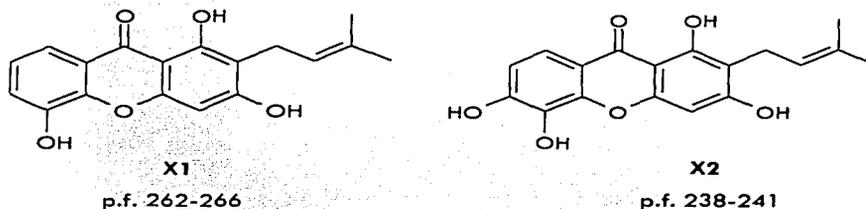


Figura 6.1 Estructuras y puntos de fusión de la 1,3,5-trihidroxi-2(3,3-metilalil)-xantona (X1) y 1,3,5,6-tetrahidroxi-2(3,3-metilalil)-xantona (X2).

6.2 Segunda parte: Evaluación de la Actividad Secuestrante y Antioxidante

Una vez que se tuvieron los compuestos aislados y definidas sus estructuras y propiedades físicas como polaridad y solubilidad, se les realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas de actividad antioxidante y secuestrante.

6.2.1 Determinación Cualitativa de Actividad Antioxidante

- **Método radical DPPH y blanqueo de β -caroteno.**

Se determinó cualitativamente la actividad secuestrante y antioxidante de los seis compuestos xantona 1 (X1), xantona 2 (X2), catalpol (CP), catalpol acetilado (CP-A), boschnalósido (BHS) y cafeato de bornilo (CB) por el método del DPPH y blanqueo de β -caroteno en cromatografía en capa fina, utilizando como estándares ácido ascórbico (AA), trolox (TX), butilhidroxianisol (BHA) y terbutilhidroxiquinona(TBHQ.).

En el ensayo de DPPH las cromatoplasas fueron eluidas en sistemas Aoet/MeOH 3:7 o 1:1 y reveladas con solución metanólica de DPPH, después de 10 minutos se observó en algunas de ellas la aparición de manchas amarillas indicando la reducción del radical por presencia de un agente secuestrante (figura 6.4). En el caso de CP se observó un ligero cambio casi imperceptible, que se consideró como prueba positiva. CP-A no mostró cambio alguno.

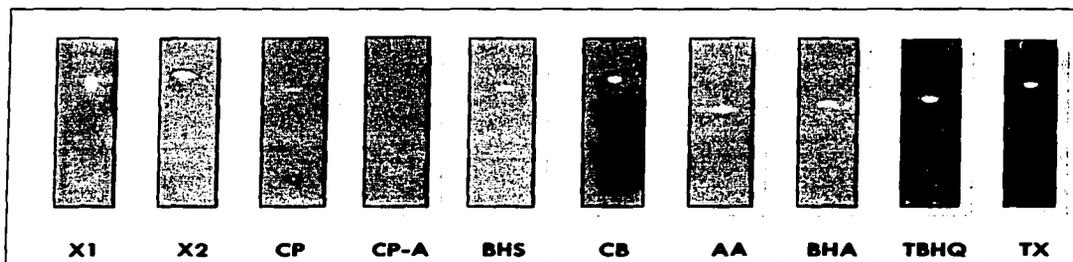


Figura 6.4 Cromatoplasas de reveladas con DPPH. Prueba cualitativa de actividad secuestrante.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las cromatoplasmas reveladas con β -caroteno/ácido linoléico presentaron el mismo comportamiento, la mayoría de los compuestos dieron pruebas positivas mostrando la permanencia del color amarillo del β -caroteno en el área donde se encontraba el compuesto y la decoloración en el resto de la placa (figura 6.5). CP presentó muy poca actividad antioxidante y CP-A resultó negativo.

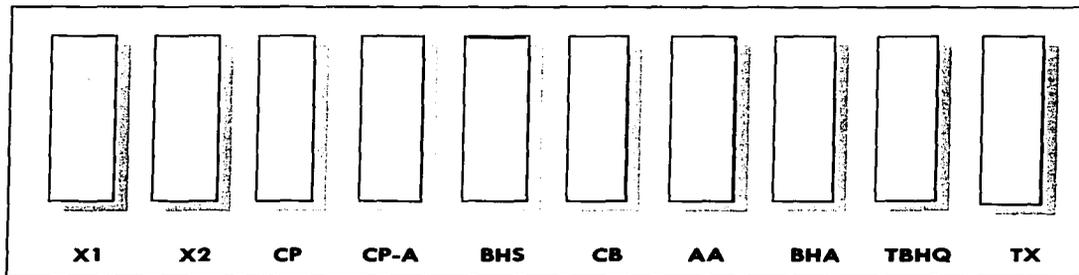


Figura 6.5 Cromatoplasmas de reveladas con β -caroteno. Prueba cualitativa de actividad antioxidante.

A pesar de la gran diferencia que mostraron CP y CP-A ante los demás compuestos y los estándares, se les consideró para la determinación cuantitativa de actividad, ya que muchos factores interfieren en determinaciones cualitativas de este tipo, como el hecho de que tanto el β -caroteno como el DPPH son muy susceptibles a la temperatura, luz y aire; por lo que puede ser un factor de gran variación en la prueba.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

6.2.2 Determinación Cuantitativa de Actividad Antioxidante

Cada uno de los seis compuestos y los estándares fue evaluado cuantitativamente mediante tres métodos: radical DPPH, radical ABTS enzimático y blanqueo de β -caroteno/ácido linoléico, de esta forma se logró determinar la actividad secuestrante y antioxidante de cada uno. Fue evaluada la actividad a cuatro concentraciones 200, 150, 100 y 50 ppm para determinar la concentración óptima de actividad, partiendo de 200 ppm ya que está especificada en la normativa nacional e internacional como concentración límite para aditivos en alimentos. Cada determinación se realizó por triplicado.

• Método radical DPPH

El radical DPPH en su forma oxidada es de color púrpura, cuando este es reducido por un compuesto secuestrante, cambia a color amarillo. Esta característica permite determinar la capacidad secuestrante del compuesto midiendo el porcentaje de reducción de la solución del radical. Los seis compuestos xantona 1 (X1), xantona 2 (X2), catalpol (CP), catalpol acetilado (CP-A), boshnalósido (BHS) y cafeato de bornilo (CB), y los estándares BHA, TBHQ, Trolox (TX) y ácido ascórbico (AA), se evaluaron mediante este ensayo obteniendo los siguientes resultados del porcentaje de actividad secuestrante de cada uno:

	% de Actividad			
	200 ppm	150 ppm	100 ppm	50 ppm
X1	14.6	23.2	16.4	57.68
X2	67.3	53.5	59.8	59.29
CP	12.6	5.4	22.8	6.31
CP-A	8.0	0.0	-2.1	-2.28
BHS	63.4	23.7	31.9	40.29
CB	56.7	31.7	60.9	66.78
BHA	36.9	40.1	34	27
TBHQ	52.2	50.2	47.3	40.0
TX	93.7	86.2	73.5	73.4
AA	81.9	70.1	68.6	71.3

Tabla 6.1 Media del porcentaje de actividad secuestrante de X1, X2, CP, CP-A, BHS, CB, BHA, TBHQ, TX y AA a 200, 150 100 y 50 ppm. Ensayo de DPPH a 30 min.

Según los datos que se obtuvieron del porcentaje de actividad secuestrante de los compuestos después de 30 minutos de reacción, se observó que a 200 ppm X2, BHS y CB fueron los compuestos que presentaron los valores mas altos de actividad con 67.3, 63.4, 56.7% respectivamente y los estándares más activos fueron TX y AA con valores de 93.7 y 81.9%. Por otra parte, CP y CP-A mostraron pobre actividad secuestrante con valores alrededor del 13.0 y 8.0% para cada caso. A 150 ppm hubo un decremento drástico en la actividad de la mayoría de los compuestos por lo que los valores mas altos de actividad fueron para los estándares, con excepción de X2 que superó la actividad que mostraron BHA y TBHQ. A 100 Y 50 ppm se observó un aumento en la actividad de X2 y CB con valores superiores a los estándares BHA y TBHQ, y por el contrario CP-A disminuyó tanto que mostró valores negativos (Gráfico 6.1). En general X2, BHS , CB, TX y AA superaron a los otros compuestos en las cuatro concentraciones a las que se trabajó. Presentando siempre una tendencia en el poder reductor de TX>AA>X2>CB>BHS>TBHQ>BHA>X1>CP>CP-A.

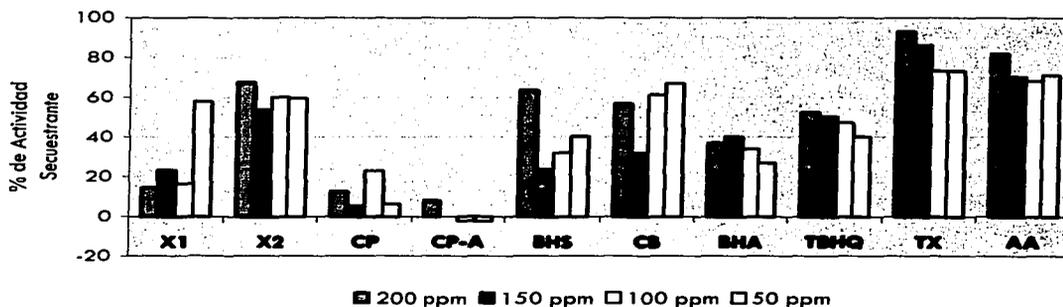


Gráfico 6.1 Porcentaje de actividad secuestrante de Xantona 1 (X1), Xantona 2 (X2), Catalpol (CP), Catalpol acetilado (CP-A), boshnalósido (BHS), cafeato de bornilo (CB), BHA TBHQ, trolox (TX) y ácido ascórbico (AA) por el método de DPPH.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se observaron algunas variaciones en la actividad de X1, BHS, CB, en donde aumentó la actividad cuando disminuyó la concentración, esto puede deberse a que a altas concentraciones estos compuestos estén actuando como prooxidantes o que se esté dando una reacción paralela que evite que actúe todo el compuesto como reductor y así al disminuir la concentración aumente su efectividad como secuestrante.

Es especial el caso de X1, donde se observó un cambio más drástico, ya que a 200, 150 y 100 ppm muestra valores menores a 25% de actividad pero a 50 ppm aumenta hasta casi 60%. Durante el experimento se observó que al poner en contacto la solución de X1 con el radical DPPH ocurría inmediatamente la reducción, que podía apreciarse a simple vista por el cambio de color, pero al paso del tiempo la solución tomaba un color anaranjado que daba lecturas de absorbancia altas y que al momento de calcular el porcentaje de reducción parecía que no había tal. Este fenómeno puede deberse a una reacción de acoplamiento de sales de diazonio, en donde el radical DPPH (sal de diazonio) reacciona por una sustitución electrofílica con el anillo de la xantona, rico en electrones y activado por los sustituyentes OH, dando un compuesto azo, que son compuestos de color amarillo o anaranjados. De esta forma se explica el incremento en la actividad de X1 a 50 ppm, ya que a esta concentración no estaba favorecida la reacción de acoplamiento con el DPPH y entonces sí actuaba como secuestrante. En realidad es probable que en algunas determinaciones de los otros compuestos se haya visto disminuida la actividad por reacciones de este tipo. Otra razón que pudo haber influido en este aumento probablemente se deba a que X1 es un compuesto con alta actividad secuestrante y que a concentraciones altas actúa como prooxidante, siendo así la concentración óptima a 50ppm.

Se observó también en este ensayo que en general los compuestos con polaridades altas presentaron los mayores valores de actividad, esto se puede apreciar comparando los valores entre BHA (36.9%), TBHQ, (52.2%), TX (93.0%) y AA (81.9%), se sabe que BHA y TBHQ no son compuestos muy polares y su poder secuestrante es alto, sin embargo en este ensayo se vio muy disminuido.

- **Método enzimático de radical ABTS**

La evaluación de los compuestos mediante este ensayo permitió confirmar la actividad secuestrante que mostró el ensayo de radical DPPH. Debido a la naturaleza hidrofílica del medio en el que se realiza esta prueba, se analizaron únicamente los compuestos polares: X2, CP, BSH, CB, AA y TX, ya que los compuestos menos polares debían ser disueltos en etanol lo que provocaba que la enzima peroxidasa, utilizada para generar el radical, precipitara y no se llevara a cabo la reacción. A continuación se muestra el promedio del porcentaje de reducción de la absorbancia para cada compuesto:

	% de disminución de la absorbancia			
	200 ppm	150 ppm	100 ppm	50 ppm
X2	98.7	98.6	96.5	48.7
CP	15.2	14.5	15.6	9.8
BHS	79.9	66.0	47.2	22.7
CB	96.4	97.1	80.8	38.3
AA	96.9	96.6	87.1	23.4
TX	99.9	98.8	73.0	38.9

Tabla 6.2 Ensayo de ABTS. Media del porcentaje de reducción de la absorbancia de X2, CP, BHS, CB, BHA, TBHQ, TX y AA a 200, 150 100 y 50 ppm después de 10 minutos de reacción.

Los resultados son similares a los obtenidos en la prueba de DPPH, a 200 ppm (Tabla 6.2) se observó que X2 y CB presentaron un alto poder reductor mostrando una disminución en los valores de absorbancia de casi 100% al igual que los estándares AA y TX. De la misma forma BHS presentó alto poder reductor con valores de 79.9% de reducción, a pesar de que se observó que la reacción ocurrió más lentamente que los otros compuestos ya que la caída en la absorbancia no fue tan marcada (gráfico 6.2). CP nuevamente presentó baja actividad con disminución en la absorbancia no mayor a 15.2%, menor aún que la disminución que mostró el tubo control con ABTS y metanol.

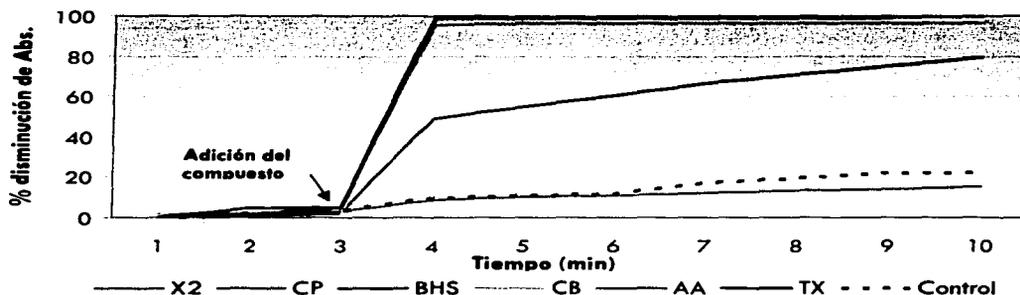


Gráfico 6.2 Ensayo ABTS enzimático 200 ppm.

A concentración de 150 ppm, X2 y CB mantuvieron el mismo comportamiento con valores alrededor de 98% en la disminución de la absorbancia, BHS disminuyó un poco su actividad obteniendo 66%, que a pesar de nos ser un valor bajo se observa en la gráfica que la disminución ocurre lentamente a diferencia de la caída en la absorbancia que se observa en los otros compuestos. CP prácticamente no muestra actividad ya que la pequeña disminución en la absorbancia que presentó probablemente se deba en gran parte a la degradación del radical ABTS, ya que muestra casi el mismo comportamiento que el tubo control.

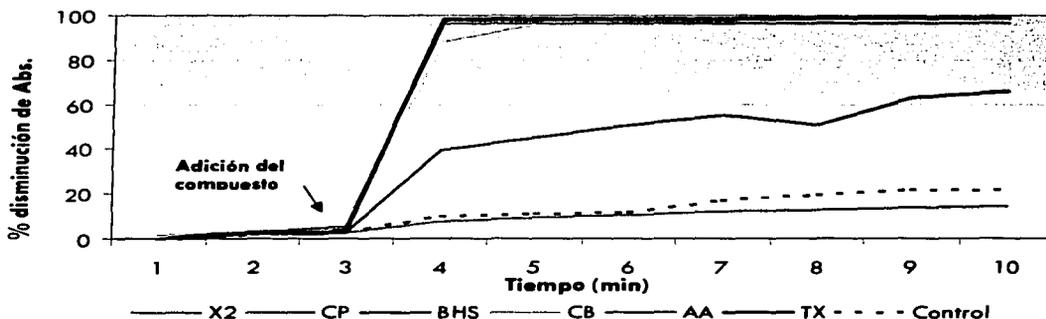


Gráfico 6.3 Ensayo ABTS enzimático 150 ppm.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfico 6.3 Ensayo ABTS enzimático 150ppm.

A 100 ppm X2 no mostró cambio en el poder reductor manteniendo valores de 96%; CB, BHS y TX disminuyeron a 80, 47 y 73% respectivamente y CP continuó sin presentar actividad.

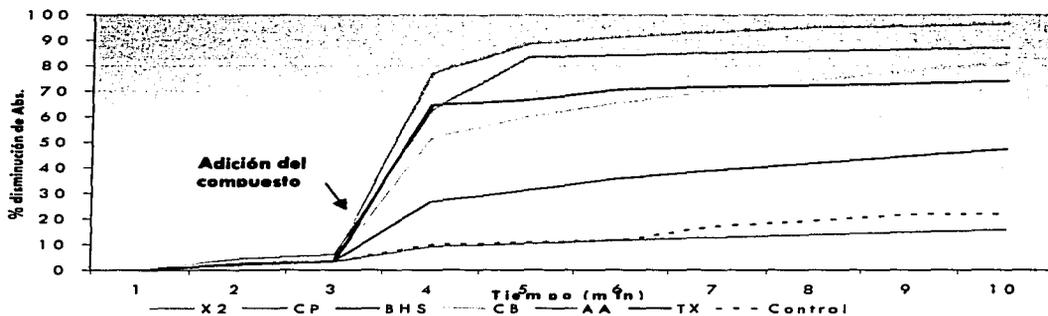


Gráfico 6.4 Ensayo ABTS enzimático 100ppm.

A 50 ppm hubo una disminución en general en el poder reductor de todos los compuestos y estándares aproximadamente a la mitad de la actividad que presentaban a 100 ppm; X2 bajó a 48%, CP a 9%, CB a 36%, AA a 23% y TX a 38%.

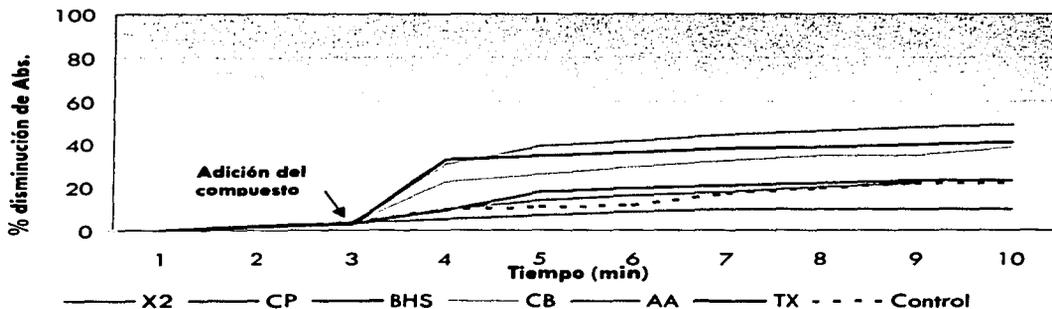


Gráfico 6.5 Ensayo ABTS enzimático 50 ppm

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

En general X2 fue el compuesto que presentó un mayor poder reductor mostrando valores de disminución en la absorbancia muy por encima de los otros compuestos y de la mayoría de los estándares, incluso con valores muy cercanos a los de TX en las cuatro concentraciones. BHS, CB y AA le siguieron en capacidad secuestrante, con una mínima diferencia entre CB y AA en todas las lecturas. CP prácticamente no presentó actividad. La tendencia que se mostró en este ensayo fue TX>X2>CB>AA>BHS>>CP. A pesar de que el comportamiento de los compuestos fue similar al que presentaron en el ensayo de DPPH, existen algunas diferencias entre ambos ensayos. Por ejemplo, en el ensayo de ABTS la disminución en la actividad secuestrante cuando baja la concentración de los compuestos es ordenada y proporcional, pero en el caso del ensayo de DPPH se observó lo contrario en la mayoría de los compuestos, presentando la mayor actividad a menor concentración. Esto puede deberse a que la sensibilidad del DPPH limita la concentración del compuesto que se está evaluando y que en concentraciones mayores a 100 ppm se genera alguna otra reacción que interfiere en la medición del poder reductor del compuesto. Por supuesto depende de las características y mecanismos de reacción con cada compuesto.

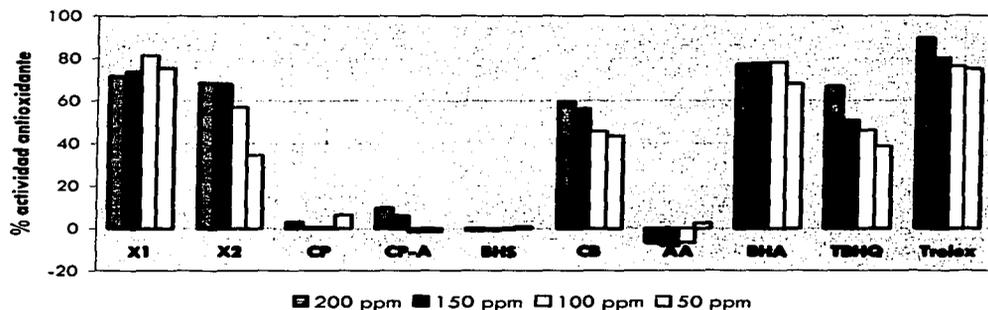
- **Método de blanqueo con β -caroteno/ácido linoléico**

Mediante este método se evaluó la actividad antioxidante de cada uno de los seis compuestos y los estándares por triplicado, además permitió comparar las características secuestrantes y antioxidantes de cada compuesto. Los resultados que se obtuvieron son los siguientes:

	% Actividad Antioxidante			
	200 ppm	150 ppm	100 ppm	50 ppm
X1	71.6	73.5	81.3	75.4
X2	68.4	67.8	56.7	34.3
CP	2.9	0.6	0.6	0.6
CP-A	9.7	5.9	-1.3	-1.4
BHS	-0.8	-0.7	-0.4	-0.7
CB	59.5	56.0	45.5	43.4
BHA	77.2	77.4	77.9	67.9
TBHQ	66.8	50.6	45.8	38.6
AA	-6.8	-8.0	-6.5	2.4
TX	66.8	50.6	45.8	38.6

Tabla 6.3 Ensayo β -caroteno. Media del porcentaje de actividad antioxidante de X1, X2, CP, CP-A, BHS, CB, BHA, TBHQ, TX y AA a 200, 150 100 y 50 ppm.

De los seis compuestos que se evaluaron se puede observar la evidente actividad de X1 con valores por arriba del 70% de actividad en las cuatro concentraciones a las que se probó, superando también a los estándares TBHQ, AA y TX y con porcentajes de actividad muy parecidos a BHA. De la misma forma resultó comparablemente más activo que X2 y CB, que a pesar de que también presentaron actividad antioxidante alta, son superados aproximadamente en un 20% (gráfico 6.6). Esta situación se contrapone a los datos arrojados por las dos pruebas anteriores, en donde siempre X1 apareció con valores menores a X2 y CB. Probablemente se deba a que en esta prueba se emplea una emulsión de ácido linoléico/ β -caroteno/agua, en donde las reacciones de oxidación se dan en la interfase de la emulsión y compuestos polares como X2 y CB no son tan eficaces como lo fue X1 que es un compuesto de menor polaridad.



Gráfica 6.6 Ensayo β -caroteno

Lo mismo sucedió en el caso de los estándares BHA y TBHQ que a diferencia del ensayo de DPPH, en donde presentaron porcentajes por debajo de BHS y CB, en esta prueba obtuvieron valores mucho más altos de actividad. También se pueden apreciar los valores tan bajos y hasta negativos que obtuvo AA que confirman que su actividad es más orientada a ser secuestrante que antioxidante y en este ensayo actuó reaccionando con β -caroteno y no con el ácido linoléico. BHS no presentó actividad, a diferencia de los resultados que obtuvo en las pruebas anteriores, probablemente pudo deberse a que también es un compuesto altamente polar o que es un buen agente secuestrante pero no antioxidante. CP y CP-A continuaron sin presentar actividad, esta vez CP-A mostró valores ligeramente más altos que CP posiblemente por la diferencia de polaridades entre estos. En esta prueba la actividad antioxidante de los compuestos y de los

estándares se observó de la siguiente manera TX>X1≅BHA>TBHQ>X2>CB>>CP-A>CP>BHS>AA.

En general se observó en las tres pruebas, que los compuestos más activos fueron xantona 1 (X1), xantona 2 (X2), boshnalósido (BHS) y cafeato de bornilo (CB).

Las dos xantonas presentaron altos porcentajes de actividad, en algunos casos tanto o más altos que los estándares. La estructura química tricíclica lineal con sustituyentes hidroxilo que poseen, les permite donar fácilmente iones de hidrógeno y estabilizar la molécula por resonancia. Existen estudios que demuestran que la actividad antioxidante de este tipo de compuestos está directamente relacionada con la posición y número de los sustituyentes hidroxilo o metoxilo, en donde una molécula puede disminuir su actividad de 90 a 2.0% por el cambio de posición de un sustituyente. Se tiene la referencia de un trabajo de investigación en donde se estudió la actividad antioxidante de 11 estructuras diferentes de xantonas mediante la prueba de DPPH, para xantonas con estructuras similares a X1 y X2, reportaron 24% de actividad a 10 ppm, un valor relativamente proporcional y parecido al obtenido en este trabajo si tomamos en cuenta que para 50 ppm reportamos 58%. En este estudio se observó también que la actividad es favorecida cuando presentan sustituyentes hidroxilo en posición 1,2,5 o 1,2,8 y que los residuos alilo muchas veces influyen en la disminución de la actividad.⁽⁴⁸⁾

En el caso de los tres iridoides, catalpol (CP), catalpol acetilado (CP-A) y boshnalósido (BHS), se observaron grandes diferencias, ya que CP y CP-A no mostraron actividad ni secuestrante ni antioxidante en ninguno de los tres ensayos, dando valores muy por debajo de la mayoría de los compuestos evaluados y los estándares. Por el contrario, BHS si presentó actividad secuestrante, siempre con valores mayores al 50% a concentración de 200 ppm. Esto nos indica que las diferencias en los sustituyentes tienen una marcada importancia para este tipo de moléculas. A pesar de que no se ha estudiado ampliamente las propiedades antioxidantes de muchos iridoides, existen varias investigaciones acerca de la actividad antiinflamatoria que algunos de estos compuestos presentan y que está estrechamente relacionada con la actividad antioxidante, ya que el proceso inflamatorio se da por un mecanismo de generación de radicales libres similar a la autooxidación. En estas investigaciones se ha encontrado que sustituyentes OH en C-8 reducen considerablemente la actividad de la molécula y la presencia de un OH adicional en C-6 disminuye aún más su actividad. También se ha visto que una doble ligadura entre C-7 y C-8

contribuye positivamente en la actividad de muchos iridoides, pero su oxidación a un derivado epóxi genera disminución en la actividad. La ausencia o presencia de un carboxilo extra-anular no tiene gran relevancia en la actividad. En este experimento se observó el mismo comportamiento con CP y CP-A, por lo que podemos inferir que la pobre actividad antioxidante que mostraron estos compuestos se debió a que poseen exactamente los sustituyentes OH y un enlace epóxi en las posiciones referidas que provocan disminución en la actividad antiinflamatoria. Es por esta razón la diferencia con BHS, que no posee ningún sustituyente en el ciclopentano y por tanto es mucho más activo. Existen otros estudios de iridoides en donde se reporta que presentan actividad antioxidante alta, pero generalmente son iridoides que tienen unidas moléculas que también podrían tener cierta actividad, es el caso de quinonas, ésteres hidroxicinámicos, benzoilos, etc. (44,30)

El cafeato de bornilo (CB) mostró también altos valores de actividad secuestrante y antioxidante en todas las pruebas (>50% de actividad), a pesar de ser un compuesto altamente polar, resultó un potente antioxidante en la prueba de blanqueo de β -caroteno. Estudios previos con ésteres hidroxicinámicos han mostrado que la capacidad para donar electrones esta directamente relacionada con el grado de hidroxilación de la molécula, pero además existe evidencia de que la posición de estos sustituyentes también influye.

Los compuestos utilizados como estándares, BHA, TBHQ, ácido ascórbico y Trolox presentaron un comportamiento esperado ya que de acuerdo con la literatura siempre mostraron porcentajes cercanos a los reportados para cada uno.

Por lo expuesto anteriormente y dados los porcentajes de actividad que mostraron los compuestos en las tres pruebas, Xantona 1, Xantona 2 y Cafeato de Bornilo serán evaluados en la tercera parte de este estudio, para evaluar su capacidad antioxidante como aditivos en un sistema alimenticio de origen graso y determinar como contribuyen en la resistencia a la oxidación y el periodo de inducción de la grasa y corroborar los resultados con las pruebas de actividad antioxidante.

6.3 Tercera Parte: Determinación del Periodo de Inducción

Según los resultados que se obtuvieron en las pruebas anteriores, los compuestos X1, X2 y CB fueron considerados los más adecuados por la gran actividad secuestrante y antioxidante que mostraron. Además son compuestos resistentes a la temperatura que se aplica en la prueba de Schaal Oven (45°C).

Se eligió cacahuate tostado molido como el sistema de prueba debido a la cantidad de grasa que posee este fruto (50% aprox.) y su elevado contenido en ácidos grasos insaturados, lo que garantiza una rápida oxidación, además que se facilita la extracción de la grasa en el análisis. El molido permite una mayor superficie de contacto de la grasa del cacahuate con el oxígeno del medio y además la facilidad de incorporación de los compuestos por aspersión en una solución alcohólica, que permite aplicar uniformemente el compuesto antioxidante al cacahuate.

Se determinó el periodo de inducción de la oxidación de la grasa de cacahuate tostado mediante la prueba de Schaal Oven en presencia de estos tres compuestos a concentración de 200 ppm, debido a que es el límite máximo indicado para aditivos antioxidantes y en la mayoría de las pruebas mostraron el máximo de actividad a esta concentración. Como estándar se utilizó BHA y en mezclas con cada compuesto con una proporción de (3:1) para evaluar sinergismo. La distribución de las ocho charolas que se utilizaron se muestra en la tabla 6.1.

Charola	Aditivo	Concentración (ppm)*	Vehículo
1	Control	--	--
2	X1	200	EtOH
3	X1 + BHA	150/50	EtOH
4	X2	200	MeOH
5	X2 + BHA	150/50	MeOH /EtOH
6	CB	200	MeOH
7	CB + BHA	150/50	MeOH /EtOH
8	BHA	200	EtOH

Tabla 6.1 Contenido de charolas prueba de Schaal Oven.

* Con respecto al contenido total de grasa.

Se realizó el seguimiento de la oxidación midiendo índice de peróxidos durante 35 días (gráfico 6.7). La charola control mostró un periodo de inducción de 15 días, posteriormente se registró un incremento de peróxidos hasta 31 miliequivalentes en el día 22 y a partir del día 23 comenzó un lento decremento.

En la muestra a la que se le adicionó X1 tuvo un ligero incremento del índice de peróxidos registrando el valor más alto de 7.3 el día 23 (gráfico 6.8), pero hasta el día 35 no se observó ningún cambio que marcara el final del periodo de inducción, la charola que contenía la mezcla X1+BHA mostró el mismo comportamiento con valores similares a la muestra con X1. A pesar de que los valores registrados en X1+BHA fueron un poco menores que la muestra que solo tenía BHA, no se puede hablar de sinergismo en este caso ya que no hay una disminución significativa en la cantidad de peróxidos, además en ninguno de los dos casos se tiene registro del final del periodo de inducción para poder ver en cual de las dos muestras se presenta una mayor producción de peróxidos.

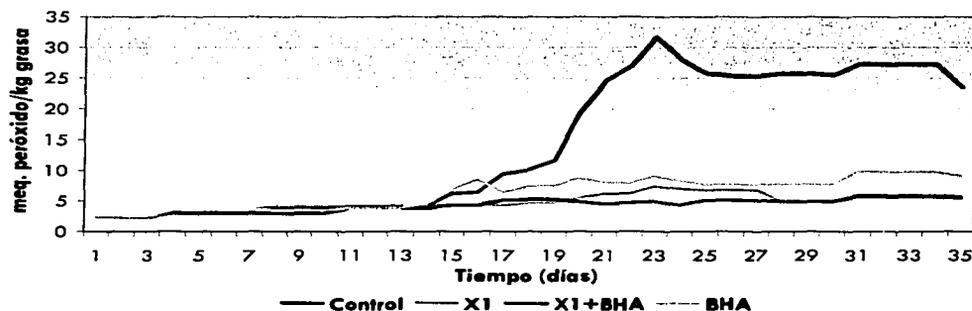


Gráfico 6.7 Seguimiento de la oxidación de X1, X1+BHA y BHA por 35 días.

La muestra a la que se le adicionó X2 tuvo un periodo de inducción de 15 días (gráfico 6.8), al igual que el control, y un incremento con un máximo de peróxidos de 31.6 en el día 23, a pesar de que en ocasiones mostró valores más altos que el control, no es posible calificar la actividad de X2 como prooxidante, ya que la diferencia es muy pequeña y la tendencia de oxidación que siguen ambas muestras es casi la misma. Este resultado se contrapone a los datos obtenidos en las pruebas cualitativas de actividad antioxidante en donde la actividad de X2 siempre se mostró

directamente relacionada con la concentración. Posiblemente el aumento en la producción de peróxidos en esta muestra se deba a la poca actividad que presenta a 200 ppm, ya que comparando con la muestra a la que se le adicionó X2+BHA, en donde X2 se encuentra a una concentración de 150 ppm, si se observa actividad con una disminución notable en la cantidad de peróxidos producidos; sin perder de vista el probable sinergismo entre X2 y BHA, aunque la muestra tratada con BHA presenta valores ligeramente mayores que en el caso de X2+BHA. Para tener una evaluación de la actividad de X2 es necesario realizar la misma prueba a concentraciones menores y mezclas a distintas proporciones con BHA.

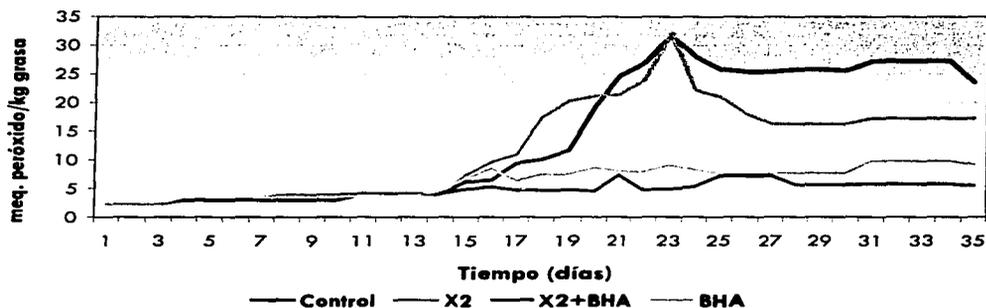


Gráfico 6.8 Seguimiento de la oxidación de X2, X2+BHA y BHA por 35 días.

Las muestras asperjadas con CB y CB+BHA presentaron los valores más bajos de índice de peróxidos en comparación con las otras charolas (gráfico 6.9), con máximos de 6.2 y 5.4 miliequivalentes de peróxido respectivamente. Esto indica que el CB no presenta sinergismo con BHA porque la diferencia entre los valores de peróxidos es muy pequeña, por lo tanto la actividad antioxidante de la muestra CB+BHA depende principalmente de CB, sin embargo es necesaria la completa determinación del periodo de inducción ya que hasta los 35 días en que se tiene el registro no se tiene el registro completo, además una muestra únicamente con BHA a 50 ppm también daría información importante.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

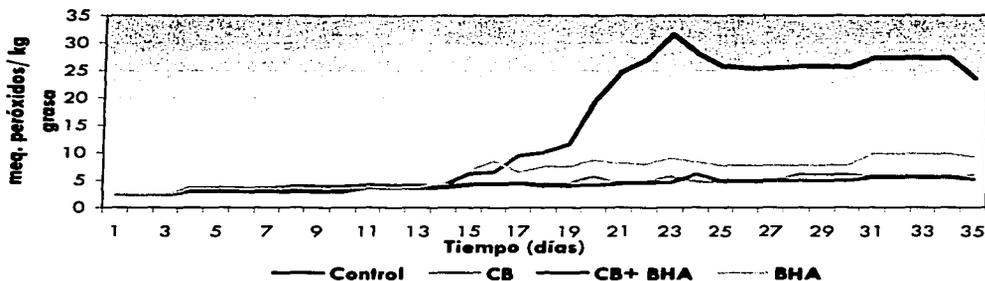


Gráfico 6.9 Seguimiento de la oxidación de CB, CB+BHA y BHA por 35 días.

En esta tercera parte del experimento se pudo observar la diferencia en la actividad antioxidante de cada compuesto, CB mostró ser el más activo para evitar la oxidación de la grasa de cacahuete, a diferencia de lo que se esperaba con los resultados de las pruebas cuantitativas en donde siempre resultó con valores menores a X1 y X2. Se observó también que en todas las muestras a las que les fue asperjada la mezcla del compuesto+BHA presentaron valores más bajos que las muestras que contenían únicamente el compuesto, esto probablemente se deba a un fenómeno sinérgico entre el compuesto y el BHA; pero, sin descartar los resultados obtenidos en la prueba de DPPH, en donde se observó que los tres compuestos X1, X2 y CB aumentaban actividad según iba disminuyendo la concentración, probablemente había una disminución en los valores de generación de peróxidos en las muestras que contenían la mezcla, porque también disminuía la concentración del compuesto a 150 ppm.

Como se vio anteriormente hay muchos factores que determinan la velocidad en la oxidación de las grasas. En algunos estudios se ha determinado la influencia de la concentración de oxígeno y la humedad relativa del medio en la oxidación lipídica, en donde se observa altas concentraciones de oxígeno puede acelerar hasta 10 veces más generación de peróxidos pero combinada esta situación con humedad relativa alta, disminuye considerablemente la oxidación.

TESIS CON
FALLA DE URGEN

Existen muchos trabajos de investigación en donde se estudia una gran cantidad de variables que afectan la estabilidad del aceite cacahuete. Estas variables generalmente son: la temperatura de almacenamiento, la concentración de antioxidante, los métodos de incorporación, la concentración de oxígeno, la humedad relativa, sinergismo, comparaciones entre antioxidantes sintéticos y naturales, etc. Para cada caso se emplean diferentes técnicas. En la mayoría de estos sistemas de prueba tal y como en este trabajo de investigación, se utilizan condiciones aceleradas de oxidación, por lo que se requiere una interpretación cuidadosa de la acción del antioxidante y de los métodos de detección de oxidación.

De acuerdo con las especificaciones oficiales para el aceite de cacahuete, en donde se indica que el límite máximo de peróxidos es de 10 meq/kg de aceite y con una concentración de antioxidante no mayor a 200 ppm; podemos afirmar que los compuestos xantona 1 y cafeato de bornilo son buenos candidatos para ser estudiados como aditivos en alimentos mediante las pruebas toxicológicas pertinentes, ya que mantuvieron el índice de peróxidos por debajo de este límite durante 35 días en las condiciones en las que se trabajó. Y comparando los valores que mostraron ambos compuestos con los del estándar BHA, un antioxidante reconocido por su alta efectividad, aprobado por organismos regulatorios de aditivos en alimentos como FDA y Codex Alimentarius y ampliamente utilizado en la industria de alimentos.

El uso de estos compuestos que poseen características de naturaleza hidrofílica, estabilidad térmica y alto poder reductor, podría representar una buena alternativa al empleo de aditivos sintéticos, ya que actualmente la mayoría de los compuestos que se utilizan como aditivos antioxidantes en alimentos son de naturaleza hidrofóbica, lo que limita mucho su uso para algunos productos susceptibles a la oxidación, en donde un antioxidante polar puede realizar una mayor protección.

7. CONCLUSIONES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos en el experimento se llegó a las siguientes conclusiones:

- Los compuestos que presentaron mayor actividad secuestrante y antioxidante en los ensayos cualitativos y cuantitativos de actividad fueron Xantona 1 (X1), Xantona 2 (X2) y Cafeato de Bornilo (CB).
- De los tres compuestos evaluados, Cafeato de Bornilo (CB) el compuesto que mostró mayor actividad antioxidante, retardando el periodo de inducción en la oxidación de la grasa de cacahuete en 35 días a 45°C, superando más del 100% del tiempo con respecto al control.
- En el caso de X2, es necesaria una evaluación con una menor concentración para descartar actividad prooxidante.
- El empleo de productos naturales es una buena alternativa para utilizar aditivos antioxidantes en alimentos susceptibles a la oxidación.

8. BIBLIOGRAFIA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. Madhavi D.L., Deshpande S. Food Antioxidants. Technological, Toxicological and Health Perspectives. Ed. Marcel Dekker, Inc. 1996.
2. Allen J.C., Hamilton R.J. Rancidity in Foods. Ed. Blackie Academic & Professional 1997.
3. Belitz H.D., Grosch W. Química de los alimentos. Acribia S.A. España 1992.
4. Sellan N. Ege, Organic Chemistry. Structure and Reactivity. Ed. Houghton Mifflin Co. USA. 4th edition 1999. Cap.4 Free Radicals pages 804-838.
5. Official Methods of analysis of AOAC International 16th. Edition vol. II chapter 41 oils and Fats page 9. peroxide value 965.33
6. Hoyland D.V. & Taylor A.J. (1991). A review of the methodology of the TBA test. *Food Chem.* 40, 271-291.
7. S. Kirk S. Ronald, Sawyer Ronald. Pearson's Composition and Analysis of foods. Longman Scientific & Technical. 9th. Edition 1999.
8. Owen R. Fennema. Química de los Alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 2^o. Ed. 1993.
9. Hiramatsu M. et al. 1997. Food and Free Radicals. Chapter 1-2. Ed. Plenum Press, New York.
10. Turek John J., Watkins Bruce A., Schoenlein Ingrid A. (2003). Oxidized lipid depresses canine growth, immune function, and bone formation. *J. of Nutr. Biochem.* 14, 24-31.
11. Logani M.K., Davies R.E. (1980). Lipid oxidation: biologic effects and antioxidants- a review. *Lipids* 15, 485-495.
12. Jim Smith, Food Additive User's Manual. Ed. Blakie and Sons LTd. 1991.
13. Soler-Rivas C., Espín J.C., Wichers H.J. (2000) An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochem. Anal.* 11, 330-338.
14. Arnao M.(2000) Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Technol.* 11, 419-421.
15. Koleva I., Van Beek T., Linsen J.P.H. (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.* 13, 8-17.
16. Rice-Evans C., Sekher A. (2001) Rapid screening method for relative antioxidant activities of flavonoids and phenolics. *Methods Enz.* 335, 266-272.
17. Cano A., Hernández-Ruiz J. (1998) An end point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem. Anal.* 9, 196-202.

18. Arnao M., Cano A. (1999) Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Rad. Res.* 31, 589-596.
19. Arnao M., Cano A. (1996) Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid). Oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods. *Anal. Biochem.* 236, 255-261.
20. Arnao M., Casas J. L. (1990) An enzymatic colorimetric method for measuring naringin using 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid) (ABTS) in presence of peroxidase. *Anal. Biochem.* 185, 335-338.
21. Marco G. J. (1968) A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45, 594-598.
22. Yang Ch., Landau J. M. (2001) Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* 21, 381-406.
23. Duthie G., Duthie S. (2000) Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr. Res. Rev.* 13, 79-106.
24. Ng T. B., Liu F. (2000) Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sci.* 66(8): 709-723.
25. Geissman, T. A. and Crout, D. H. *Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolites*. Ed. Freeman, Cooper & Co. 1969.
26. Torres, S. C. 2001. Evaluación *in vitro* de Xantonas y Sesquiterpenoides de Origen Vegetal como Agentes Hipoglucémicos en aorta de rata. Tesis de Licenciatura. Fac. Ciencias. UNAM, México D.F.
27. Reyes-Chilpa R., Jiménez-Estrada M. & Estrada-Muñiz E. (1997). Antifungal xanthenes from *Calophyllum brasiliense* heartwood. *J. Chem. Ecol.* 23(7):1901-1911.
28. Estrada M. E. 1998. Estudio Químico y Actividad Biológica de las Xantonas aisladas del druramen de *Calophyllum brasiliensis*. Tesis de licenciatura. Fac. Ciencias. UNAM.
29. Jensen S.R., Nielsen B.J. and Dahlgren R. (1975) Iridoid compounds, their occurrence and systematic importance in angiosperms. *Botaniska Notiser* 128, 148-180.
30. Ghisalberti E.L. (1998) Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Rev. Phytomed.* 5(2), 147-163.
31. Shahidi F. (2000) Lipids in Flavor Formation. *Am. Chem. Soc. ASC Symposium Series 756*, 24-43.
32. Mc Murry John. *Química Orgánica*. Grupo editorial Iberoamérica. 1994.

33. Kuri Brena Romero de Terreros P. 1998. Obtención de Antioxidantes Naturales a Partir de Romero y su aplicación en alimentos. Tesis de licenciatura. Facultad de Química UNAM.
34. Taguchi K., Iwami K., Kawabata M. (1988) Proteins Peptides and Maillard Reaction Products. *Agric. Biol. Chem.* 52, 539-543.
35. Lee Kwan-Geun, Shimaboto T. (2002) Toxicology and antioxidant activities of non-enzymatic browning reaction products: review. *Food Rev. Inter.* 18:(2&3),151-175.
36. Manzocco L., Calligaris S. (2001) Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Food Sci. Technol.* 11,340-346.
37. Vickery M., Vickery B. Secondary Plan Metabolism. Ed. University Park Press USA. (1981)
38. Sánchez-Moreno C. (2002) Review: Methods Used to Evaluate the free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Sci. Technol* 8(3):121-137.
39. Arnao M, Cano A. (2001) The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.* 73, 239-244.
40. Maté J., Saltveit M. (1996) Peanut and Walnut Rancidity: Effects of Oxygen Concentration and Relative Humidity. *J Food Sci.* 61:2, 465-472.
41. Hoover M., Nathan P.J. (1981) Influence of tertiary Butylhydroquinone and Certain other Surface Coatings on the Formation of Carbonyl Compounds an Granulated Roasted Peanuts. *J Food Sci.* 47, 246-248.
42. Chu Y., Hsu H. (1998) Effects of Antioxidants on Peanut Oil Stability. *Food Chem.* 66, 29-34.
43. Codex Alimentarius.1992. Volumen 8: Grasas y Aceites Comestibles CODEX STAN 19-1981.
44. Cuendent M., Hostettmann K., Potterat O. (1997) Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties form *Fragraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta* 80, 1144-1152.
45. Silva F., Borges F., Ferreira M. (2001) Effects of Phenolic Propyl Esters on the Oxidative Stability of Refined Sunflower. *J Agr. Food Chem.* 49, 3936-3941.
46. Larson R. (1988) The Antioxidants of Higher Plants. Review article. *Phytochem.* 27:4, 969-978.
47. Hudson B.J. Food Antioxidants. Elsevier Applied Science. Londres & New York 1990.
48. Minami H., Kinoshita M., Fukuyama Y. (1994) Antioxidant Xanthones From *Garcinia Subelliptica*. *Phytochem.* 36:2, 501-506.
49. Frankel E., Meyer A.(2000) The Problems or using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 80, 925-11941.

50. Lira Rocha A. 1992. Estudio químico de *Penstemon barbatus* y *Penstemon campamulatus*. Tesis de Maestría. Instituto de Química. UNAM.
51. Maldonado E., Ramírez M.T., Pérez-Castorena A. (1998) Anti-inflammatory Activity of Phenyl Propanoids from *Creopsis mutica* var. *mutica*. *Planta Med.* 64:660-601.
52. Navarro Ocaña A. 1991. Empleo de los productos naturales como fuente de Intermediarios Sintéticos (boschnalósido). Tesis de Maestría. Instituto de Química. UNAM