



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

---

---

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE VAINILLA**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**ADALITH ROJAS LÓPEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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    | M. en C. Juan Manuel Rodríguez          |
| Vocal         | Q. Pedro Villanueva González            |
| Secretario    | Dra. María Del Pilar Cañizares Macías   |
| 1er. Suplente | Q.F.B. Silvia De Jesús Mendoza Arellano |
| 2° Suplente   | Dra. Luz Elena Vera Ávila               |

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 105. División de Estudios de Posgrado. Departamento de Química Analítica. Edificio B. Facultad de Química. UNAM.

## **ASESOR DEL TEMA:**

---

Dra. María del Pilar Cañizares Macías

## **SUSTENTANTE:**

---

Adalith Rojas López

---

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A mis Padres:**

Cecilio Rojas Espejo y Lidia López Hernández por todo el apoyo brindado y la confianza depositada en mí, me han regalado una gran oportunidad de entender el mundo de una manera en que todavía me sorprende, en el que puedo ser un espíritu libre, en el que no pierdo la esperanza, pues me han dotado de la fortaleza para luchar por los sueños y seguir adelante. Muchas, muchas gracias.

### **A mi hermano:**

Antonio Erick, por ese espíritu luchador que te caracteriza y del cual he aprendido tanto, por compartir tantas vivencias, por las palabras de aliento.

### **A mi hermana:**

Lidia Patricia, por estar siempre a mí lado apoyándome y por cultivar en tú ser tal conocimiento, que me despierta la inquietud de mejorar en todos los aspectos de mi vida.

---

A la Dra. María del Pilar Cañizares, por su tutoría e infinita paciencia y, sobre todo por la gran oportunidad que me brindo de comenzar de nuevo y poder concluir esta etapa de mi vida mediante la realización de este proyecto.

A mis amigas: Maru, Vanessa, Bety, Selene con las que inicie esta maravillosa etapa de mi vida y que aún ahora sé que puedo contar con ustedes. Y muy especialmente a Hortencia, estoy muy orgullosa de tener una amiga como tú, en verdad eres un ejemplo a seguir, contigo compartí muchas experiencias e inquietudes, espero seguir conservando tú amistad por un largo tiempo.

A Lesli y Marisol por su grandiosa amistad, me han enseñado que ante cualquier adversidad la vida vale la pena.

A mis compañeros de laboratorio: Lidia, Jesús, Ahmed, Rosa, Vania, Gaby y Tania por toda la buena vibra y motivación para seguir adelante.

A todas las personas que a lo largo de mi vida han contribuido en mi formación: familiares, maestros y amigos, aquellos que solo estuvieron de paso y los que entraron en mí vida y permanecerán siempre conmigo.

*Gracias a la vida que me ha dado tanto.*

*Violeta Parra (1917 - 1967)*

---

## ÍNDICE GENERAL

|   |    |
|---|----|
| Lista de Abreviaturas.....  | iv |
| CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....   | 1  |
| 1.1. Objetivo general.....  | 3  |
| 1.2. Objetivos específicos.....   | 3  |
| CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.....   | 4  |
| 2.1. Vainilla.....  | 4  |
| 2.1.1. Reseña histórica: Origen de la vainilla.....   | 4  |
| 2.1.2. Descripción botánica y condiciones de crecimiento de la planta de vainilla.....                | 5  |
| 2.1.3. Fuentes de vainilla natural y composición química.....   | 6  |
| 2.1.4. Beneficio de las vainas de vainilla.....   | 8  |
| 2.1.5. Usos.....  | 9  |
| 2.1.6. Propiedades bioactivas.....  | 9  |
| 2.2. Antioxidantes: ¿Qué son y por qué son de interés?.....   | 12 |
| 2.2.1. Radicales libres y el deterioro oxidativo.....   | 12 |
| 2.2.2. El estrés oxidativo.....   | 15 |
| 2.2.3. Definición de antioxidante.....  | 17 |
| 2.2.4. Antioxidantes de fuentes naturales.....  | 19 |
| 2.3. Métodos para determinar la capacidad antioxidante.....   | 21 |
| 2.3.1. Autooxidación: Mecanismo y cinética.....   | 23 |
| 2.3.2. Método de la capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC).....                            | 26 |
| 2.3.3. Método de análisis por inyección en flujo (FIA) utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu..... | 30 |
| 2.3.3.1. Análisis por inyección en flujo.....   | 33 |

---

|   |    |
|---|----|
| CAPÍTULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....                                    | 38 |
| 3.1. Materiales y equipo.....   | 38 |
| 3.2. Reactivos.....   | 38 |
| 3.3. Disoluciones.....  | 39 |
| 3.4. Obtención de extractos de vainilla.....                                | 41 |
| 3.4.1. Método de secado.....  | 42 |
| 3.4.2. Método convencional (MNX-FF-1996-SCFI).....                          | 43 |
| 3.4.3. Extracción asistida con microondas focalizadas.....                  | 43 |
| 3.5. Obtención del extracto de cacao.....                                   | 43 |
| 3.6. Obtención de extractos de café.....                                    | 44 |
| 3.7. Determinación de vainillina en los extractos de vainilla.....          | 44 |
| 3.8. Capacidad antioxidante por el método ORAC.....                         | 45 |
| 3.9. Capacidad antioxidante con el reactivo de Folin-Ciocalteu.....         | 47 |
| 3.10. Métodos de beneficio de vainilla.....                                 | 48 |
| CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....                                      | 50 |
| 4.1. Obtención de extractos de vainilla y determinación de vainillina.....  | 50 |
| 4.2. Implementación del método ORAC.....                                    | 51 |
| 4.3. Capacidad antioxidante en extractos de vainilla por el método ORAC.... | 52 |
| 4.3.1. Curva de calibración de ácido cafeico.....                           | 52 |
| 4.3.2. Evaluación de la precisión del método ORAC.....                      | 54 |
| 4.3.3. Capacidad antioxidante en extractos de vainilla.....                 | 55 |
| 4.3.4. Capacidad antioxidante en compuestos de vainilla.....                | 57 |
| 4.4. Capacidad antioxidante de otros compuestos.....                        | 60 |
| 4.5. Capacidad antioxidante de café y cacao. Comparación con vainilla.....  | 63 |
| 4.6. Capacidad antioxidante por el método de Folin-Ciocalteu.....           | 64 |

---

|   |    |
|---|----|
| 4.6.1. Evaluación del método Folin-Ciocalteu.....   | 66 |
| 4.7. Comparación de los métodos ORAC y Folin-Ciocalteu para<br>la determinación de la capacidad antioxidante en extractos de<br>vainilla, café y cacao..... | 66 |
| 4.7.1. Correlación entre los métodos.....   | 68 |
| 4.8. Efecto del marchitado tradicional de la vainilla durante el proceso de<br>beneficio sobre la capacidad antioxidante.....                               | 69 |
| CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....   | 71 |
| CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA.....   | 72 |
| ANEXO.....  | 77 |



---

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                    |  |
|--------------------|--|
| AAPH               | 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro  |
| ABC                | Área bajo la curva cinética  |
| AC                 | Ácido cafeico  |
| ACG                | Ácido clorogénico  |
| AG                 | Ácido gálico   |
| Aphb               | Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico  |
| AT                 | Ácido tánico   |
| AV                 | Ácido vainillico   |
| CA                 | Capacidad antioxidante   |
| CPT                | Extracto de café planchuela tostado  |
| CPV                | Extracto de café planchuela verde  |
| EAMF               | Extracción asistida por microondas focalizadas   |
| EAMFG              | Extractos obtenidos por EAMF aplicada a vainas comerciales (Gourmet)                                 |
| EAMFZ              | Extractos obtenidos aplicando la EAMF a vainas zacatillo sin tratamiento previo de secado            |
| EAMFZ <sub>s</sub> | Extractos obtenidos aplicando la EAMF a vainas zacatillo sometidas a un tratamiento previo de secado |
| EMF                | Energía de microondas focalizadas  |
| FC                 | Folin-Ciocalteu  |
| FIA                | Análisis de inyección en flujo, por sus siglas en inglés   |
| FL                 | Fluoresceína   |

---

|      |  |
|------|--|
| M10  | Tratamiento de marchitado con microondas durante 20 seg además de radiación ultrasónica por 10 min a 38°C          |
| MOZ  | Extractos obtenidos aplicando el método oficial (convencional) a vainas zacatillo sin tratamiento previo de secado |
| ORAC | Capacidad de absorción del radical oxígeno, por sus siglas en inglés   |
| pHBA | p-Hidroxibenzaldehído  |
| RFC  | Reactivo de Folin Ciocalteou   |
| SAF  | Solución amortiguadora de fosfatos   |
| T0   | Tratamiento de marchitado tradicional (inmersión en agua a 60°C durante 3 min)                                     |
| T06' | Tratamiento de marchitado por inmersión en agua a 60°C durante 6 min   |
| T10  | Tratamiento de marchitado tradicional y posmarchitado con radiación ultrasónica por 10 min a 38°C                  |
| TAH  | Transferencia de un átomo de hidrógeno   |
| TE   | Transferencia de electrones  |
| Vai  | Vainillina   |

### 1. INTRODUCCIÓN

Debido a que los antioxidantes pueden ejercer efectos benéficos en la protección de los alimentos contra el deterioro oxidativo y en la prevención de múltiples enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, encuentran aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Los antioxidantes empleados en las diferentes industrias pueden ser de origen natural o sintético.

A partir de la década de los 80's, surge en el mercado internacional una tendencia al consumo de productos saludables y con ello un creciente interés en la búsqueda de antioxidantes naturales como una alternativa más segura frente al uso de compuestos sintéticos.

Las plantas y especies son uno de los blancos más importantes para la búsqueda de antioxidantes naturales y varios esfuerzos se han realizado para identificar los compuestos que pueden actuar como antioxidantes, a este respecto, los fitoquímicos mejor caracterizados y más estudiados debido a su presencia ubicua y a su elevado consumo a través de la dieta son los polifenoles.

De entre las diversas especies cuyas propiedades antioxidantes han sido estudiadas "la vainilla", uno de los saborizantes más demandados en la industria alimentaria, no ha recibido mucha atención al respecto, si bien se ha reconocido que la vainillina, el principal componente de la vainilla natural (1 - 3%) posee propiedades antioxidantes, los extractos naturales no han sido ampliamente estudiados.

Numerosos métodos se han utilizado para evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de diferentes alimentos y matrices biológicas de interés, sin embargo, hasta ahora, no hay un método oficial estandarizado y por lo tanto es recomendable que cada evaluación deba hacerse con diferentes métodos de medición.

El método de la capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés) posee un mecanismo basado en la transferencia de un átomo de hidrógeno. Si bien es cierto que no existe una metodología considerada como la más conveniente, numerosos estudios consideran que el ensayo ORAC tiene ventajas

comparativas con respecto al resto de los métodos que tienen este mismo mecanismo.

Por otra parte, uno de los métodos más populares, cuyo mecanismo consiste en la transferencia de electrones, es el que se basa en la reacción de oxidación de los compuestos fenólicos (antioxidante) con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Este método adaptado para su uso en un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) ha mostrado ser conveniente, simple y reproducible.

## 1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad antioxidante en vainas de vainilla por dos metodologías diferentes.

## 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la capacidad antioxidante de extractos de vainilla tanto por el método ORAC como por el método FIA-Folin Ciocalteu
- Establecer la relación entre el valor de capacidad antioxidante obtenido con cada uno de los métodos utilizados con el contenido de vainillina en los extractos
- Determinar si existe correlación entre los valores de capacidad antioxidante obtenidos por el método ORAC y aquellos obtenidos por el método FIA-Folin Ciocalteu
- Determinar el efecto del marchitado tradicional en el proceso de beneficio de la vainilla sobre su capacidad antioxidante
- Comparar la capacidad antioxidante de la vainilla con otros productos de interés nacional como el café y el cacao

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. VAINILLA

#### 2.1.1. RESEÑA HISTORICA: ORIGEN DE LA VAINILLA

Aunque con frecuencia se le cita como nativa de una extensa área de América Tropical, la vainilla es tal vez nativa sólo de Mesoamérica. De acuerdo a los datos históricos, las primeras noticias que se tienen de la vainilla datan de los años 1427-1440, período durante el que los aztecas conquistaron el imperio totonaca, recibiendo como parte del tributo ofrecido la vainilla. Los aztecas la usaron como saborizante de la bebida conocida como xocolatl (chocolate) la cual era valorada por ser considerada estimulante y afrodisíaca y solamente era consumida por la nobleza azteca. Posteriormente, los españoles la llevaron al viejo mundo en el año de 1519 y no fue sino hasta después de la conquista, precisamente en 1552, que su uso fue documentado en el *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*- el códice de la Cruz-Babiano-, donde aparece con su nombre náhuatl, tlilxochitl (flor negra). (Hágsater et al, 2005; ASERCA, 2002a)

Por más de tres siglos, México permaneció como el único productor de vainilla para el consumo mundial, muchos esfuerzos fueron hechos para cultivar la vainilla fuera de México, sin embargo, los cultivos fracasaban, ya que florecían pero no producían los frutos. Fue hasta 1836 que el botánico Charles Morren de Liege descubrió que las flores requieren ayuda para ser polinizadas, en forma natural por insectos, esto condujo al desarrollo de un método de polinización artificial de las flores de vainilla, convirtiéndose en el primero en producir vainas de vainilla fuera de México. No obstante, fue en 1841 que el esclavo Edmond Albins trabajando en las plantaciones de la isla de Reunión ideó un método práctico de polinización manual usando un palillo de bambú. Se produjo entonces su expansión más allá de Europa llegando a África y Asia. A mediados del siglo XIX llegó a Madagascar, país que con los años se convertiría en el principal productor de vainilla en el mundo. (ASERCA, 2002b; Rao y Ravishankar, 2000).

### 2.1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LA PLANTA DE VAINILLA

La vainilla es una orquídea tropical perteneciente a la familia *Orchidaceae* y es el único género de esta gran familia de plantas cuyas especies producen un fruto comercialmente importante por su aroma y sabor. Es cultivada por propagación vegetativa, en un clima tropical cálido-húmedo, la temperatura óptima para su crecimiento es de 21 a 32°C y puede soportar temperaturas mínimas de 5 a 7°C por un período corto de tiempo a una altitud de 0 a 600 m sobre el nivel del mar con una precipitación pluvial de 1,200 a 3,000 mm anuales y una buena distribución a través del año. El terreno para plantar la vainilla debe contar con un buen drenaje, ser rico en materia orgánica y tener un pH entre 6 y 7.

A diferencia de otras orquídeas, la vainilla es un bejuco o enredadera que alcanza hasta 50 m de longitud; tiene tallos carnosos; hojas lisas, gruesas, oblongadas de un color verde vivo brillante de 10 a 23 cm de largo y 4 a 6 cm de ancho; y numerosas raíces axiales aéreas que crecen opuestas a cada hoja y por las cuales se sujeta a un soporte (plantas arbustivas o árboles). La vainilla florece entre el 3er y 4º año después de ser plantada. Las flores de color blanco amarillento se encuentran en racimos sostenidas sobre un pedúnculo de 4 a 5 cm de largo. La planta no efectúa la autofecundación debido a la fisiología de su flor por lo que es necesario llevar a cabo la polinización artificial durante el periodo en que las flores permanecen abiertas (seis a ocho horas) para la fertilización y posterior desarrollo del fruto.

En estado de maduración total las vainas son de color amarillo verdoso, cilíndricas de 10 a 25 cm de largo y 1 a 1.5 cm de ancho, tienen una sección transversal triangular, con una cavidad central que contiene miles de minúsculas semillas. (Hernández, 2009; Pacheco, 2009; Rao y Ravishankar, 2000).



**Figura 2-1.** a) Planta de vainilla en etapa de floración. b) Vainas de vainilla verde.

### 2.1.3. FUENTES DE VAINILLA NATURAL Y COMPOSICIÓN QUÍMICA

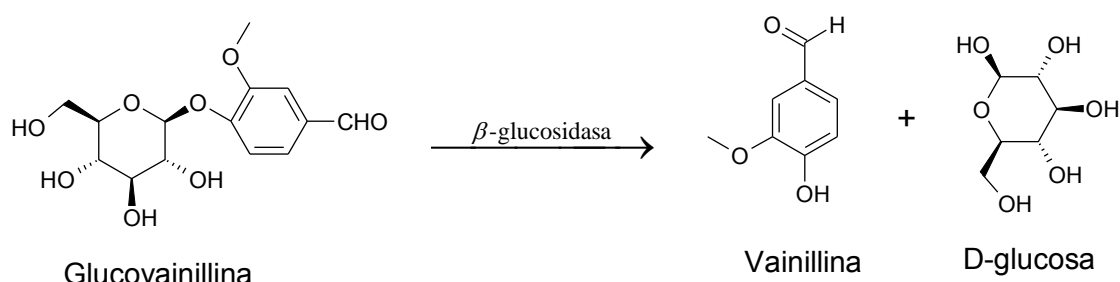
La vainilla natural es una mezcla compleja de un gran número de componentes extraídos de las vainas curadas de *V. planifolia* Andrews, también conocida como *Vanillus fragrans* (Salisbury) Ames, aunque existen más de 110 especies de plantas de vainilla en el mundo esta es de importancia económica directa por ser la principal fuente de la vainilla comercial. Fuentes minoritarias de vainilla son *V. tahitensis* JW Moore y *Vanillus pompona* Scheide. Debido a su baja calidad la *V. pompona*, conocida también como vainillón es frecuentemente utilizada como un adulterante o para la fabricación de perfumes y tabaco (ASERCA, 2002a; Sinha et al, 2008; Dignum et al, 2001). La vainilla natural contiene más de 200 componentes de los cuales solamente alrededor de 26 se encuentran en concentraciones mayores a 1mg/Kg y el resto se encuentra en cantidades traza. (Sinha, 2007).



Entre los constituyentes no volátiles que imparten su característico sabor a la vainilla se encuentran taninos, polifenoles, aminoácidos libres y resinas. En tanto que dentro de los compuestos volátiles responsables del aroma y sabor podemos mencionar, carbonilos, alcoholes aromáticos y alifáticos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, fenoles, lactonas, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, terpenoides, heterociclos, etc.

Todos estos constituyentes juntos imparten un delicado, rico y suave aroma con notas dulces, amaderadas y balsámicas. (Sinha, 2008).

Entre los diversos compuestos volátiles reportados, la vainillina es el más abundante (1-3%) y junto con otros compuestos fenólicos importantes como el ácido vainílico (0.2%), *p*-hidroxibenzaldehído (0.2%) y ácido *p*-hidroxibenzoico (0.02%) son considerados los principales constituyentes aromáticos de los extractos de vainilla (Sinha et al, 2007; Valdez-Flores, 2006). Estos compuestos se encuentran como precursores glucosídicos en las vainas de vainilla verde maduras, la ruta biosintética de estos precursores aún no ha sido esclarecida. Dichos precursores no tienen ninguna cualidad olfatoria de interés hasta que la aglicona es liberada cuando el enlace *O*-glucosídico es hidrolizado por la enzima  $\beta$ -glucosidasa.



**Figura 2-2.** Reacción de hidrólisis de la glucovainillina por acción de la  $\beta$ -glucosidasa

Esto se logra mediante el proceso de curado o beneficiado por medio del cual se obtienen las tan apreciadas características de aroma y sabor de la vainilla. No obstante, diferentes estudios muestran que el tratamiento térmico inicial de este proceso disminuye considerablemente la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa (Dignum et al, 2002, Odoux et al, 2003 a). Una de las investigaciones más recientes (Odoux et al, 2006) sugieren que el mecanismo de hidrólisis en las vainas de vainilla está regulado

por compartimentación celular , pues los hallazgos de estos autores (Odoux et al 2003 b) indican que a nivel celular la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa parece estar localizada en el citoplasma y/o apoplasto mientras que la glucovainillina se encuentra en la vacuola, por lo tanto, si se logra una descompartimentación total entonces se observara la hidrólisis completa de la vainillina independientemente de que la actividad enzimática  $\beta$ -glucosidasa se pierda. El nivel de la actividad de esta enzima sólo tiene efecto sobre la cinética de la hidrólisis de glucovainillina.

Otras enzimas que desempeñan un papel importante durante el período de crecimiento de la vaina y durante el proceso de curado son la peroxidasa y la polifenoloxidasas. La primera permite oxidar a la vainillina y el *p*-hidroxibenzaldehído en los ácidos vainílico y *p*-hidroxibenzoico respectivamente (Pacheco, 2009), en tanto que la segunda puede jugar un papel importante en la producción de quinonas y pigmentos estables condensados durante el curado de las vainas (Dignum et al, 2001; Waliszewski et al, 2009)

### 2.1.4. BENEFICIO DE LAS VAINAS DE VAINILLA

Se han desarrollado un gran número de procedimientos que pueden ser utilizados para el curado de la vainilla, pero todos ellos son caracterizados por cuatro etapas que permiten su transformación en un producto con las características demandadas en el mercado. Estas etapas son:

Marchitado: Esta etapa tiene como finalidad detener el desarrollo vegetativo posterior a la cosecha interrumpiendo la función respiratoria por ruptura de la membrana celular, consiguiendo así que las enzimas entren en contacto con sus sustratos. Existen diversos métodos de marchitado como son: escaldado (inmersión) en agua caliente, calentamiento de las vainas al sol o en horno, escarificación (rayado), exposición con etileno, tratamiento con ácido acético naftalénico y congelación rápida y lenta, pero a nivel artesanal e industrial los más utilizados son el horno y la exposición al sol. (Pacheco, 2009; Rao y Ravishankar, 2000; Rosado-Zarrabal et al, 2007; Dignum et al, 2001; Mariezcurrena et al, 2008).

Sudado: Durante el período de sudado se eleva la temperatura provocando un secado inicial rápido, lo cual permite alcanzar un nivel de humedad que reduce el riesgo de contaminación microbiana previniendo fermentaciones dañinas y promoviendo que la actividad enzimática sea la óptima para que la vainillina y los compuestos relacionados sean liberados de sus precursores glucosídicos. Durante esta etapa se produce la oxidación de compuestos polifenólicos, los cuales darán a las vainas curadas su característico color café chocolate y algunos de sus atributos de sabor. Así pues, en esta etapa se determinará en gran medida la calidad del producto final. (Murillo, 1995; Rao y Ravishankar, 2000).

Secado: La humedad que conservan las vainas después del sudado se disminuye aun más durante esta etapa para reducir la actividad enzimática y cambios bioquímicos indeseables, además de evitar la contaminación microbiana.

Acondicionamiento: En esta etapa las vainas son almacenadas en cajas cerradas por uno o varios meses. Varias reacciones químicas tales como esterificación, eterificación, degradación oxidativa, etc. tienen lugar durante este período para producir varios constituyentes volátiles responsables del aroma. (Rao y Ravishankar, 2000).

### 2.1.5. USOS

La vainilla es considerada el saborizante de mayor importancia en el ámbito mundial. Su uso se distribuye en diversas y variadas industrias, que van desde la alimentaria (saborizante por excelencia en repostería y confitería), pasando por la licorera, refresquera, farmacéutica, cosmética, tabacalera, hasta llegar incluso, a la industria artesanal. También se consume directamente en los hogares para darle sabor a algunos alimentos. (ASERCA, 2002 a y 2002 b).

### 2.1.6. PROPIEDADES BIOACTIVAS

Ya desde que las culturas mesoamericanas utilizaban la vainilla, le adjudicaron propiedades rituales y curativas, se le consideraba como un afrodisíaco, carminativo y estimulante. Los venezolanos comúnmente utilizan las vainas para el tratamiento

de la fiebre y el espasmo. Es utilizada como un antiespasmódico y afrodisíaco en Argentina. En Palau, la vainilla se usa para curar la dismenorrea, fiebre e histeria. Todos estos usos de la vainilla, han dado lugar a usos funcionales de la vainillina, el principal componente de la vainilla. En años recientes, se han realizado investigaciones en cuanto a las propiedades de la vainillina como antioxidante, antimicrobiano, anticarcinogénico y agente antidrepanocítico.

| COMPONENTE<br>ACTIVO                           | ACTIVIDAD O EFECTO<br>OBSERVADO   | REFERENCIA  |
|--|---|---|
| <b>ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA</b>                |   |   |
| <b>Vainillina</b>                              | Actividad antifúngica contra hongos y levaduras que provocan descomposición de alimentos                          | Fitzgerald et al. 2005  |
|  | Inhibición de crecimiento de hongos y levaduras en purés de frutas, sistemas de agar basados en fruta y refrescos | López-Malo y Alzamora, 1995; Cerrutti y Alzamora, 1996; Cerrutti et al. 1997; López_ Malo et al. 1998; Fitzgerald et al. 2004 |
|  | Actividad antifúngica contra <i>Candida albicans</i> y <i>Cryptococcus neoformans</i>                             | Boonchird y Flegel, 1982  |
| <b>Bases de Schiff derivadas de vainillina</b> | Actividad antibacterial contra algunas cepas de gram positivos y gram negativos                                   | Vaghasiya et al. 2004   |
| <b>ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE</b>                  |   |   |
| <b>Vainillina</b>                              | Inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad humanas  | Teissedre y Waterhouse, 2000  |
|  | Actividad de captación de radicales libres  | Sawa et al., 1999; Mahal et al., 2001; Kumar et al., 2002; 2004   |
|  | Protección de alimentos contra la oxidación   | Burri et al., 1989; 1991  |

| COMPONENTE ACTIVO                                   | ACTIVIDAD O EFECTO OBSERVADO  | REFERENCIA  |
|---|---|---|
|   | Inhibición de la autooxidación de la grasa de la leche  | Mykolaiivna y Petrivna, 2005  |
|   | Protección de las células de la membrana contra el daño oxidativo inducido por fotosensibilización                          | Kamat et al., 2000  |
| <b>Extracto hidroalcohólico de vainilla</b>         | Actividad antioxidante  | Toshio et al., 2000   |
|   | Eficacia antioxidante en la conservación de alimentos   | Aruoma, 1999  |
| <b>ACTIVIDAD ANTICARCINOGENICA Y ANTIMUTAGENICA</b> |   |   |
| <b>Vainillina</b>                                   | Efecto antimutagénico en células de mamífero <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>   | Imanishi et al., 1990; Ferguson, 1994   |
|   | Disminución del número de tumores de colon inducidos por agentes múltiples en ratas   | Akagi et al., 1995  |
|   | Supresión de aberraciones cromosómicas inducidas por rayos UV, rayos X, mitomicina C y en <i>Drosophila melanogaster</i>    | Sasaki et al., 1990; Keshava et al., 1998; Inouye et al., 1988; De Andrade et al., 1992 |
|   | Inhibición de mutaciones en el locus <i>CD59</i> sobre cromosomas humanos   | Gustafson et al., 2000  |
|   | Inhibidor de DNA-PK, por lo tanto útil en la reparación del DNA   | Durant y Karran, 2003   |
| <b>Vainillina y o-vainillina</b>                    | Inhibición de mutagenesis en <i>Escherichia coli</i> causada por N-metil-N-nitrosourea y rayos UV                           | Takahashi et al., 1990  |
| <b>Glucosilvainillina</b>                           | Efecto antimutagénico en bacterias  | Kometani et al., 1993   |
| <b>ACTIVIDAD HIPOLIPIDEMICA</b>                     |   |   |
| <b>Vainillina</b>                                   | Actividad como un agente hipolipidémico-hipotriglicéridémico en un amplio intervalo de concentraciones en el tratamiento de | Mokshagundam y Mokshagundam, 2003   |

| COMPONENTE ACTIVO   | ACTIVIDAD O EFECTO OBSERVADO  | REFERENCIA            |
|---|---|-----------------------|
|   | diabetes tipo 2, trastornos cardiovasculares y obesidad                                 |                       |
| <b>ACTIVIDAD ANTIDREPANOCÍTICA</b>                        |   |                       |
| <b>Vainillina</b>   | Agente potencial para el tratamiento de anemia falciforme                               | Abraham et al., 1991  |
|   | Efecto antidrepanocítico del profarmaco de la vainillina MX-1520                        | Zhang et al., 2004    |
| <b>OTRAS ACTIVIDADES</b>                                  |   |                       |
| <b>Vainillina</b>   | Antidoto para neutralizar el efecto tóxico de <i>Chinorex fleckeri</i> (medusa de caja) | lekhsan et al., 1998; |
| <b>Extracto alcohólico de hojas de <i>V. fragrans</i></b> | Efecto tóxico para larvas de mosquito   | Sun et al., 2001      |
| <b>Aceites volátiles con 5% de vainillina</b>             | Incremento de la eficacia repelente de especies de mosquitos                            | Tawatsin et al., 2001 |
| <b>Toluamida con vainillina</b>                           | Incremento del efecto repelente de especies de mosca negra                              | Retnakaran, 1984      |

**Tabla 2-1.** Estudios en relación con algunas propiedades bioactivas de la vainilla

Otras actividades que muestra la vainilla son como anti-agregante, anti-hepatotóxica, antiinflamatoria, antiviral, analgésica, anestésica, antiséptica, entre otras. Sin embargo, debido a la baja biodisponibilidad de la vainillina, estudios adicionales *in vivo* podrían ser útiles para amplificar su uso medicinal y hacerla parte efectiva de la prevención a través de la dieta. (Sinha et al., 2008)

## 2.2. ANTIOXIDANTES: ¿QUÉ SON Y POR QUÉ SON DE INTERÉS?

### 2.2.1. RADICALES LIBRES Y EL DETERIORO OXIDATIVO

Una gran cantidad de productos así como los sistemas biológicos son susceptibles de sufrir un deterioro químico dependiente de oxígeno (deterioro oxidativo)

provocando cambios indeseables que van desde la formación de gomas en la gasolina y otros productos del petróleo, envejecimiento del caucho, decoloración de plásticos y pigmentos, enranciamiento de grasas, aceites, productos alimenticios, jabones, entre otros tantos productos, hasta el daño y muerte celular que conduce al desarrollo de múltiples trastornos clínicos que afectan la salud humana. (Halliwell y Gutteridge, 2007; Huang et al, 2005; Wong et al, 2006)

|  |  |
|--|--|
| <p><b>Desordenes que afectan el Sistema Inmune</b><br/> Lupus<br/> Tiroiditis de Hashimoto<br/> Inflamación vascular<br/> Sarcoidosis<br/> Enfermedad de Grave<br/> SIDA</p> <p><b>Isquemia-estados de reflujo</b><br/> Ataque<br/> Infarto/Arritmias/Angina/Espasmo al miocardio<br/> Trasplante de órganos<br/> Contractura de Dupuytren<br/> Daño fetal inducido por talidomida, fenitoína, cocaína<br/> Precondición isquémica</p> <p><b>Sobrecarga de hierro (Tejido y Plasma)</b><br/> Hemocromatosis idiopática<br/> Sobrecarga de hierro en la dieta (envenenamiento accidental ,Bantú)<br/> Talasemias y otras anemias crónicas tratadas con transfusiones<br/> Deficiencias nutricionales (Kwashiorkor)<br/> Alcoholismo<br/> Insuficiencia hepática fulminante<br/> Sobrecarga de hierro relacionada con alcohol<br/> Quimioterapia y radioterapia contra el cáncer<br/> Rechazo al trasplante de pulmón (Bronquiolitis obliterante)</p> <p><b>Daño por radiación</b><br/> Consecuencias de explosiones nucleares<br/> Exposición accidental<br/> Radioterapia<br/> Exposición ambiental</p> <p><b>Envejecimiento</b></p> | <p><b>Sistema cardiovascular y corazón</b><br/> Cardiomiopatía alcohólica<br/> Deficiencia de selenio (Enfermedad de Keshan)<br/> Arterioesclerosis<br/> Cardiotoxicidad por antraciclina<br/> Hipertrofia cardíaca<br/> Endocarditis eosinofílica<br/> Complejo de esclerosis tuberosa</p> <p><b>Riñon</b><br/> Síndrome nefrótico autoinmune<br/> Glomerulonefritis<br/> Nefrotoxicidad por aminoglucósidos<br/> Nefrotoxicidad por metales pesados<br/> Hiperoxaluria<br/> Cistinosis</p> <p><b>Tracto gastrointestinal/Hígado</b><br/> Cáncer oral relacionado con nuez de betel<br/> Daño al hígado por endotoxinas o hidrocarburos halogenados (ej.:CCl<sub>4</sub>)<br/> Exposición a agentes diabetogénicos<br/> Pancreatitis<br/> Hepatitis<br/> Gastritis<br/> Cancer gástrico relacionado con <i>H. pylori</i><br/> Lesiones por antiinflamatorios no esteroideos (NSAID)<br/> Envenenamiento oral por hierro<br/> Cáncer de hígado relacionado con parásitos o virus<br/> Enfermedad de Crohn<br/> Colitis ulcerativa<br/> Leucoplasia oral</p> <p><b>Sistema Musculo esquelético</b><br/> Osteoporosis<br/> Osteoartritis</p> |
|--|--|

|  |  |
|--|--|
| <p><b>Glóbulos rojos</b><br/> Fenilhidrazina, primaquina y fármacos relacionados<br/> Intoxicación por plomo<br/> Fotooxidación de protoporfirina<br/> Malaria<br/> Favismo<br/> Anemia hemolítica<br/> Anemia de Fanconi</p> <p><b>Sistema reproductivo</b><br/> Esterilidad debida a inflamación<br/> Defectos de placentación<br/> Varicocele<br/> Mola hidatiforme<br/> Preeclampsia</p> <p><b>Tracto respiratorio</b><br/> Efectos del humo del cigarro<br/> Hiperoxia<br/> Displasia broncopulmonar<br/> Exposición a contaminantes del aire (O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>)<br/> Pneumoconosis<br/> Carcinogenicidad asbestos<br/> Asma<br/> Fibrosis quística<br/> Rinitis alérgica<br/> Sarcoidosis pulmonar<br/> Toxicidad por Bleomicina</p> <p><b>Piel</b><br/> Radiación UV<br/> Daño térmico<br/> Porfiria<br/> Dermatitis<br/> Psoriasis<br/> Liquen escleroso<br/> Lepra<br/> Pseudoxantoma elástico</p> | <p>Artritis reumatoide<br/> Gota<br/> Fibromialgia<br/> Síndrome de fatiga crónica<br/> Daño por ejercicio<br/> Miosistis por cuerpos de inclusión</p> <p><b>Sistema nervioso/desordenes neuromusculares relacionados</b><br/> Oxígeno hiperbárico<br/> Deficiencia de α-Tocoferol<br/> Exposición a neurotoxinas<br/> Alzheimer<br/> Autismo<br/> Enfermedad de Parkinson<br/> Enfermedad de Huntington<br/> Distrofia muscular<br/> Síndrome de Rett<br/> Epilepsia<br/> Encefalomiелitis alérgica<br/> Sobredosis de aluminio<br/> Daño traumático<br/> Esclerosis múltiple</p> <p><b>Ojos</b><br/> Cataratogénesis<br/> Hemorragia ocular<br/> Retinopatía<br/> Daño degenerativo de retina<br/> Enfermedad de Eale<br/> Retinitis pigmentosa<br/> Conjuntivitis<br/> Uveítis<br/> Pterigión</p> |
|--|--|

**Tabla 2-2.** Trastornos clínicos en donde están involucradas especies reactivas

El deterioro oxidativo es provocado por el proceso conocido como “autooxidación”, es decir, la reacción espontánea del oxígeno con compuestos o moléculas en su forma reducida (capaces de ser oxidadas). Aún cuando la autooxidación es termodinámicamente posible su velocidad es extremadamente lenta, por lo que se requiere de un catalizador, generalmente iones metálicos.



Por otra parte este proceso se lleva a cabo mediante un mecanismo en cadena que implica reacciones con radicales libres y se desarrolla en tres etapas denominadas iniciación, propagación y terminación. (Gordon, 2001; Halliwell y Gutteridge, 2007). Un radical libre es cualquier especie que contiene uno o más electrones desapareados y es capaz de existir de manera independiente. En la mayor parte de los casos, estas especies son entidades altamente reactivas que tienen un tiempo de vida media menor de 1µs, y que se combinan para generar moléculas más estables. (Miranda, 2008; Halliwell y Gutteridge, 2007)

### 2.2.2. EL ESTRÉS OXIDATIVO

La reacción directa con el oxígeno en su estado fundamental (denominado estado triplete) no es posible químicamente más bien, el proceso de autooxidación puede iniciarse a partir de radicales de oxígeno y algunas especies no radicales derivadas del oxígeno y que en su conjunto se denominan especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Debido a que en los sistemas biológicos se pueden encontrar varios tipos de radicales libres (centrados en C, N, S, etc) el término especies reactivas (RS) se ha extendido para incluir especies reactivas de nitrógeno (RNS), cloro (RCS), bromo (RBS) y azufre. Estas especies se enlistan en la tabla 2-3.

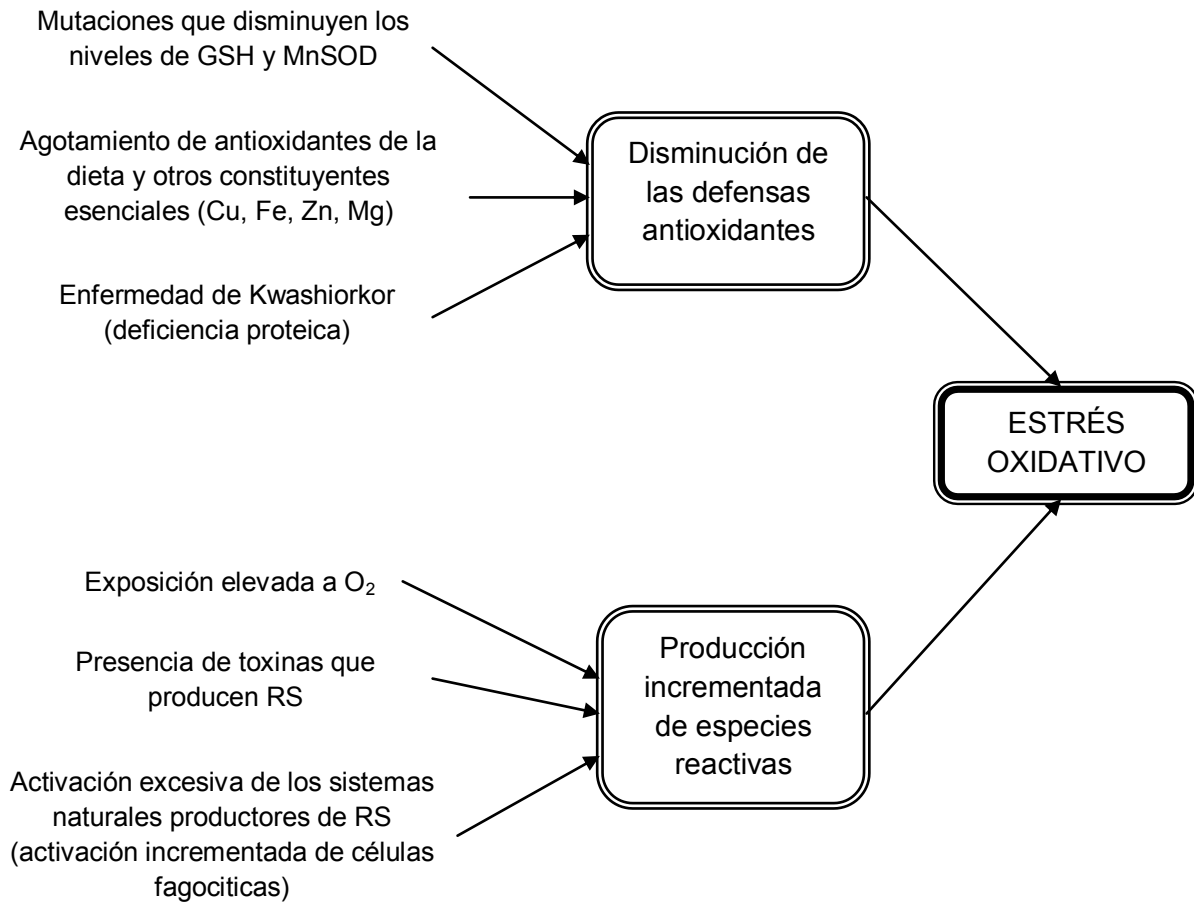
| RADICALES                           |                   | NO RADICALES           |                 |
|-------------------------------------|-------------------|------------------------|-----------------|
| Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) |                   |                        |                 |
| Superóxido                          | $O_2^- \cdot$     | Peróxido de hidrógeno  | $H_2O_2$        |
| Hidroxilo                           | $HO \cdot$        | Ácido hipobromoso      | $HOBr$          |
| Perhidroxilo                        | $HOO \cdot$       | Ácido hipocloroso      | $HOCl$          |
| Carbonato                           | $CO_3^- \cdot$    | Ozono                  | $O_3$           |
| Peroxilo                            | $ROO \cdot$       | Oxígeno singulete      | $O_2^1\Delta g$ |
| Alcoxilo                            | $RO \cdot$        | Peróxidos orgánicos    | $ROOH$          |
| Dioxido de carbono                  | $CO_2^- \cdot$    | Peroxinitrito          | $ONOO^-$        |
| Singulete                           | $O_2^1\Sigma g^+$ | Peroxinitrato          | $O_2NOO^-$      |
|                                     |                   | Ácido peroxinitroso    | $ONOOH$         |
|                                     |                   | Nitrosoperoxicarbonato | $ONOOCO_2^-$    |
|                                     |                   | Peroxomonocarbonato    | $HOOCO_2^-$     |

| RADICALES                                    |               | NO RADICALES              |                  |
|--|---------------|---------------------------|------------------|
| <b>Especies Reactivas de Nitrogeno (RNS)</b> |               |                           |                  |
| Oxido nítrico                                | $NO\bullet$   | Ácido nitroso             | $HNO_2$          |
| Dióxido de nitrógeno                         | $NO_2\bullet$ | Catión nitrosilo          | $NO^+$           |
| Nitrato                                      | $NO_3\bullet$ | Anión nitrosilo           | $NO^-$           |
|  |               | Tetraóxido de dinitrógeno | $N_2O_4$         |
|  |               | Trióxido de dinitrógeno   | $N_2O_3$         |
|  |               | Peroxinitrito             | $ONOO^-$         |
|  |               | Peroxinitrato             | $O_2NOO^-$       |
|  |               | Ácido peroxinitroso       | $ONOOH$          |
|  |               | Catión nitronium          | $NO_2^+$         |
|  |               | Alquilperoxinitritos      | $ROONO$          |
|  |               | Alquilperoxinitratos      | $RO_2ONO$        |
|  |               | Cloruro de nitrilo        | $NO_2Cl$         |
|  |               | Peroxiacetil nitrato      | $CH_3C(O)OONO_2$ |
| <b>Especies Reactivas de Cloro (RCS)</b>     |               |                           |                  |
| Cloro atómico                                | $Cl\bullet$   | Ácido hipocloroso         | $HOCl$           |
|  |               | Cloruro de nitrilo        | $NO_2Cl$         |
|  |               | Cloraminas                |                  |
|  |               | Gas cloro                 | $Cl_2$           |
|  |               | Cloruro de bromo          | $BrCl$           |
|  |               | Dióxido de cloro          | $ClO_2$          |
| <b>Especies reactivas de Bromo (RBS)</b>     |               |                           |                  |
| Bromo atómico                                | $Br\bullet$   | Ácido hipobromoso         | $HOBr$           |
|  |               | Gas bromo                 | $Br_2$           |
|  |               | Cloruro de bromo          | $BrCl$           |

**Tabla 2-3.** Especies Reactivas (Halliwell y Gutteridge, 2007)

Las especies reactivas son productos del metabolismo normal (fuentes endógenas) y de la exposición a xenobioticos (fuentes exógenas), juegan un papel esencial “in vivo” pues participan en la “regulación redox” de los procesos celulares (Circu y Yee Aw, 2010), no obstante un exceso de éstas induce modificaciones oxidativas de las macromoléculas celulares, induciendo un daño potencial que se conoce como daño oxidativo. En los organismos sanos los niveles de especies reactivas son controlados por sistemas de defensa antioxidante. Cuando el balance entre especies reactivas y antioxidantes se rompe, se llega a un estado conocido como estrés oxidativo.

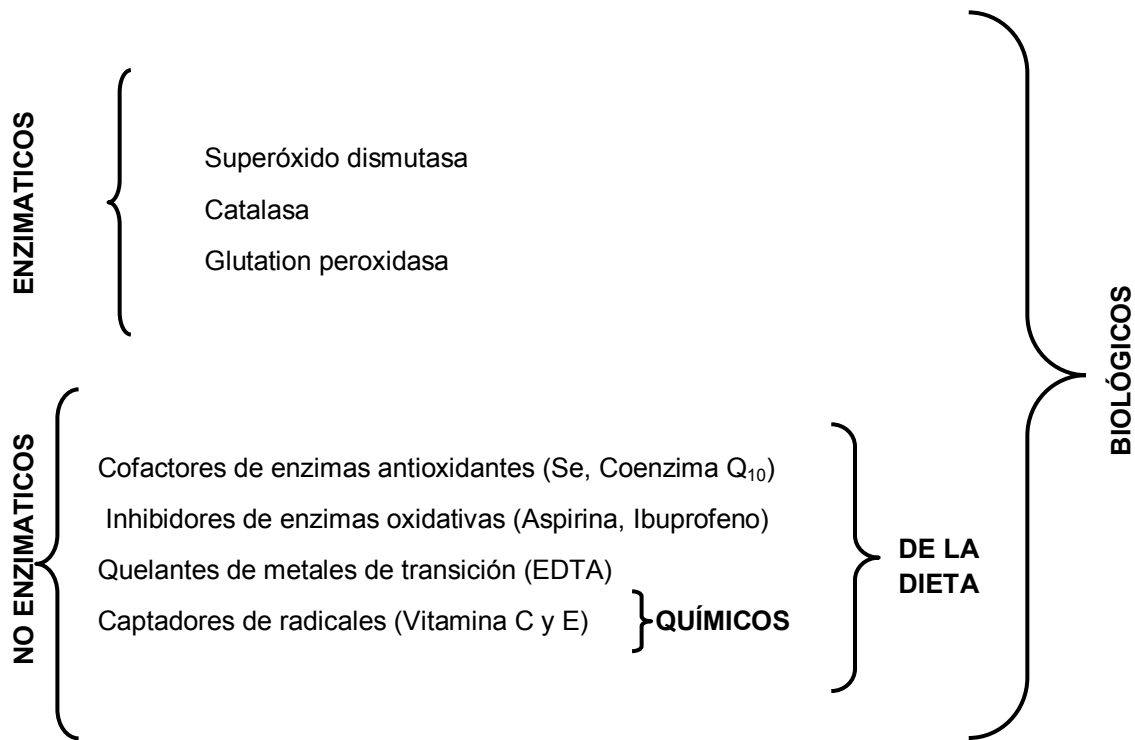
En principio el estrés oxidativo puede resultar de:



**Figura 2-3.** Ejemplos de causas del estrés oxidativo (Adaptado de Halliwell y Gutteridge, 2007)

### 2.2.3. DEFINICIÓN DE ANTIOXIDANTE

En la literatura podemos encontrar varias acepciones de la palabra “antioxidante”, pues dependiendo de la disciplina científica, el campo de aplicación y los blancos de protección de los antioxidantes son significativamente diferentes. A continuación se resume el alcance de los antioxidantes en tres áreas de interés.



**Figura 2-4.** Amplio alcance de los antioxidantes

En los alimentos y en los sistemas biológicos la acción antioxidante es la más compleja ya que aplican una gran variedad de mecanismos incluyendo inhibición de la reacción en cadena (captadores de radicales), captación de oxígeno, inhibición de oxígeno singulete, quelación de metales e inhibición de enzimas oxidativas.

Entonces una definición mecanística limitada sólo a la inhibición de la reacción en cadena puede excluir importantes antioxidantes en alimentos y biología. Por otro lado, una definición demasiado amplia de antioxidantes puede incluir también varios tipos de acción que pueden limitar el entendimiento e interpretación apropiada de los mecanismos antioxidantes. La evaluación valida de la capacidad antioxidante requiere por lo tanto el uso de diferentes métodos de ensayo (Frankel y Meyer, 2000).

De esta manera, declaraciones tales como “X es el mejor antioxidante” o “Y es un mejor antioxidante que Z” no significan nada a menos que el ensayo utilizado sea descrito.

Para efectos prácticos de este estudio y hacia donde está dirigido nuestro interés tomaremos a bien la definición de antioxidante dada por Halliwell y Gutteridge (2010) como “cualquier sustancia que retrasa, impide o suprime el daño oxidativo en una molécula blanco”, pues esta refleja la importancia de la metodología.

### 2.2.4. ANTIOXIDANTES DE FUENTES NATURALES

Debido a que los antioxidantes pueden ejercer efectos benéficos en la protección de alimentos contra el deterioro oxidativo y en la prevención de enfermedades encuentran aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, etc. Los antioxidantes empleados en las diferentes industrias pueden ser de origen natural o sintético. Por ejemplo, la adición de compuestos tales como galato de propilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado y butilhidroquinona terciaria han sido ampliamente utilizados industrialmente para controlar el deterioro oxidativo de los alimentos. Sin embargo, el uso de estos compuestos ha sido cuestionado debido a sus potenciales riesgos sobre la salud y su toxicidad.

Así pues, ha habido un creciente interés en la búsqueda de antioxidantes naturales y, desde 1980, al surgir en el mercado internacional la tendencia al consumo de productos saludables, representan una alternativa segura frente al uso de los compuestos sintéticos. (Wong et al, 2006; Yanishlieva, 2001; Pastene et al, 2009)

Las plantas y especies son uno de los blancos más importantes para la búsqueda de antioxidantes naturales y varios esfuerzos se han realizado para identificar los compuestos que pueden actuar como antioxidantes. Además, estos compuestos pueden tener aplicaciones en el campo de las formulaciones nutracéuticas e ingredientes funcionales. (Yanishlieva et al, 2006; Pastene et al, 2009; Espín et al, 2007)

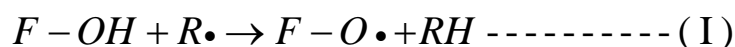
De los fitoquímicos mejor caracterizados presentes en los alimentos funcionales de origen vegetal los polifenoles han sido los más estudiados debido a su presencia ubicua y a su elevado consumo a través de la dieta. (Drago-Serrano et al, 2006; Pastene, 2009)

Los polifenoles son compuestos provenientes del metabolismo secundario de las plantas, químicamente se caracterizan por la presencia de al menos un anillo aromático sustituido con dos o más grupos hidroxilo (-OH), incluyen ácidos fenólicos, flavonoides, taninos y lignanos (Padilla et al, 2008; Halliwell y Guterridge, 2007; Pietta, 2000)

La mayoría de los compuestos fenólicos ejercen su efecto antioxidante *in vitro* inhibiendo la peroxidación lipídica al actuar como inhibidores de la reacción en cadena (chain-breaking) captando radicales peroxilo.

Los fenoles también pueden captar otras especies reactivas como HO•, NO<sub>2</sub>•, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ONOOH y HOCl, algunos pueden reaccionar con el O<sub>2</sub><sup>-</sup>•. Los fenoles con dos grupos -OH adyacentes u otras estructuras quelantes pueden unir iones metálicos (especialmente hierro y cobre) para dar, normalmente, formas pobremente activas en la formación de especies reactivas (Halliwell y Gutteridge, 2007)

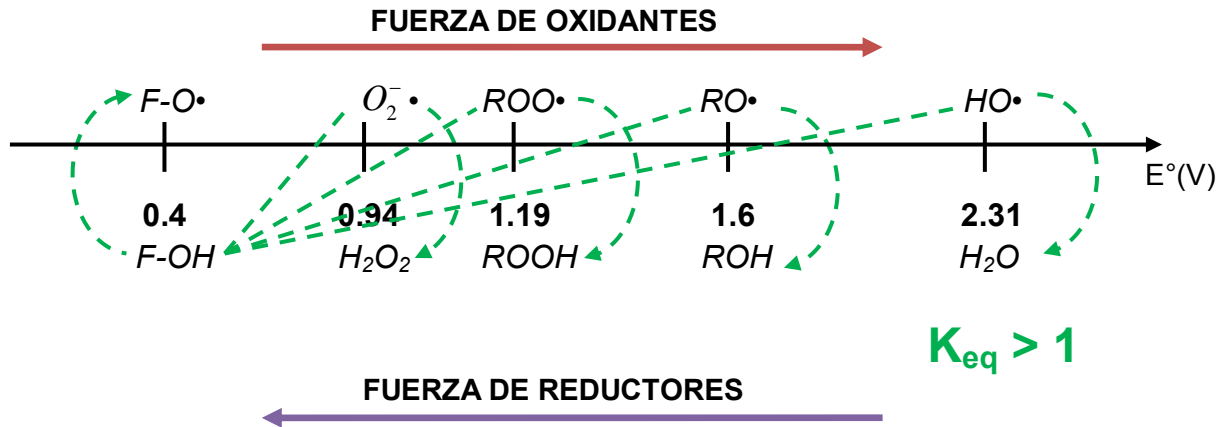
La reacción que implica la donación de un átomo de hidrógeno al radical (ecuación I) es posible debido al bajo potencial redox de los compuestos fenólicos (0.23 < E<sub>7</sub> < 0.75 V) implicados y por lo cual son termodinámicamente capaces de reducir radicales libres altamente oxidantes con potenciales redox en un rango de 2.31-1.0 V tales como el anión superóxido y los radicales peroxilo, alcoxilo e hidroxilo (Pietta, 2000). Por ejemplo, supongamos un compuesto fenólico (F-OH) con un potencial redox de 0.4 V, esquemáticamente podemos observar que las constantes de equilibrio son mayor a 1 para la reacción con cada uno de los radicales indicados (figura 2-5)



Donde;

F-OH: compuesto fenólico

R•: Radicales superóxido, alcoxilo o hidroxilo



**Figura 2-5.** Los potenciales redox del sistema  $\text{ROO}\cdot, \text{H}^+/\text{ROOH}$  se encuentran  $\sim 0.77\text{-}1.44$ . A manera de ejemplo se tomó el valor  $1.19\text{ V}$  que corresponde al sistema  $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot, \text{H}^+/\text{CCl}_3\text{OOH}$ . En todos los casos la  $K_{\text{eq}} > 1$ , por lo tanto, el compuesto fenólico ( $\text{F-OH}$ ) es capaz de reducir a los radicales superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ), alcoxilo ( $\text{RO}\cdot$ ) e hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ).

### 2.3. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Numerosos métodos se han utilizado para evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de diferentes alimentos y matrices biológicas de interés, sin embargo, estos generalmente son multifuncionales, por lo cual la capacidad y los mecanismos antioxidantes se ve afectada por varios factores como las condiciones de oxidación, la cinética y la composición del sistema, las propiedades de partición de los antioxidantes entre diferentes fases y su interfase y el estado físico del sustrato.

Dada la complejidad que conlleva tomar en cuenta todos estos factores utilizando un solo ensayo, es necesario que cada protocolo antioxidante se realice con varias condiciones de oxidación y con diferentes métodos de medición. (Frankel y Finley, 2008)

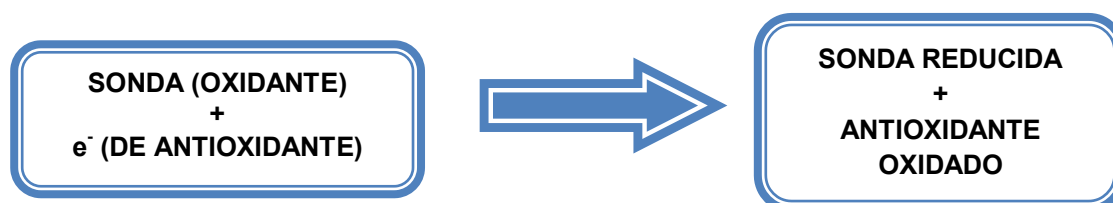
Con base en las reacciones químicas involucradas, los principales ensayos de capacidad antioxidante pueden dividirse a groso modo en dos categorías:

- 1) Ensayos basados en la reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno (TAH)

Este tipo de ensayos monitorean la reacción cinética competitiva y la cuantificación se deriva de las curvas cinéticas. Generalmente se componen de: Un generador sintético de radicales libres, una sonda molecular oxidable y un antioxidante.



2) Ensayos basados en la reacción de transferencia electrones (TE)  
 Involucran una reacción redox con el oxidante el cual también actúa como indicador del punto final de la reacción.



En la tabla 2-4 se señalan los principales métodos para determinar capacidad antioxidante de acuerdo a la categoría a la que pertenecen.

| Ensayos basados en la Transferencia de Átomo de Hidrógeno                            |  |
|--|--|
| Utilizan sondas moleculares  | Otros  |
| Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC)                                    | Inhibición de la oxidación del ácido linoleico                     |
| Ensayo blanqueamiento de la crocina  | Inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) |
| Parámetro antioxidante por atrapamiento de radicales peroxilo totales (TRAP)         | Inhibición de la captación de oxígeno (IOU)                        |
| Ensayos basados en transferencia de electrones                                       |  |
| Ensayo con el reactivo de Folin-Ciocalteu  |  |
| Capacidad antioxidante equivalente trolox (TEAC)                                     |  |
| Parámetro antioxidante por reducción del ion férrico (FRAP)                          |  |
| Ensayos del potencial antioxidante total usando Cu(II) como un oxidante              |  |
| Ensayo de la capacidad secuestradora del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) |  |



| Ensayos que miden la capacidad secuestradora de otras especies reactivas como: |
|--|
| Anión superóxido $O_2^- \cdot$   |
| Peróxido de hidrógeno $H_2O_2$   |
| Radical hidroxilo $HO\cdot$  |
| Oxígeno singulete $O_2^1\Delta g$  |
| Peroxinitrito $ONOO^-$   |

**Tabla 2-4.** Ensayos para determinar capacidad antioxidante *in vitro*

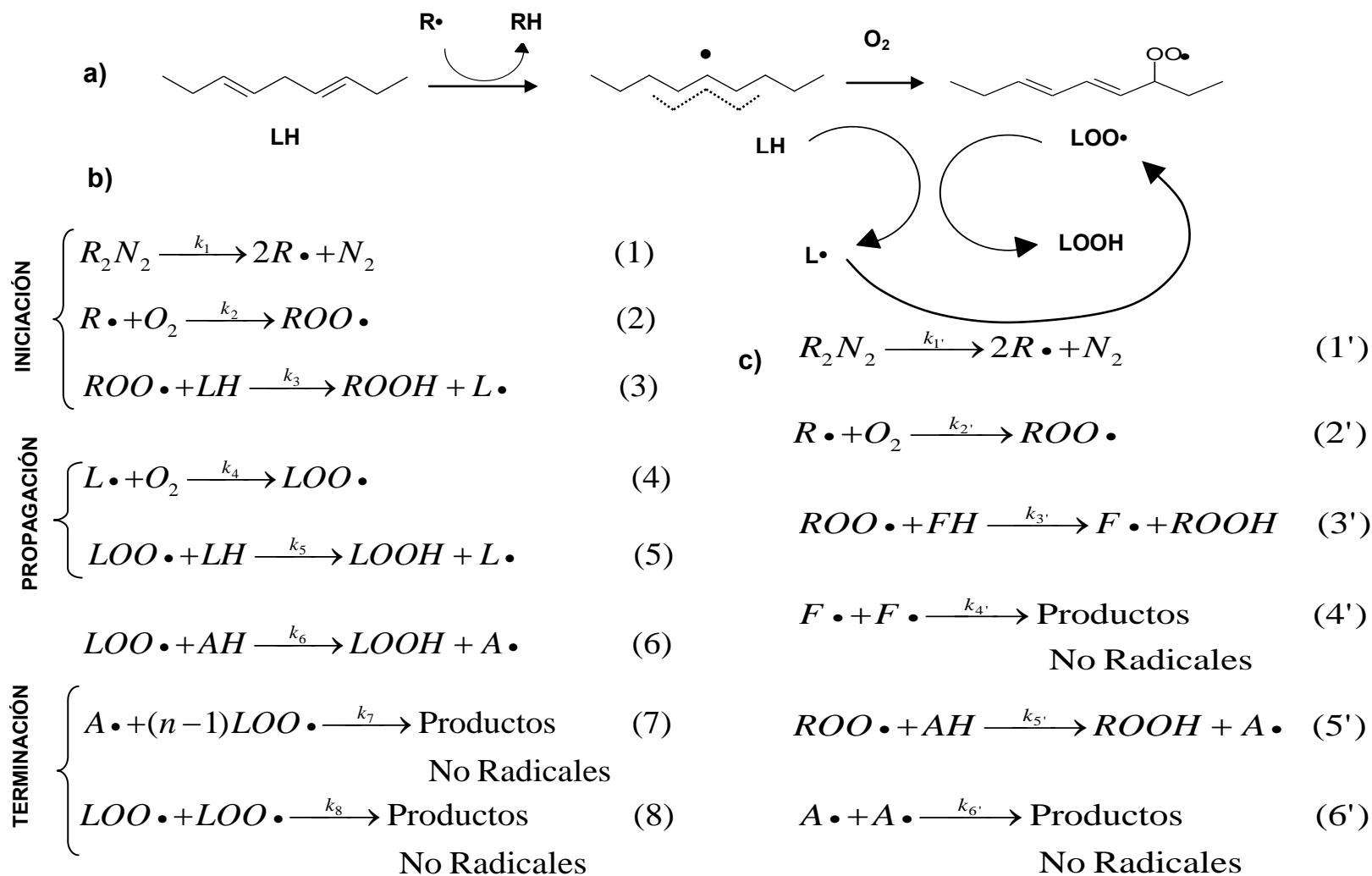
Ambos tipos de ensayo (TAH y TE) están diseñados para medir la capacidad secuestradora de radicales (oxidante) de una muestra dada. Por lo anterior resulta de importancia entender el mecanismo y cinética de la autooxidación y de su inhibición para tener una mayor comprensión de las metodologías aplicadas en este estudio.

### 2.3.1. AUTOOXIDACIÓN: MECANISMO Y CINÉTICA

Un mecanismo enormemente simplificado, pero que contiene los pasos esenciales del proceso en cadena principal ocurrido en la autooxidación, así como la acción de sus inhibidores se muestra en el esquema de reacciones representado en la figura 2-6.b.

Estas reacciones generalmente involucran un iniciador, es decir, una molécula que por descomposición genera radicales libres (reacción 1), los cuales reaccionan con el oxígeno para producir un radical peroxilo  $ROO\cdot$  (reacción 2) que establece el proceso en cadena al atacar un sustrato orgánico (LH) y producir el radical  $L\cdot$  (reacción 3).

En los alimentos y sistemas biológicos el mecanismo de autooxidación más ampliamente estudiado es la peroxidación lipídica que sufren los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) ya sea que estén presentes en forma de ácidos grasos libres o en ésteres de colesterol, triacilgliceroles y fosfolípidos.



**Figura 2-6.** a) Iniciación y propagación de la peroxidación lipídica de un AGPI. R• puede ser HO•, LOO•, LO•, L•, etc. b) Principales reacciones de la autooxidación y la acción de un inhibidor (reacción 6). R<sub>2</sub>N<sub>2</sub>=compuesto azo, LH=sustrato; AH=antioxidante. c) Reacciones principales involucradas en el ensayo ORAC. R<sub>2</sub>N<sub>2</sub>=2,2'-Azobis(2-amidinopropano)dihidrocloruro (AAPH), FH=Fluoresceína y AH=Antioxidante

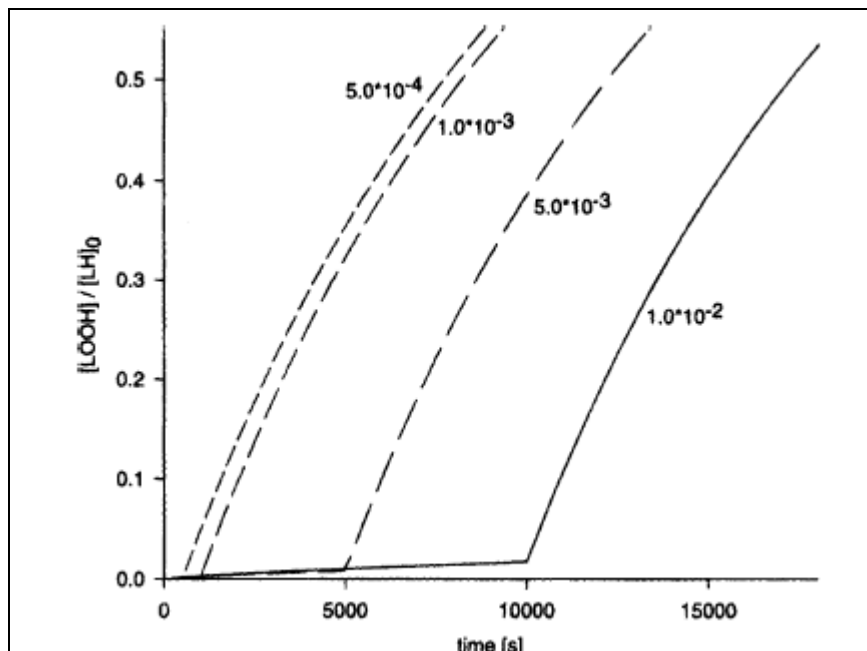
En la peroxidación lipídica una gran variedad de especies radicales como el hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ), peroxilo ( $\text{LOO}\cdot$ ), alcoxilo ( $\text{LO}\cdot$ ) o alquilo ( $\text{L}\cdot$ ) puede sustraer uno de los dos átomos de hidrógeno alílicos del átomo de carbono entre dos dobles enlaces del AGPI, este mecanismo se representa en la figura 2-6.a y corresponde a la reacción 3 en la figura 2-6.b (Krinsky, 1992; Gordon, 2001), cualquiera de los radicales antes mencionados hará las veces del radical  $\text{ROO}\cdot$  que fue generado por un iniciador azo ( $\text{R}_2\text{N}_2$ ), este tipo de compuestos son comúnmente utilizados en ensayos in vitro para medir capacidad antioxidante, pero no se encuentran en alimentos ni en sistemas biológicos (Frankel y Meyer, 2000)

El producto del ataque del radical sobre el ácido graso poliinsaturado es un radical pentadienel deslocalizado ( $\text{L}\cdot$ ) el cual reacciona extremadamente rápido con el oxígeno para formar un radical peroxilo  $\text{LOO}\cdot$ , este puede sustraer un átomo de hidrogeno de un ácido graso insaturado para producir otro radical libre ( $\text{L}\cdot$ ) y un peróxido ( $\text{LOOH}$ ). (Establecimiento de la reacción en cadena representado en la figura 2-6.a).

En el mecanismo descrito (figura 2-6.b) los portadores de cadena son  $\text{L}\cdot$  y  $\text{LOO}\cdot$  y el principal producto es  $\text{LOOH}$ . Hay dos radicales intermediarios,  $\text{R}\cdot$  y  $\text{ROO}\cdot$ , los cuales no son portadores de cadena pero son necesarios para la producción de estos. (Wright, 2004)

Si bien existen numerosos mecanismos de acción antioxidante (Krinsky, 1992), nuestro interés se centra en los antioxidantes inhibidores de la cadena, estos siguen un mecanismo de TAH, la fuerza conductora para la transferencia de un átomo de hidrógeno es la formación de un radical estable ( $\text{A}\cdot$ ) que no continua la reacción en cadena o continua con una eficiencia muy baja. (Ou et al, 2001)

En presencia de un antioxidante la peroxidación de los lípidos transcurre a una velocidad muy lenta lo cual provoca un período de latencia (llamado período de incubación, PI) el cual se puede distinguir como una fase lag en las curvas cinéticas para la inhibición de la autooxidación (figura 2-7). La duración de la fase lag es directamente proporcional a la concentración del antioxidante.



**Figura 2-7.** Curvas cinéticas simuladas de la autooxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en presencia de diferentes concentraciones de tocoferol (Abuja y Esterbauer, 1995)

La complejidad experimental y las limitaciones de monitorear directamente la cinética de reacción de la inhibición de la autooxidación de lípidos han conducido al desarrollo de métodos más convenientes para determinar la capacidad antioxidante de una muestra. Uno de estos métodos es precisamente el ensayo ORAC, en este se utiliza una reacción de formación de radicales pero sin el paso de propagación de la cadena (figura 2-6.c), el cual es un paso esencial en la autooxidación lipídica (Huang et al, 2005).

### 2.3.2. MÉTODO DE LA CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DEL RADICAL OXÍGENO (ORAC)

En el método ORAC el iniciador azo que generalmente se utiliza es el 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH), por termólisis este genera un radical centrado en carbono el cual reacciona con el oxígeno para dar un radical peróxilo reactivo. (Bisby et al, 2008)

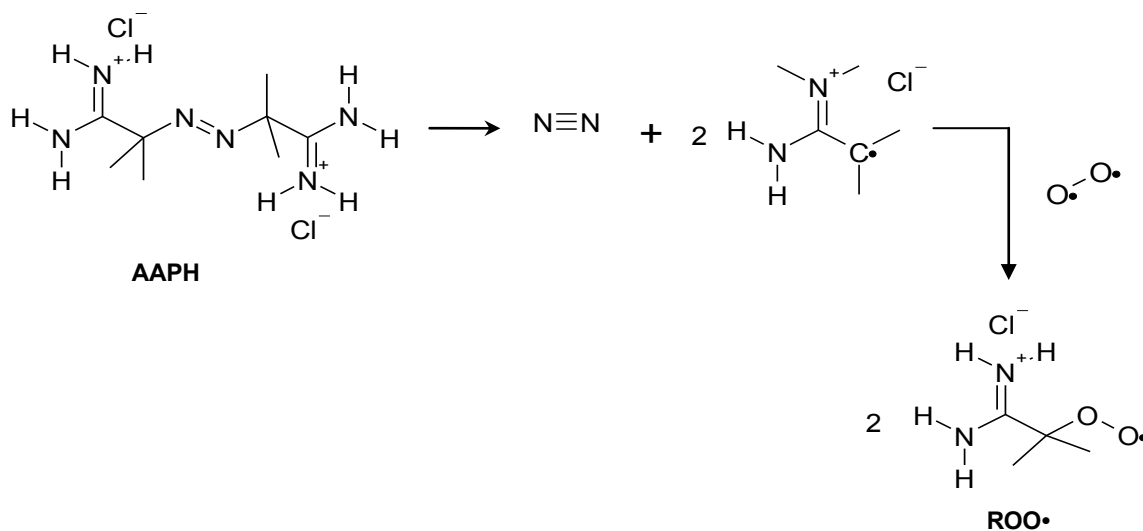


Figura 2-8. Formación de radicales peroxilo a partir de AAPH durante el ensayo ORAC

La fluoresceína reacciona con el radical  $ROO\cdot$  generado y da lugar a tres productos minoritarios fluorescentes (FL 1, FL 2 y FL 3) y un producto principal no fluorescente (FL 4)

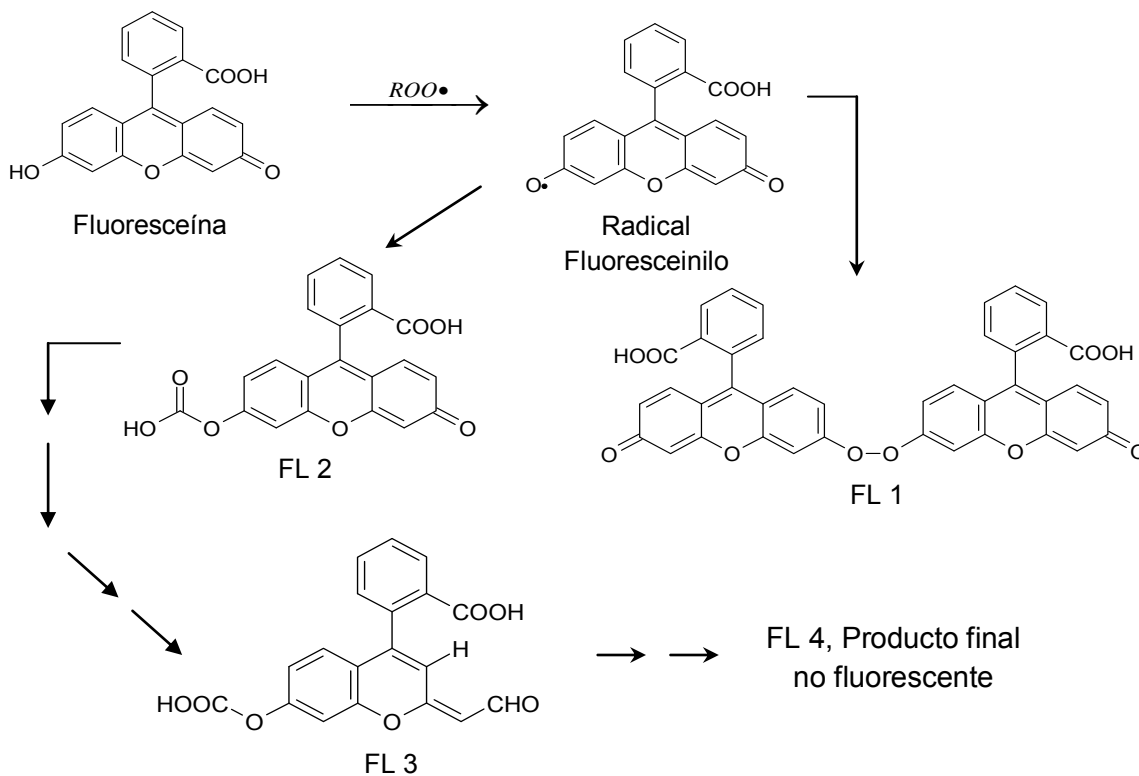


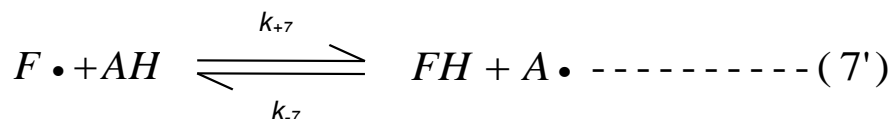
Figura 2-9. Posibles productos de oxidación de la fluoresceína (Ou et al, 2001)

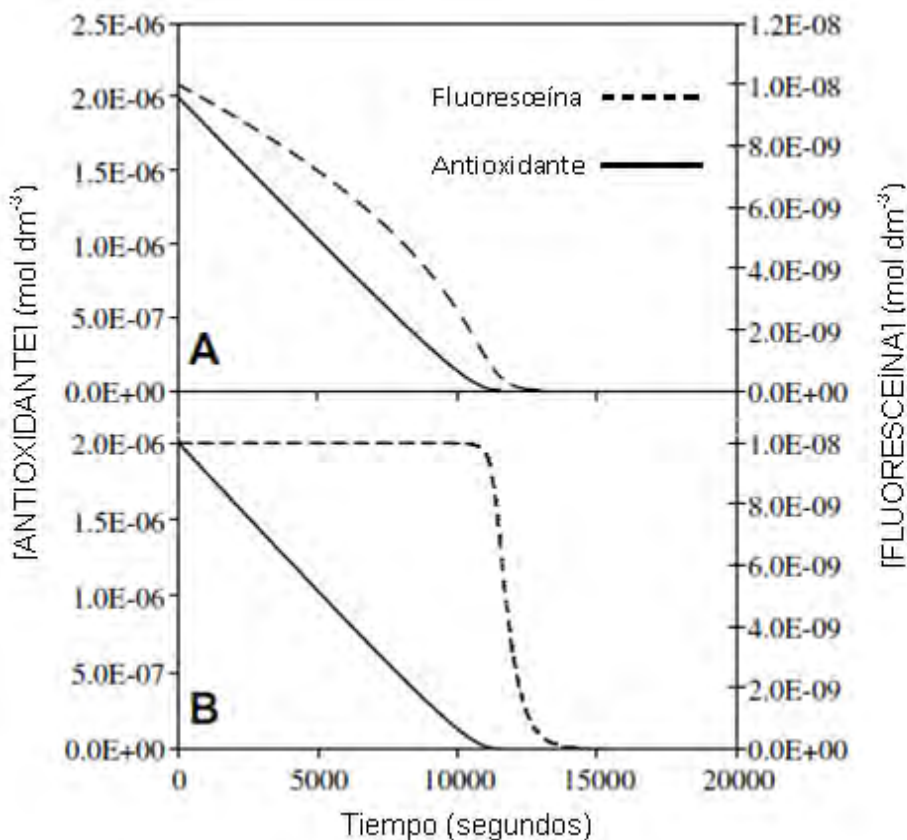
Originalmente, Cao y colaboradores (1993) utilizaron B-ficoeritrina (B-PE) como sonda fluorescente, sin embargo, debido a sus múltiples desventajas Ou et al (2001) propusieron a la fluoresceína como un indicador más confiable.

En presencia de un antioxidante, este dona su átomo de hidrógeno al ROO• mucho más rápido de lo que ROO• reacciona con la fluoresceína, es decir,  $k_5' \gg k_3'$  en el esquema de reacciones que se muestra en la figura 2-6.c y, por lo tanto, la formación del producto final FL 4 (no fluorescente) será más lenta, lo que se observara como una caída más paulatina de la fluorescencia hasta el momento en que se agote el antioxidante, entonces la caída será más rápida. La intensidad de la fluorescencia se sigue a través del tiempo y el área bajo la curva cinética nos permite hacer la cuantificación de la capacidad antioxidante.

En este ensayo la pérdida de la fluorescencia muestra una fase lag durante la cual la cinética ha sido descrita en términos de la reacción competitiva entre el radical peroxilo con la fluoresceína y el antioxidante. La fase lag es similar en carácter a la observada para la inhibición de la autooxidación por antioxidantes inhibidores de la reacción en cadena.

La cinética de la reacción competitiva ha sido ampliamente estudiada y el modelo que la describe ha sido propuesto utilizando el esquema de reacciones de la figura 2-6.c, no obstante, recientemente el modelo cinético utilizando sólo estas reacciones fue simulado por Bisby y colaboradores (2008) y no muestra una fase lag significativa, por ello, el esquema debe involucrar la reacción entre el radical fluoresceínilo y el antioxidante (ecuación 7') para observar dicha fase lag (figura 2-10) y por lo tanto contrasta con el ensayo competitivo tal como se utiliza en el blanqueamiento de crocina.





**Figura 2-10.** Curvas simuladas para el consumo de fluoresceína (FH) y antioxidante (AH). A) Progreso de las curvas usando las reacciones (1') – (6') (figura 2-6.c). B) Progreso de las curvas utilizando las reacciones (1') – (6') junto con la reacción (7')

Así entonces, las formas de las curvas involucradas en el ensayo ORAC reflejan la magnitud de la constante de equilibrio  $K_7$  (Bisby et al, 2008).

Si bien el ensayo ORAC ha mostrado tener algunas ventajas comparativas en relación a otros métodos también es cierto que posee ciertas limitantes. A continuación se listan algunas de sus ventajas y desventajas. (Tabla 2-5)

| VENTAJAS  | DESVENTAJAS   |
|---|---|
| <p>La cuantificación mediante el ABC permite utilizar este método tanto para muestras que exhiben fases lag marcadas como para aquellas que no la presentan</p> <p>Permite unificar el método que aplica para su cuantificación el tiempo de la fase lag (TRAP) y el que utiliza la velocidad inicial (Blanqueamiento de crocina)</p> <p>Utiliza radicales peroxilo con potenciales redox y mecanismos de reacción similar a los oxidantes fisiológicos</p> <p>Utiliza un pH fisiológico, de manera que el antioxidante reacciona con una carga total y un estado de protonación similar a como reaccionaría en el cuerpo</p> <p>El uso de marcadores fluorescentes aumenta la sensibilidad</p> | <p>Requiere tiempos largos para cuantificar resultados</p> <p>Las interferencias de la matriz pueden provocar que para muestras con capacidad antioxidante muy baja se requieran concentraciones relativamente altas para proporcionar un ABC medible</p> <p>Resulta complicado aplicar este método a muestras hidrofóbicas dado que la fluoresceína no es lo suficientemente liposoluble y su intensidad de fluorescencia en solventes no polares es bastante baja</p> |

**Tabla 2-5.** Ventajas y desventajas del ensayo ORAC

### 2.3.3. MÉTODO DE ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA) UTILIZANDO EL REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU

De entre los métodos que se basan en la transferencia de electrones el ensayo utilizando el reactivo de Folin Ciocalteu (RFC) es uno de los más populares.

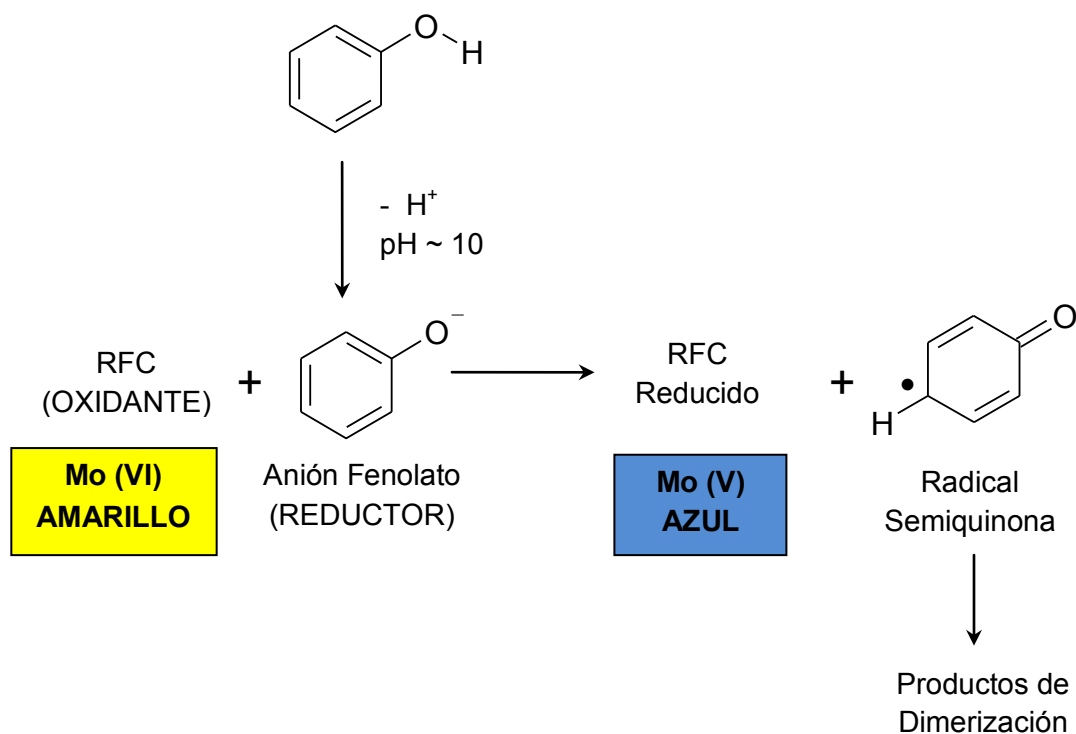
Para preparar el RFC se hierve por 10 horas una mezcla de tungstato de sodio ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), molibdato de sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), ácido clorhídrico concentrado, ácido fosfórico 85% y agua. Posteriormente se adiciona sulfato de litio ( $\text{LiSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )



para dar una solución de color amarillo intenso cuya naturaleza química exacta es desconocida, pero se cree que contiene heteropolitungstato-molibdatos.

Este método se basa en la reacción que se lleva a cabo al mezclar el RFC (sonda) con el antioxidante (compuesto estándar o muestra a ensayar), en la cual una secuencia de reacciones de reducción de uno o dos electrones ocurrirá entre el antioxidante (reductor) y el Mo(VI) (oxidante) conduciendo a la formación de especies que dan una coloración azul, posiblemente  $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$ . Se cree que el molibdeno es más fácilmente reducido en el complejo.

Evidentemente, el reactivo de Folin-Ciocalteu no es específico para compuestos fenólicos ya que puede ser reducido por compuestos no fenólicos (ej. Vitamina C, Cu(I), etc). Los compuestos fenólicos reaccionan con el RFC sólo bajo condiciones básicas (pH  $\sim$  10). La disociación del fenol, conduce a la formación del anión fenolato, el cual es capaz de reducir al RFC. Esto apoya la idea de que la reacción ocurre a través de un mecanismo de transferencia de electrones (figura 2-11)



**Figura 2-11.** Reducción del RFC por el anión fenolato (antioxidante)

Aunque existe la posibilidad de que se formen complejos entre los fenoles y los centros metálicos del complejo parece ser que los fenoles que son oxidados no tienen otro efecto que el de donar electrones. Los diferentes sustratos no parecen volverse parte del cromóforo azul y tampoco los productos parecen ser diferentes si son generados por diferentes sustratos. Esta conclusión se apoya en el hecho de que el espectro producido por diferentes sustratos es esencialmente el mismo.

Dada la amplitud de los picos de absorción que se obtienen para los productos de la reducción del RFC y el hecho de que otros componentes en muestras biológicas no absorben en esta región, el análisis puede realizarse en un rango amplio de longitudes de onda, generalmente se elige 760 nm para el ensayo con el RFC. (Huang et al, 2005; Singleton et al, 1999)

Este ensayo ha encontrado múltiples aplicaciones y la determinación espectrofotométrica resulta ser simple y conveniente, a pesar de su lentitud y las posibles interferencias de algunas sustancias que se encuentran en muestras complejas. Estos inconvenientes han conducido a que los métodos en lote sean adaptados para su uso en sistemas de flujo continuo, como el análisis por inyección en flujo, FIA) para mejorar su aplicabilidad.

Precisamente, un método FIA basado en la reacción con el RFC fue desarrollado y aplicado a muestras de vino por Celeste y colaboradores (1992). Ellos consiguieron un ahorro en el tiempo de análisis, 60 muestras/hora, además, dicho método es altamente tolerante hacia las interferencias más comunes en contraparte con el método en lote.

A continuación se tratarán brevemente algunos aspectos importantes de la técnica de análisis por inyección en flujo (FIA).

### 2.3.3.1. ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO

Desde que el concepto de análisis por inyección en flujo fue introducido por Ruzicka y Hansen en 1975 ha impactado enormemente la manera en como los procedimientos analíticos modernos son implementados.

Esta importante innovación metodológica se caracteriza por un fundamento simple, un manejo sencillo y cómodo y una gran capacidad para lograr resultados sorprendentes dadas sus características: rapidez, exactitud y precisión.

Los principios generales que definen el análisis por inyección en flujo son:

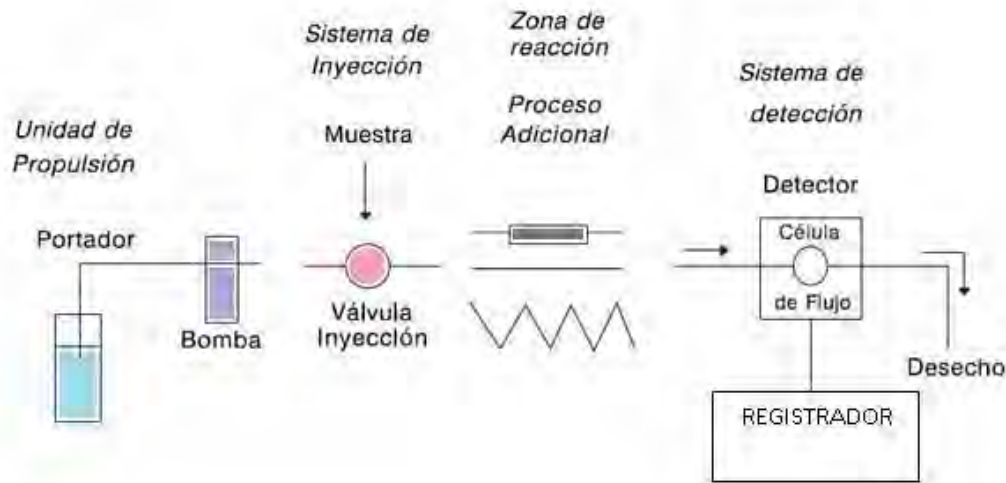
- El flujo no está segmentado por burbujas de aire, lo que constituye la diferencia fundamental con los métodos clásicos del análisis en flujo continuo (como el análisis en flujo segmentado, SFA)
- Un volumen de muestra líquida bien definido se inyecta o inserta directamente en el flujo en lugar de ser aspirado en el mismo
- Dispersión o dilución parcial del analito durante el transporte que realiza el bolo inyectado a través del sistema. Puede también tener lugar un proceso físico-químico adicional al transporte (reacción química, diálisis, extracción líquido-líquido, etc)
- La dispersión puede ser controlada ya que depende de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema (volumen de inyección, diámetro del tubo, longitud del tubo, caudal, etc)
- La creación de un gradiente de concentración a lo largo de todo el bolo inyectado, proporciona una señal transitoria pero estrictamente reproducible que es convenientemente registrada

- En el momento de la detección de la señal no se ha alcanzado el equilibrio físico (que supondría la homogeneización de una porción del flujo) ni el equilibrio químico (reacción completa). Por ello las técnicas FIA pueden considerarse dentro de los métodos cinéticos de análisis y en su modalidad de medida a tiempo fijo.
- El tiempo de operación debe ser muy reproducible pues las medidas se realizan en condiciones de no estabilidad y por tanto pequeñas variaciones del mismo pueden producir graves alteraciones de los resultados

Un esquema básico de un sistema FIA consta de las siguientes partes:

- a) Una unidad de propulsión, que establece un flujo de caudal lo más constante posible de una disolución (o de varias) que lleva disuelto un reactivo o hace de simple portador. Generalmente se trata de una bomba peristáltica, pero también puede ser un sistema de presión gaseosa, jeringas o bien la simple fuerza de la gravedad.
- b) Un sistema de inyección, que permita insertar o introducir en el flujo un volumen exactamente medido de la muestra con gran reproducibilidad de operación y sin interrumpir el mismo.
- c) Una zona de tubo, que se llama comúnmente “reactor”, y que es donde tiene lugar el transporte con o sin proceso adicional. Puede ser un tubo recto, en forma de serpentín, relleno o no de bolitas inertes, o bien tener una cámara de mezcla, un tubo relleno de material inerte o activo químicamente (redox, intercambio iónico, enzima inmovilizada, etc.).

- d) Una celda de flujo, incorporada a un instrumento de medida (colorímetro, fotómetro, fluorímetro, potenciómetro, etc.) que transduce la señal continua a un registrador y/o un microprocesador.



**Figura 2-12.** Componentes básicos de un sistema de análisis por inyección en flujo

Para sistemas de flujo continuo existe un régimen laminar en el transporte de materia a través de los tubos, el cual produce una zona bien definida del bolo de muestra inyectado, produciéndose un gradiente de concentración a lo largo de todo el bolo. En la figura 2-13 A se muestra la dispersión que sufre la muestra a lo largo de una configuración FIA, al ser un sistema continuo se obtiene una señal transitoria cuyo máximo corresponde a la parte del bolo menos diluida.

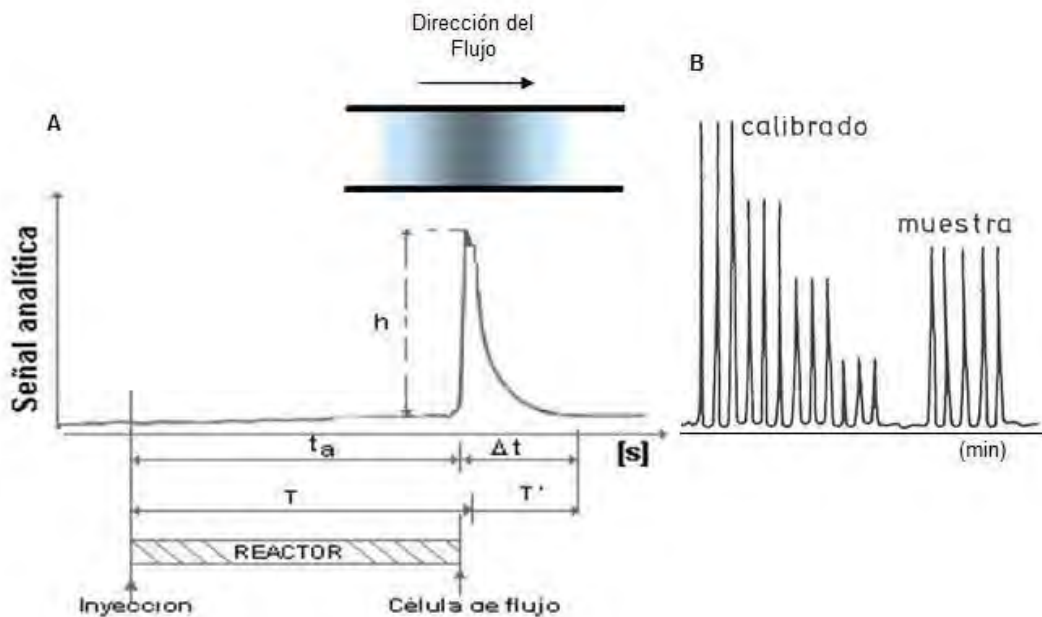
Existen dos mecanismos que contribuyen a la dispersión del bolo de muestra inyectado:

- El transporte por convección desarrollado en condiciones de flujo laminar. Este origina un perfil parabólico de velocidades, donde la velocidad lineal de las moléculas en las paredes del tubo es igual a cero, mientras que las moléculas que se encuentran en el centro del tubo viajan al doble de la velocidad media.
- El transporte por difusión debido a la formación de gradientes de concentración (horizontales y/o verticales) en diferentes momentos del transporte por convección.

Debido a esto es necesario establecer cuál es el tiempo de residencia más adecuado, siendo un parámetro difícil de decidir. Generalmente, la señal óptima es aquella en la que el transporte por convección y difusión influye de la misma manera, aunque evidentemente esta decisión dependerá de la reacción que se va a llevar a cabo.

La representación esquemática de la señal analítica en función del tiempo se conoce como fiagrama (figura 2-13 B) cuyas características esenciales son:

- a) La altura o área de pico,  $h$ , que se relaciona con la concentración del componente de la muestra inyectada
- b) El tiempo de residencia,  $T$ , que se define como el transcurrido desde la inyección hasta que se alcanza la máxima señal
- c) El tiempo de arranque,  $t_a$ , es el tiempo que pasa desde la inyección hasta que se inicia la “salida” de la línea de base de la señal
- d) El tiempo de retorno,  $T'$ , que es el tiempo comprendido entre el momento en que se alcanza la máxima señal y el instante en que la señal vuelve a la línea base
- e) Ancho de banda,  $\Delta t$ , se define como el período en el cual la señal sale y vuelve de nuevo a la línea base



**Figura 2-13.** A) Señal obtenida en una configuración FIA y parámetros que la definen. En la parte superior se muestra la dispersión que sufre el bolo de muestra en el tubo al pasar a lo largo de la configuración. B) Señal analítica en la que la escala de tiempo es en minutos (registro normal): Inyección de cuatro estándares por triplicado y de una muestra desconocida por quintuplicado

Las características del pico dependen de las características hidrodinámicas del sistema FIA, siendo difícil establecer un modelo teórico de la dispersión capaz de predecir el comportamiento de un bolo inyectado en una configuración FIA. (Cañizares, 2002; Valcarcel y Luque de Castro, 1984)

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 3.1. MATERIALES Y EQUIPOS

- Detector de fluorescencia PMT-FL FIALab
- Espectrofotómetro UV-Visible varian modelo Cary 3
- Horno de microondas focalizado Prolabo Maxidigest MX 350 de 300W
- Balanza analítica Explorer E12140 Ohaus con precisión  $\pm 0.1$ mg
- Baño ultrasónico Bransonic 2510R-MT
- Baño de calentamiento Lab-Line 18000
- Micropipeta Biohit Proline 100-1000  $\mu$ L
- Micropipeta Transferpette Brand 20-200  $\mu$ L
- Potenciometro Oakton
- Termómetro de -10 a 60°C
- Celdas de vidrio de 1cm
- Módulo de vidrio para Soxhlet
- Matraces volumétricos
- Pipetas volumétricas
- Vasos de precipitados
- Tubos de ensayo de 13 × 100 mm
- Tubos interno y externo de borosilicato para microondas

#### 3.2. REACTIVOS

- Vainillina 99% de pureza (Sigma-Aldrich)



- Ácido vainillico 97% de pureza (Sigma-Aldrich)
- 4-Hidroxibenzaldehído (Sigma-Aldrich)
- Ácido p-hidroxibenzoico (Sigma-Aldrich)
- Ácido cafeico (Sigma- Aldrich)
- Ácido gálico monohidratado 98% de pureza (Sigma-Aldrich)
- Ácido clorogénico 95% de pureza (Sigma-Aldrich)
- Ácido tánico reactivo A.C.S. (Sigma-Aldrich)
- Cafeína (Sigma-Aldrich)
- Teobromina pureza $\geq$ 98.0% (Fluka)
- Fluoresceína, ácido libre (Sigma-Aldrich)
- 2,2'-Azobis(2- metilpropianamidino) dihidroclorado 97% de pureza, (Sigma-Aldrich)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck)
- Fosfato de sodio dibásico heptahidratado (Mallinckrodt)
- Fosfato de potasio monobásico (Mallinckrodt)
- Fosfato de sodio dibásico heptahidratado 98.0-102.0%, (Sigma-Aldrich)
- Hidróxido de sodio (J.T. Baker)
- Alcohol etílico absoluto anhidro (J.T. Baker)
- Agua destilada

### 3.3. DISOLUCIONES

- a) Disolución amortiguadora de fosfatos (SAF).  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} / \text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05M, pH 7.0. El pH se ajustó con NaOH 0.1N. La disolución se almacenó en un

frasco de vidrio a 4°C y fue utilizada por un período no mayor a una semana verificando el pH cada tercer día.

- b) Disolución madre de fluoresceína. Se pesó una masa aproximada de 0.01g de fluoresceína se disolvió en 10 mL de etanol absoluto caliente y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL aforando con SAF (0.05 M, pH 7.0). La disolución se almacenó en un frasco de vidrio color ámbar para protegerla de la luz y se mantuvo en condiciones de refrigeración. La disolución de trabajo fue preparada diariamente tomando las alícuotas adecuadas y aforando con SAF para obtener una concentración de 0.03 mg/L.
- c) Disolución de 2,2'-Azobis(2-amidinopropano)dihidrocloruro (AAPH), 0.22 M. Esta disolución fue preparada cada día de trabajo pesando aproximadamente 599.3 mg del compuesto y aforando a 10 mL con SAF.
- d) Disolución madre de ácido cafeico. Se prepararon dos disoluciones madre de ácido cafeico. Se pesó una masa aproximada de 0.01 g y 0.025 g de ácido cafeico para preparar disoluciones de 100 mg/L y 250 mg/L respectivamente. Estas cantidades se disolvieron en 10 mL de etanol absoluto y posteriormente se aforaron a 100 mL con agua destilada.
- e) Disolución madre de vainillina. Se pesó una masa aproximada de 0.01 g de vainillina la cual se disolvió en 10 mL de etanol absoluto y se aforo a 100 mL con agua destilada.
- f) Disoluciones madre de compuestos fenólicos y xantinas. Se prepararon disoluciones de los ácidos vainillico, p-hidroxibenzoico, gálico, tánico y clorogénico; así como de p-hidroxibenzaldehído, teobromina y cafeína a una concentración de 100 mg/L, para ello se pesó una masa aproximada de 0.01 g del compuesto de interés aforando con agua destilada, el AV, Aphb y pHBA fueron previamente disueltos en 10 mL de etanol absoluto.

Todas las disoluciones madre mencionadas en los incisos **d** a **f** se almacenaron en frascos de vidrio a 4°C por un período no mayor a una semana y se utilizaron para preparar los estándares a las concentraciones requeridas tomando las alícuotas adecuadas y aforando con SAF los estándares destinados a realizar los ensayos del método ORAC y con agua destilada para el método con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

- g) Disoluciones de hidróxido de sodio. Se pesaron aproximadamente 0.2 g y 5 g de NaOH, se disolvieron y aforaron a 500 mL y 250 mL cada una de estas masas para preparar disoluciones 0.01 N y 0.5 N respectivamente. Ambas se almacenaron en frascos de plástico a 4°C para utilizarlas posteriormente en las configuraciones FIA: 0.01N, para la determinación de vainillina como disolución acarreadora y medio de hidrólisis y 0.05N como segundo reactivo en lo que respecta a la determinación de la capacidad antioxidante con el reactivo de Folin-Ciocalteu.
- h) Disolución de Folin-Ciocalteu (RFC). Se realizó una dilución 1:10 con agua destilada para ser utilizada como reactivo en la configuración FIA para la determinación de la capacidad antioxidante por este método.

Todas las disoluciones que se utilizaron en alguna de las configuraciones FIA fueron previamente sonicadas en un baño ultrasónico.

### 3.4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE VAINILLA

Para realizar las extracciones se utilizaron dos tipos de vainas: a) vainilla zacatillo (vainas de segunda calidad) proveniente de la región de Ayotoxco localizada en la Sierra de Puebla y b) vainilla comercial (Calidad Gourmet); se cortaron para obtener trozos de un tamaño aproximado de 2×2 mm. No se aplicó ningún tipo de tratamiento previo a la extracción, excepto para una muestra de vainas zacatillo, la cual se llevó a peso constante introduciéndola en un horno de secado. Esto se realizó por duplicado.

### 3.4.1. MÉTODO DE SECADO

Se pesó un vaso de precipitados de 100 mL tapado con papel aluminio y posteriormente se colocó en la estufa a  $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas, transcurrido este tiempo se sacó de la estufa y se dejó enfriar a temperatura ambiente en un desecador y se pesó nuevamente, este procedimiento se repitió hasta tener un peso constante.

Con el vaso a peso constante se pesó aproximadamente 1 g de picadura de vainas zacatillo, registrándose el peso de la muestra en el vaso y con la tapa puesta. Posteriormente se colocó el vaso con la muestra en la estufa y se retiró la tapa, donde se mantuvo a  $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas, al término de este período de tiempo rápidamente se colocó la tapa al vaso y se introdujo a un desecador donde se dejó enfriar a temperatura ambiente al menos 1 hora, después se pesó nuevamente. El procedimiento se repitió hasta que la pérdida de masa entre dos pesadas sucesivas fue menor a 0.005 g o hasta que hubo una ganancia de masa. (Jiménez Martínez, 2007)

El contenido de humedad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de humedad} = \left[ \frac{(M - D)}{(M - T)} \right] \times 100$$

Donde:

M = masa de la muestra húmeda con el vaso y la tapa

D = masa de la muestra seca con el vaso y la tapa

T = masa del vaso con la tapa secos

Para obtener los extractos se aplicaron los dos métodos descritos por Longares y Cañizares, 2006.

### 3.4.2. MÉTODO CONVENCIONAL (MNX-FF-1996-SCFI)

Se pesó aproximadamente 1 g de picadura de vainas de vainilla y se colocó en un matraz de 10 mL. Se adicionaron 2 mL de etanol y 1 mL de agua y se dejó macerar durante 12 horas. Se añadieron 2 mL de etanol, mezclando vigorosamente todo el contenido y se dejó macerar durante 3 días más. La disolución se filtró, compactando firmemente los sólidos y lavándolos lentamente con una disolución al 50% de etanol hasta llegar a un volumen de 10 mL.

### 3.4.3. EXTRACCIÓN ASISTIDA CON MICROONDAS FOCALIZADAS (EAMF)

Se pesó aproximadamente 1 g de picadura de vainas de vainilla y se colocaron en un tubo de vidrio de un diámetro aproximado de 3 cm, se agregaron 25 mL de disolución de etanol, se adaptó un refrigerante y se introdujo este sistema en otro tubo de vidrio de mayor diámetro (D=4cm), este arreglo se colocó en el horno de microondas y se programaron los tiempos de irradiación y no irradiación.

En la tabla 3-1 se muestran los parámetros óptimos para la extracción.

|                                   |            |
|-----------------------------------|------------|
| <b>No. de ciclos</b>              | 20         |
| <b>Potencia</b>                   | 50% (150W) |
| <b>Disolución de etanol</b>       | 70%        |
| <b>Tiempo de Irradiación</b>      | 1 min      |
| <b>Tiempo de no irradiación</b>   | 3 min      |
| <b>Tiempo total de extracción</b> | 80 min     |

**Tabla 3-1.** Parámetros óptimos para la EAMF (Longares y Cañizares, 2006)

### 3.5. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE CACAO

Se pesó aproximadamente 0.5 g de grano de cacao descascarillado y molido, se transfirió a un tubo colector (diámetro aproximado de 3 cm) de microondas y se adicionaron 90 mL de agua destilada y 5 mL de reactivo de Carrez I.

Se establecieron las condiciones del equipo: potencia 210 W y tiempo de irradiación 5 min. Después de la extracción se enfrió la disolución y se adicionó  $\text{NaHCO}_3$  hasta

que se formó un precipitado. Se filtró la disolución a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con agua destilada. (González Nuñez, 2010).

### 3.6. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE CAFÉ

Se midió un volumen de 20 mL de una disolución de metanol al 70% y se calentó en un baño de agua hasta que alcanzó una temperatura de 70°C, cuando esto ocurrió se agregó 1 g de café (verde o tostado) y se agitó durante 10 minutos (manteniendo el control de la temperatura), transcurrido este tiempo la disolución se filtró lavando varias veces los residuos de café. Esta disolución se aforo a 25 mL en un matraz volumétrico, se tomo una alícuota de 10 mL y se colocó en un vaso de precipitados, después se le adicionó 1 mL del reactivo de Carrez I y 1 mL del reactivo de Carrez II, transcurridos 5 minutos se vuelve a filtrar la disolución y se afora a 10 mL. (Salinas y Cañizares, proyecto alterno)

A continuación se describe la preparación de los reactivos de Carrez I y II utilizados para la obtención de los extractos de café y cacao.

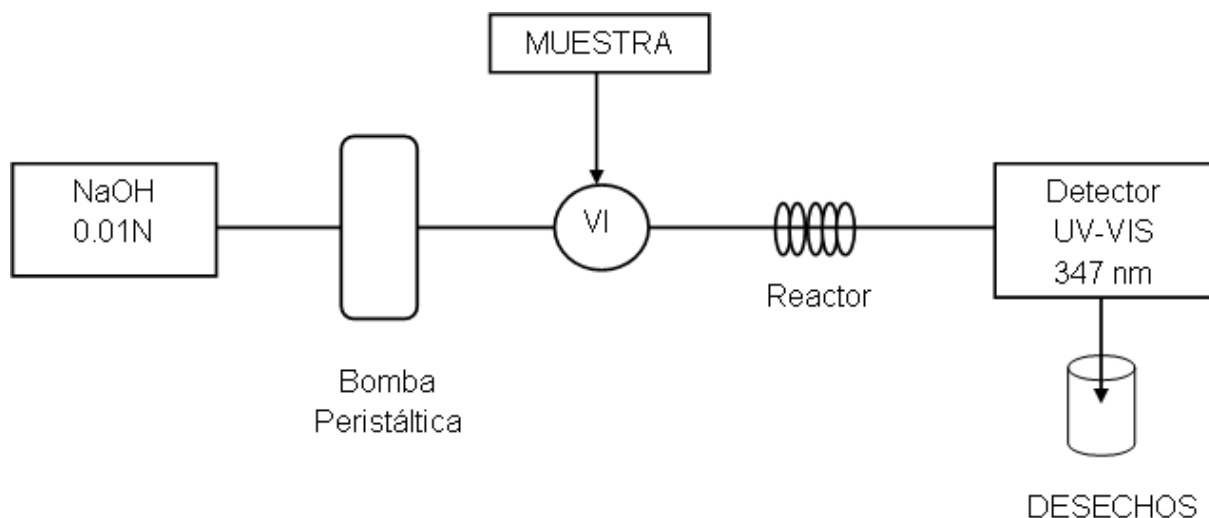
Reactivo de Carrez I: Se pesó aproximadamente 24 g de acetato de zinc, se disolvió con 50 mL de agua destilada y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL, se adicionaron 3 mL de ácido acético y se llevó al aforo con agua destilada.

Reactivo de Carrez II: Se pesó aproximadamente 15 g de ferrocianuro de potasio y se disolvió en 50 mL de agua destilada, se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevo al aforo con agua destilada.

Tanto el extracto de cacao como los de café fueron obtenidos por otros analistas bajo las mismas condiciones de laboratorio (material de vidrio, reactivos y equipo) bajo las cuales se determinó su capacidad antioxidante durante la realización de este trabajo en proyectos alternos al mismo.

### 3.7. DETERMINACIÓN DE VAINILLINA EN LOS EXTRACTOS DE VAINILLA

Para determinar el contenido de vainillina en los extractos se utilizó la siguiente configuración FIA.



**Figura 3-1.** Configuración FIA para determinar la concentración de vainillina en los extractos (Valdez y Cañizares, 2007)

Las variables FIA utilizadas en este estudio se presentan en la tabla 3-2.

| VARIABLE             | VALOR ÓPTIMO |
|----------------------|--------------|
| Caudal               | 1.0 mL/min   |
| Volumen de Inyección | 100 $\mu$ L  |
| Longitud del Reactor | 100 cm       |
| Concentración NaOH   | 0.01N        |

**Tabla 3-2.** Parámetros óptimos para la determinación de vainillina (Valdez y Cañizares, 2007)

### 3.8. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ORAC

Se siguió la metodología ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity, por sus siglas en inglés) empleando fluoresceína como sonda fluorescente (Zulueta et al, 2009).

En un tubo de ensayo de 13×100 mm se colocaron 2 mL de fluoresceína (FL) 0.03 mg/L y 2 mL del blanco (SAF, 0.5 M, pH 7.0), estándar (ácido cafeico) o muestra, se preincubaron en un baño de calentamiento a 37°C durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se añadió 1 mL de 2,2'-Azobis(2-amidinopropano)dihidrocloruro (AAPH) 0.22 M para comenzar la reacción, se midió la intensidad de fluorescencia tomándose esta lectura como tiempo cero, el tubo se colocó nuevamente en el baño

hasta que se volvió a medir la señal, esta medición se realizó cada 5 minutos hasta que la intensidad de la fluorescencia decayó un 20% de la señal inicial. Para ello se utilizó un detector de fluorescencia PMT-FL FIALab con filtros de emisión y excitación de 500 nm y 486 nm, respectivamente. Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado para cada muestra.

El manejo de los datos obtenidos por este método se llevó a cabo mediante:

- 1) Cálculo del área bajo la curva cinética (ABC) y el área bajo la curva neta ( $ABC_{NETA}$ ),
- 2) Obtención de una curva de calibración de ácido cafeico, y
- 3) Cálculo de los equivalentes de ácido cafeico para cada muestra usando la curva de calibración del paso anterior

Para calcular el ABC se utilizó el método de los trapecios, el cual supone el trazo de trapecios bajo la función y cuyas bases estarán definidas por una partición del intervalo de integración y cuyas dos alturas se toman como los valores de la función en los extremos izquierdo y derecho de cada subintervalo (Mochón, 1994). En la figura 3-2 se muestra gráficamente este método.

Y se puede resumir con la siguiente fórmula:

$$ABC = \left( \frac{(y_0 + y_5)}{2} \times 5 \right) + \left( \frac{(y_5 + y_{10})}{2} \times 5 \right) + \dots + \left( \frac{(y_{n-5} + y_n)}{2} \times 5 \right)$$

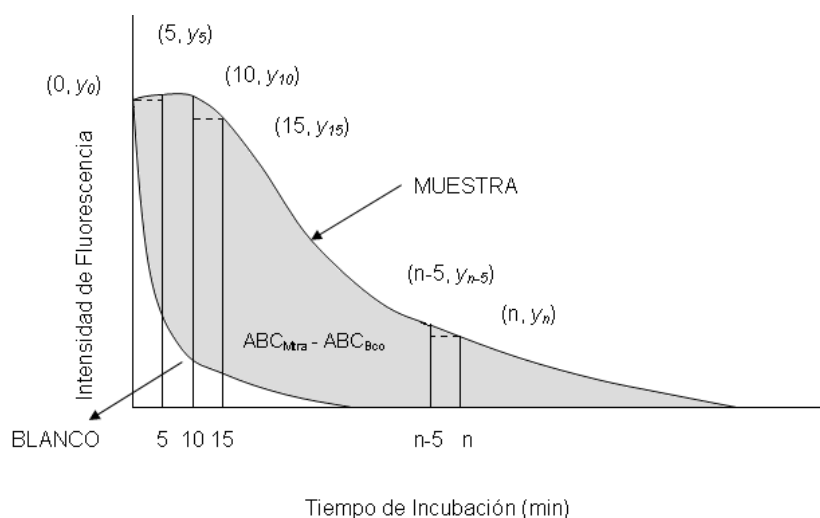
en donde  $y_0$  es la lectura de la fluorescencia inicial y  $y_5, y_{10}, y_{n-5}, \dots, y_n$  corresponden a la lectura de la fluorescencia a los diferentes tiempos de incubación, 5, 10,  $n-5$ , ...,  $n$  minutos.

Para calcular el área de los trapecios se multiplica la base por el promedio de sus dos alturas, en la fórmula el valor de la base corresponde a cada subintervalo en que se parte el intervalo de integración, en este caso 5, que es el tiempo (minutos) en que se toma cada lectura.



El  $ABC_{NETA}$  se calcula de la siguiente forma (área gris en la figura);

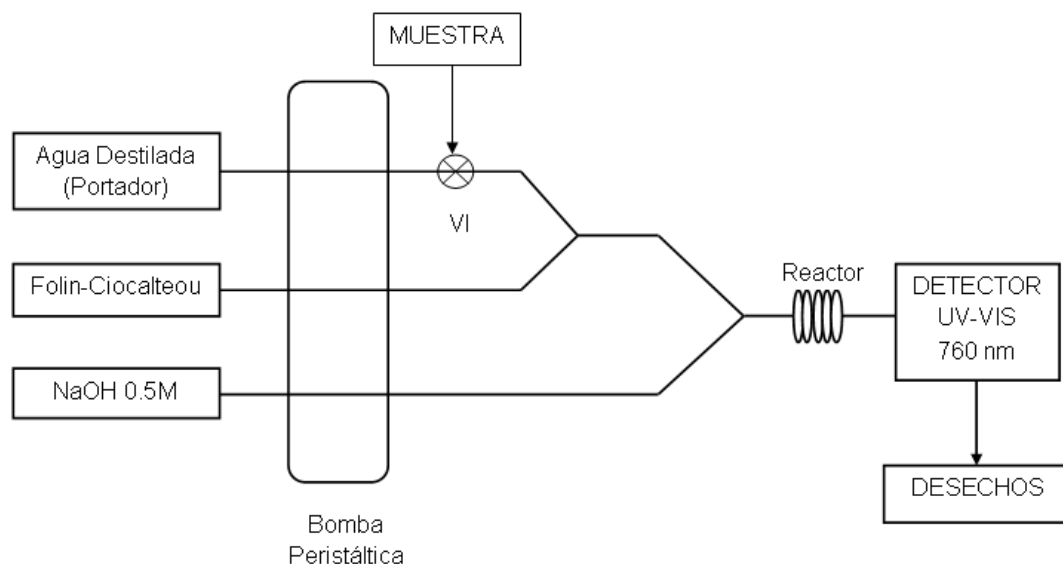
$$ABC_{NETA} = ABC_{ANTIOXIDANTE} - ABC_{BLANCO}$$



**Figura 3-2.** Aproximación de la integral (ABC), usando trapezoides formados por los dos valores de la función en los extremos del subintervalo ( $\Delta x=5$  min).

### 3.9. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE CON EL REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU

En la figura 3-3 se presenta la configuración FIA utilizada. Se hizo circular el agua destilada (portador), el reactivo de Folin-Ciocalteu (10%) y el NaOH 0.5 M a un caudal de 0.8, 1.0 y 1.0 mL/min respectivamente. La longitud del reactor fue de 200 cm y el volumen de inyección de 100  $\mu$ L. Se midió la absorbancia a 760 nm mediante un espectrofotómetro UV-VIS acoplado al sistema FIA. Se realizaron dos curvas de calibración utilizando como estándar ácido cafeico (5-100 mg/L) y vainillina (5-20 mg/L). El análisis de los extractos se llevó a cabo después de realizar la dilución apropiada con agua destilada. Cada muestra se inyectó por triplicado en el sistema.



**Figura 3-3.** Configuración FIA utilizada para determinar la capacidad antioxidante de muestras mediante la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteou en medio básico (Celeste et al, 1992)

### 3.10. MÉTODOS DE BENEFICIO DE VAINILLA

Se determinó la capacidad antioxidante a extractos obtenidos de vainas de vainilla a las que se les aplicó el método de beneficio tradicional como se indica a continuación.

Tratamiento de marchitado tradicional: El marchitado tradicional de las vainas se realizó por inmersión en agua a 60°C durante 3 min (para una de las muestras este tiempo se aumento a 6 min).

A una muestra además del marchitado tradicional se le adicionó un paso de posmarchitado que consistió en aplicar radiación ultrasónica a las vainas por 10 min a 38°C.

En otra muestra el marchitado tradicional se sustituyo por marchitado en horno de microondas, las vainas previamente humedecidas se colocaron en el plato del horno y se le aplicaron radiaciones durante 20 segundos, entonces se dejaron reposar por 3 min. Después de este paso se adicionó un posmarchitado con radiación ultrasónica por 10 min a 38°C.

Para cada uno de estos tratamientos las etapas de sudado, secado y acondicionado se redujeron a envolver las vainas tratadas en bolsas de polietileno de alta densidad y colocarlas en una estufa a 38°C dejándolas ahí por un período de tiempo de 10, 20 o 30 días antes de realizar los extractos. (Pacheco, 2009)

#### 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

##### 4.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE VAINILLA Y DETERMINACIÓN DE VAINILLINA

En la tabla 4-1 se indican las características observadas para los dos tipos de vainas empleadas para la obtención de los extractos utilizados para determinar la capacidad antioxidante de la vainilla.

| VAINA   | CARACTERÍSTICAS  |
|---|--|
| <b>Zacatillo (Ayotoxco, Puebla)</b>             | Su tamaño varía desde 9 cm hasta incluso 17 cm, su longitud promedio es de 11 cm, color café oscuro con tonalidades más claras, apariencia rugosa, algunas tienen partes abiertas y secas, sus diámetros no son uniformes, pues algunas partes están más aplanadas que otras, algunas están dobladas o troceadas |
| <b>Comerciales Gourmet (Papantla, Veracruz)</b> | Longitud promedio de 15 cm, color café muy oscuro, brillosas, textura aceitosa, aspecto firme y grueso, sin defectos ni manchas  |

**Tabla 4-1.** Propiedades físicas de las vainas Zacatillo y Comerciales

De acuerdo al tipo de vaina y a los dos métodos de extracción utilizados, se pueden dividir los extractos obtenidos en cuatro categorías diferentes. En la tabla 4-2 se indica la simbología y el número de extracciones independientes para cada una de las categorías.

| MÉTODO DE EXTRACCIÓN | TIPO DE VAINA                   |                          |                    |
|----------------------|---------------------------------|--------------------------|--------------------|
|                      | Vainilla Zacatillo (sin secado) | Vainilla Zacatillo seca  | Vainilla Comercial |
| EAMF                 | EAMFZ(n=3)                      | EAMFZ <sub>s</sub> (n=2) | EAMFG (n=2)        |
| MO                   | MOZ (n=3)                       | -----                    | -----              |

**Tabla 4-2.** Simbología utilizada para cada categoría. EAMFZ: Extractos obtenidos aplicando Energía de Microondas Focalizadas (EMF) a las vainas zacatillo sin tratamiento previo de secado, EAMFZ<sub>s</sub>: extractos obtenidos aplicando EMF a las vainas zacatillo sometidas a secado previo, EAMFG: extractos obtenidos mediante la EAMF de vainas comerciales (gourmet), MOZ: Extractos obtenidos aplicando el método oficial (MO) a las vainas zacatillo sin secar, no se obtuvieron extractos por este método con las vainas Zacatillo secas ni con las comerciales.

El contenido de humedad para cada una de las muestras de vaina zacatillo secadas en estufa para obtener los extractos independientes EAMFZ<sub>s</sub>-1 y EAMFZ<sub>s</sub>-2 fue 27.55 y 27.00 % respectivamente, el contenido de humedad promedio fue 27.27%.

Con los parámetros óptimos señalados en la sección 3.7 se obtuvo la ecuación  $y = 0.0143(\pm 0.0008)x + 0.0193(\pm 0.0048)$  para el intervalo lineal de 1 a 10 mg/L de vainillina con un coeficiente de correlación de 0.9993. En la figura A del anexo, se presenta el fiagrama que se utilizó para generar dicha ecuación. Con esta curva de calibración se obtuvieron las concentraciones de vainillina para cada uno de los extractos obtenidos, los valores promedio para cada categoría expresados como porcentaje de vainillina (g de vainillina por cada 100 g de muestra) se presentan en la tabla 4-3.

| <b>MUESTRA</b>           | <b>% VAINILLINA</b> |
|--------------------------|---------------------|
| <b>EAMFZ</b>             | 1.16 ± 0.03         |
| <b>EAMFZ<sub>s</sub></b> | 0.57 ± 0.03         |
| <b>MOZ</b>               | 0.62 ± 0.01         |
| <b>EAMFG</b>             | 1.81 ± 0.02         |
| <b>Verde</b>             | 0.27                |

**Tabla 4-3.** Concentración de vainillina expresada en porcentaje

Se observa que la concentración más alta de vainillina se obtuvo para la EAMF aplicada a las vainas comerciales Gourmet, las cuales presentan mejores atributos de calidad conforme a las características observadas que se muestran en la tabla 4-1.

#### 4.2. IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO ORAC

Para implementar la metodología de forma manual se incrementaron 40 veces los volúmenes de fluoresceína, blanco, estándar y muestra propuestos por Zulueta A. y colaboradores, ellos utilizaron un contador de placas multicanal el cual permite realizar medidas a tiempo resuelto, en forma automatizada e inmediata y por lo tanto utilizan volúmenes bastante más pequeños. Por lo anterior, el propósito de esta

modificación fue el de tener un volumen final de la mezcla de reacción (5 mL) suficiente para llenar la celda y asegurar el paso de luz a través de la muestra. Las concentraciones no fueron modificadas. La mayoría de los ensayos ORAC utilizan el Trolox como estándar por ser un reductor muy fuerte, sin embargo, resulta ser muy costoso así que se sustituyó por ácido cafeico ya que es más económico y una referencia más conveniente por ser uno de los antioxidantes de consumo en la dieta, además de que se utiliza en varios productos de la industria cosmética y farmacéutica. Una variable muy importante de este método es la temperatura por ello el tubo de ensayo conteniendo la fluoresceína y el antioxidante o blanco se preincuba a 37°C por 15 minutos, asegurando que al añadir el AAPH se generen los radicales peroxilo por descomposición térmica de éste; esta temperatura se mantuvo durante todo el ensayo con ayuda de un baño de calentamiento.

### 4.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE VAINILLA POR EL MÉTODO ORAC

#### 4.3.1. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO CAFEICO

Se hizo una curva de calibración con concentraciones de ácido cafeico de 1 a 6 mg/L comprobando así mismo que la metodología implementada y descrita en la sección 3.8 es apta para la evaluación de la capacidad antioxidante pues se obtuvieron las curvas cinéticas en presencia y ausencia de un antioxidante, las cuales se presentan en la figura 4-1. Se puede observar que en ausencia de un antioxidante (Blanco) la fluorescencia inicial cae rápidamente, ya que los radicales peroxilo generados por la descomposición térmica del AAPH reaccionan con la fluoresceína dando lugar a un producto final no fluorescente, si la reacción se lleva a cabo con un antioxidante la caída es claramente más paulatina y, conforme aumenta la concentración de ácido cafeico se observa una fase lag más pronunciada, pues el ácido cafeico presente compite con la fluoresceína por los radicales peroxilo.

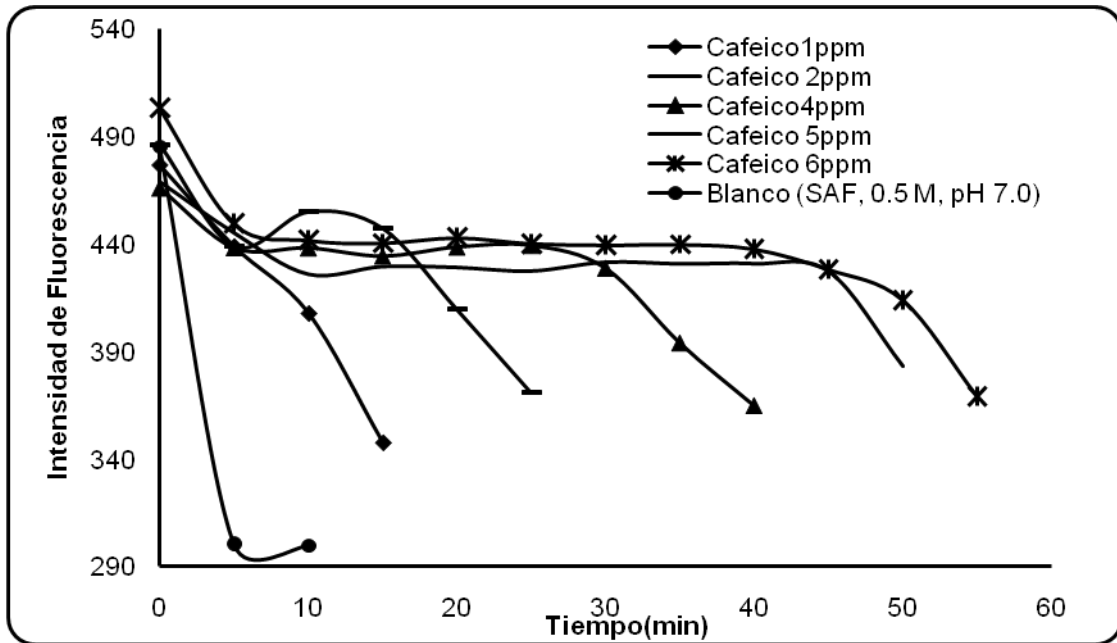


Figura 4-1. Cinética de decaimiento de la fluorescencia en presencia de diferentes concentraciones de ácido cafeico y en ausencia de antioxidante (Blanco)

La relación lineal entre el  $ABC_{NETA}$  y la concentración de ácido cafeico, así como su ecuación y su coeficiente de correlación se presenta en la figura 4-2.

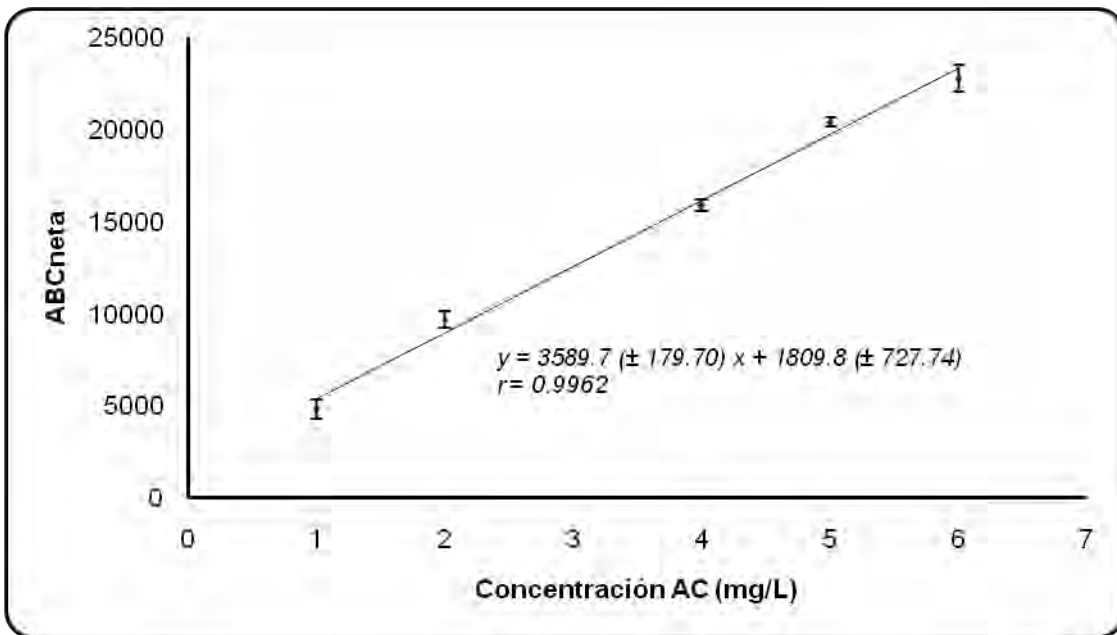


Figura 4-2. Curva de calibración para el intervalo lineal de 1 a 6 mg/L de ácido cafeico

4.3.2. EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DEL MÉTODO ORAC

Para conocer la precisión del método se evaluó su repetibilidad y reproducibilidad dentro del laboratorio, para ello se siguió la cinética de degradación de la fluorescencia con dos disoluciones de ácido cafeico a una concentración de 4 mg/L preparadas diariamente durante cinco días. Los valores de  $ABC_{NETA}$  obtenidos se muestran en la tabla 4-4 con ellos se realizó un análisis de varianza de un factor cuyos datos se indican en la tabla 4-5.

| Día | Replica 1 | Replica 2 |
|-----|-----------|-----------|
| 1   | 14169.38  | 14061.41  |
| 2   | 12687.46  | 13512.40  |
| 3   | 13504.90  | 14455.50  |
| 4   | 13361.26  | 15546.56  |
| 5   | 13452.16  | 14322.00  |

**Tabla 4-4.** Resultados para la determinación de repetibilidad y reproducibilidad, expresados como  $ABC_{NETA}$

| CONCENTRACIÓN | Fuente de Variación | SC <sup>a</sup> | GL <sup>b</sup> | MC <sup>c</sup> |
|---------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 4mg/L         | Entre días          | 1999308         | 4               | 499827          |
|               | Dentro de días      | 3564000         | 5               | 712800.1        |
|               | Total               | 5563308         | 9               |                 |

**Tabla 4-5.** Análisis de Varianza de un factor (ANOVA).<sup>a</sup>Suma de Cuadrados, <sup>b</sup>Grados de libertad, <sup>c</sup>Medias de Cuadrados

La variación entre días o repetibilidad es igual a la media de cuadrados dentro de días ( $s_r^2$ ).

Mientras que la reproducibilidad dentro del laboratorio ( $s_{WR}^2$ ), se calculó mediante las ecuaciones 1 y 2, donde  $n_j$  es el número de réplicas por día

$$s_{entre}^2 = (MC_{entre} - MC_{dentro}) / n_j \quad (1)$$

$$s_{WR}^2 = s_r^2 + s_{entre}^2 \quad (2)$$



La repetibilidad y reproducibilidad, expresadas como desviación estándar relativa (DER) fueron de 6.07% y 5.60% respectivamente.

No obstante la falta de accesibilidad a un lector de placas, que es la forma más común en que se realiza este ensayo y, por lo tanto, las inherentes dificultades que conlleva el realizar la metodología en forma manual, es claro que el método resulta ser bastante adaptable y noble dada su precisión.

Sin embargo, se debe advertir que la variabilidad de los datos en un mismo día resulta ser irregularmente mayor que en diferentes días.

Aunque la fluoresceína es sensible al pH esto no parece afectar el ensayo ORAC pues el pH tendría que cambiar muy drásticamente para que su intensidad de fluorescencia cambie.

Otro factor importante que puede afectar la medición es la temperatura, pero el baño de calentamiento utilizado resulta lo suficientemente adecuado para mantener controlada esta variable.

Aún cuando la fluoresceína ha mostrado ser muy estable y no sufrir fotoblanqueamiento en un lector de placas, debemos considerar que al implementar la metodología en forma manual el tiempo entre una medición y otra es bastante más prolongado, alrededor de 45 minutos para el estándar de 4 ppm utilizado para evaluar la precisión, así que en un tiempo tan prolongado posiblemente si se vea afectada produciéndose algún cambio, tal vez degradación, pues si se observa la segunda replica para cada día (tabla 4-4), es claro que hay un cambio considerable con respecto a la primera.

### 4.3.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE VAINILLA

Una vez que se obtuvo la curva de calibración se siguió la cinética de decaimiento de la fluorescencia para cada uno de los extractos y estándares probados, esta determinación se realizó por triplicado y se obtuvo el  $ABC_{NETA}$  del promedio de las tres replicas, con este valor se calculó la CA expresada en mg equivalentes de AC/g muestra analizada.

Para cada extracción independiente por categoría se promediaron sus valores de capacidad antioxidante. Estos resultados así como el porcentaje de vainillina se muestran en la tabla 4-6.

| <b>MUESTRA</b>           | <b>CA (mg AC/g Vaina)</b> | <b>% VAINILLINA</b> |
|--------------------------|---------------------------|---------------------|
| <b>EAMFZ</b>             | 55.09 ± 0.58              | 1.16 ± 0.03         |
| <b>EAMFZ<sub>s</sub></b> | 35.11 ± 0.04              | 0.57 ± 0.03         |
| <b>MOZ</b>               | 26.74 ± 0.54              | 0.62 ± 0.01         |
| <b>EAMFG</b>             | 63.98 ± 2.10              | 1.81 ± 0.02         |
| <b>Verde</b>             | 6.70 ± 0.32               | 0.27*               |

**Tabla 4-6.** Capacidad antioxidante expresada en mg equivalentes de AC por g de vaina para extractos de vainilla.\* Valor reportado por Pacheco, 2009.

Los extractos MOZ presentan la menor concentración de vainillina (0.62%) pues se obtuvieron con las vainas de menor calidad y por el método con menor eficiencia de extracción, también su valor de CA es el más pequeño. Al aplicar la EAMF a este mismo tipo de vainas (zacatillo) la concentración de vainillina se incrementa casi al doble, debido a la mayor eficiencia de extracción (Longares y Cañizares, 2006) y el valor de la CA se incrementa prácticamente en la misma proporción, cuando se aplica este mismo tipo de energía a vainas comerciales (EAMFG) la vainillina aumenta a razón de 1.56 con respecto a la vainilla zacatillo (EAMFZ) no así la CA que sólo se incrementa a razón de 1.16.

La CA del extracto de vaina verde funge como control negativo, dado que no se ha llevado a cabo el proceso de curado durante el cual se produce la hidrólisis enzimática de la glucovainillina para producir vainillina, ésta no se encuentra en gran cantidad en el extracto como lo refleja el valor de concentración reportado (0.27%) y el valor de la capacidad antioxidante (6.70 mg AC/g vaina) es bajo.

La vainilla zacatillo seca (27.3 % de humedad) disminuye su concentración de vainillina a la mitad con respecto a la vainilla zacatillo húmeda, esto se debe a la posible pérdida de material volátil, de igual forma la CA disminuye pero a razón de 1.57.

El contenido de vainillina está claramente relacionado con la CA de los extractos aunque esta relación no es proporcional, lo cual no resulta sorprendente dado que en las vainas se han identificado más de 200 compuestos (Sinha, 2009) y por lo tanto muchos otros constituyentes podrían contribuir con la CA de los extractos, pues aunque no se encontraran en una concentración a la cual presentarían un valor importante de CA, posibles interacciones sinérgicas o antagónicas entre los componentes en una mezcla compleja como lo son los extractos pueden ocurrir.

#### 4.3.4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS DE VAINILLA

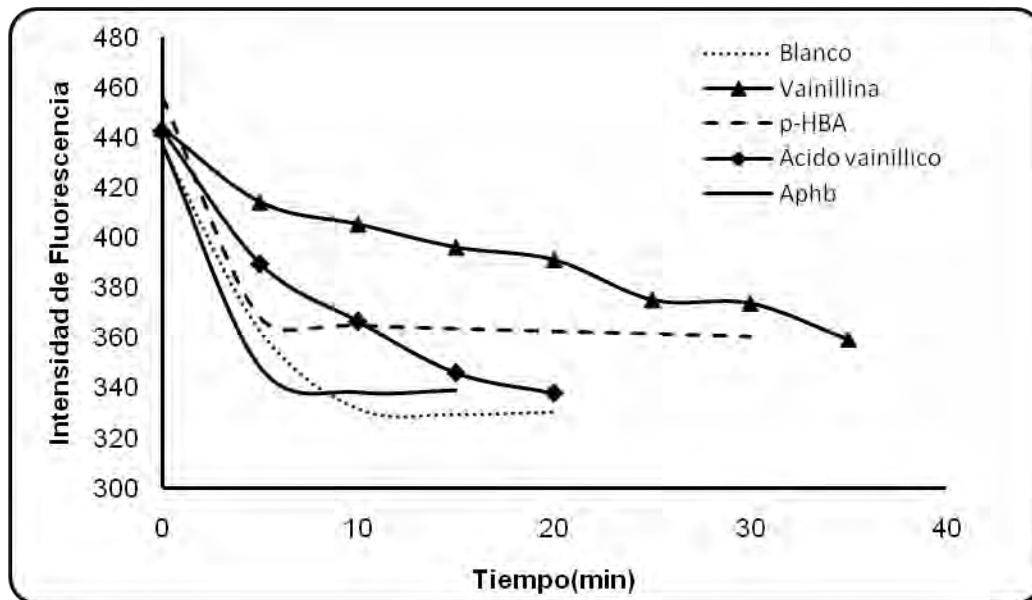
Dado que los compuestos más importantes presentes en los extractos de vainilla son: vainillina (2-2.8%), *p*-hidroxibenzaldehído (0.2%), ácido vainílico (0.2%) y el ácido *p*-hidroxibenzoico (0.02%) se ensayaron disoluciones de estos compuestos a una concentración aproximada, a la cual se estima estarían presentes en los extractos. Para ello se consideraron los dos extractos independientes de la EAMF aplicada a la vainilla zacatillo (EAMFZ) que fueron promediados y cuyo valor promedio expresado en mg AC/g vaina se indicó anteriormente (tabla 4-6). En la tabla 4-7 se muestran los valores de CA para cada uno de estos extractos, expresados tanto en concentración equivalente de AC (mg/L) como en mg AC/g vaina, también se presentan sus concentraciones de vainillina (mg/L) con su correspondiente expresión en porcentaje.

| <b>MUESTRA</b> | <b>Capacidad Antioxidante</b> |               | <b>Concentración Vainillina</b> |      |
|----------------|-------------------------------|---------------|---------------------------------|------|
|                | mg AC/L                       | mg AC/g vaina | mg/L                            | %    |
| EAMFZ1         | 2.39                          | 59.22         | 485.54                          | 1.14 |
| EAMFZ2         | 2.04                          | 50.95         | 476.09                          | 1.19 |

**Tabla 4-7.** Capacidad antioxidante y concentración de vainillina para la EAMF aplicada a las vainas zacatillo (extractos independientes, n=2)

Los dos extractos que se muestran en la tabla 4-7 tienen una concentración alrededor de 467 mg AC/L y se diluyeron 1:1000 para llevar a cabo la determinación de la capacidad antioxidante, por lo tanto la vainillina estaría presente en una concentración de prácticamente 0.50 mg/L. En la figura 4-3 se muestran las cinéticas

de decaimiento de fluorescencia obtenidas para las disoluciones estándar de Vainillina, p-HBA, AV y Aphb a una concentración de 0.55mg/L.



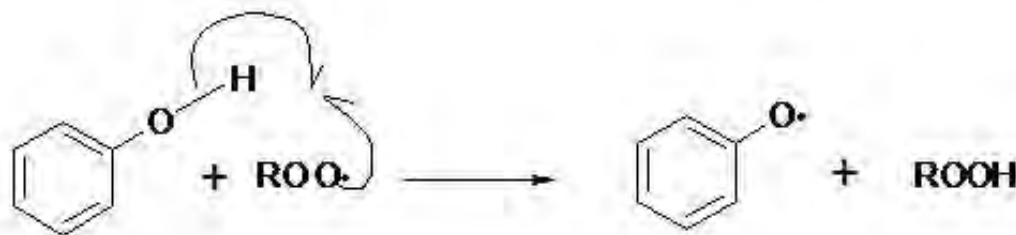
**Figura 4-3.** Decaimiento cinético de la fluorescencia en presencia de Vainillina, p-HBA (p-hidroxibenzaldehído), ácido vainillico y Aphb (ácido p-hidroxibenzoico)

Como puede observarse tanto el p-HBA como el Aphb decaen tan rápido como el blanco, aunque para el ácido vainillico el decaimiento es más paulatino, su valor de  $ABC_{NETA}$  (2003.87) es tan pequeño que no entra dentro del intervalo lineal de la curva de ácido cafeico, por lo que no se logró determinar su CA a esta concentración, así entonces la vainillina es el único compuesto que presenta una actividad antioxidante considerable a esta concentración.

Los extractos EAMFZ1 y EAMFZ2 tienen una concentración equivalente de ácido cafeico de 2.39 y 2.04 mg AC/L respectivamente, en tanto que para el estándar de vainillina se obtuvo un valor de 2.30 mg AC/L, si bien existe una diferencia apreciable entre estas dos extracciones independientes y el estándar con el cual se comparan tienen una concentración mayor de vainillina de la que realmente habrá en cada extracto se puede inferir que la vainillina contribuye notablemente en la capacidad antioxidante de los extractos, no así los demás compuestos probados ya que en un extracto natural de vainilla tanto el p-HBA como el ácido vainillico tienen

concentraciones 10 veces menores con respecto a la vainillina mientras que el Aphb se encuentra 100 veces menos concentrado.

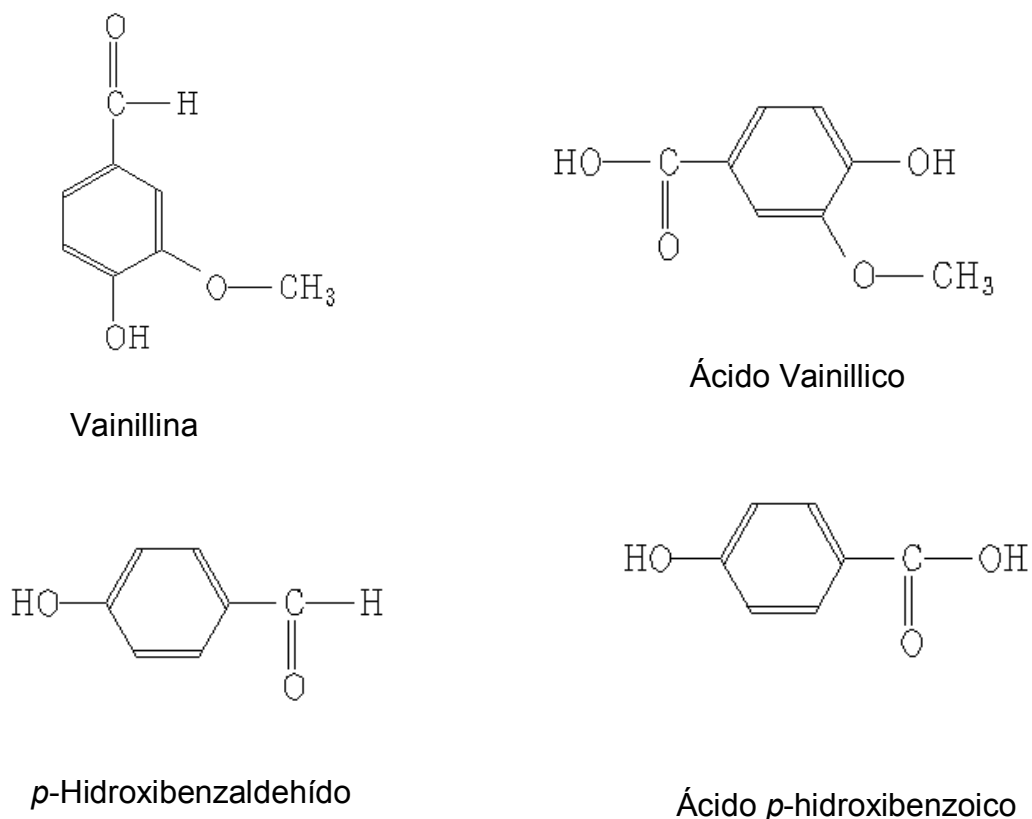
La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos como los probados y presentes en los extractos se basa en su capacidad secuestradora de radicales libres mediante una reacción en la que está implicada la donación de un átomo de hidrógeno al electrón desapareado del radical.



**Figura 4-4.** Reacción de un compuesto fenólico con el radical peróxido

No obstante, la actividad antioxidante dependerá de la estructura específica de cada compuesto (número y localización de los grupos hidroxilo). El Aphb no muestra capacidad antioxidante debido al efecto atractor de electrones del grupo carboxilo sobre el anillo del fenol que afecta las posiciones orto y para, sin embargo la adición de un grupo metoxi en la posición meta (ácido vainillico) incrementa la CA (Rice-Evans, 1996). Aunque no se obtuvieron valores para estos compuestos, la forma de sus curvas cinéticas son consistentes con estas observaciones pues a la misma concentración el decaimiento de la fluorescencia para el ácido vainillico es más paulatino y bastaría con incrementar su concentración para determinar un valor de CA por este método. Las curvas para la vainillina y el p-HBA tienen este mismo comportamiento, la vainillina si presenta actividad antioxidante y el p-HBA parece no tener CA a esa concentración. Si observamos sus estructuras (figura 4-5) los ácidos vainillico y p-hidroxibenzoico, al ser los productos de la oxidación de la vainillina y el p-HBA respectivamente, sólo cambian el grupo carboxilo por el aldehído, así que la diferencia entre su potencial como antioxidantes podría ser explicada del mismo modo que para sus respectivos ácidos carboxílicos. Por otro lado, la vainillina presenta una actividad antioxidante mayor que el ácido vainillico a la misma

concentración, esto también estará en función de las diferencias en el grupo funcional.



**Figura 4-5.** Estructuras químicas de los compuestos mayoritarios en un extracto natural de vainilla

#### 4.4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE OTROS COMPUESTOS

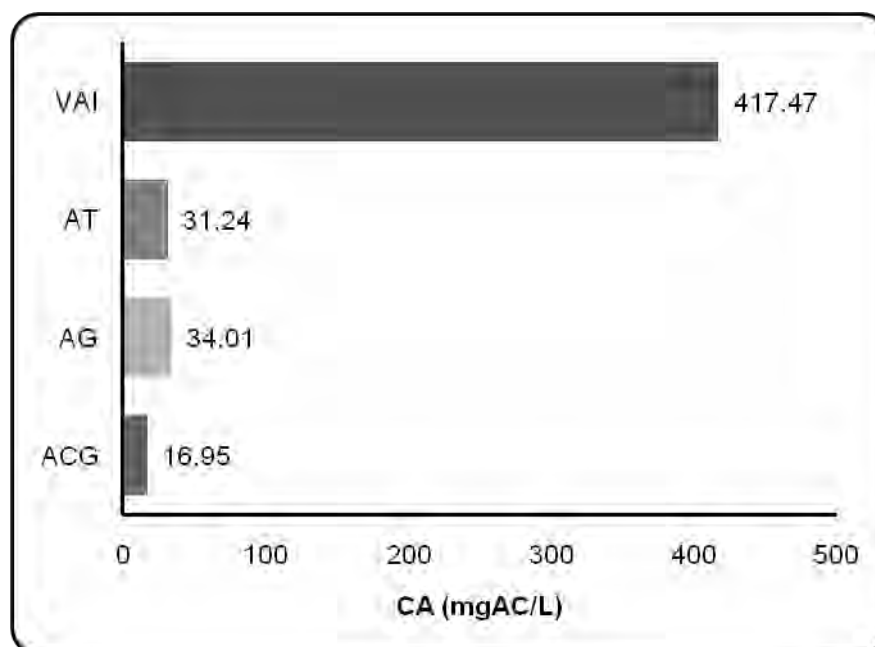
La CA de otros compuestos fenólicos y dos xantinas también fue evaluada con este método, para ello se prepararon disoluciones estándar a la concentración que se indica en la tabla 4-8.

| ESTÁNDARES        | CONCENTRACIÓN (mg/L) | CA (mg AC/L) |
|-------------------|----------------------|--------------|
| ÁCIDO CLOROGÉNICO | 18                   | 3.05         |
| ÁCIDO GÁLICO      | 10                   | 3.40         |
| ÁCIDO TÁNICO      | 12                   | 3.75         |
| VAINILLINA        | 0.55                 | 2.30         |
| CAFEÍNA           | <sup>a</sup>         | ND           |
| TEOBROMINA        | 1000                 | ND           |

**Tabla 4-8.** CA expresada en mg AC/L, <sup>a</sup>para este compuesto se probaron las concentraciones 10, 25, 100 y 1000 mg/L, ND: No determinado

Para la cafeína se probaron disoluciones estándar a una concentración de 10, 25, 100 y 1000 mg/L, el decaimiento cinético para cada una de estas concentraciones fue prácticamente igual y tan rápido como el blanco, lo mismo ocurrió para un estándar de Teobromina de 1000 mg/L por lo que no actúan como antioxidantes.

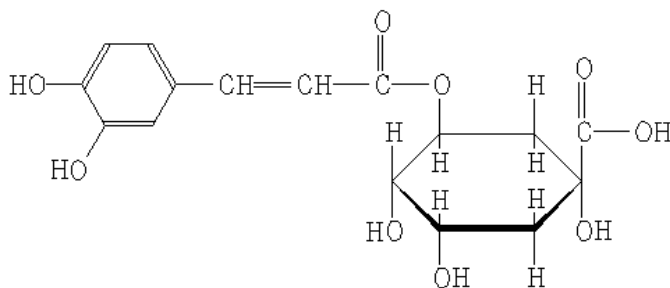
Se calculó la CA para los estándares de los otros analitos a una concentración de 100 mg/L, los valores de CA multiplicados por su factor de dilución correspondiente se muestran en la figura 4-6.



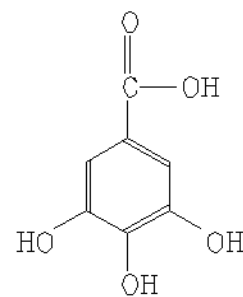
**Figura 4-6.** Capacidad antioxidante (mg AC/L) de compuestos estándar (100 mg/L). VAI: Vainillina, AT: Ácido tánico, AG: Ácido gálico, ACG: Ácido clorogénico

Se encontró que el ACG tiene el valor más pequeño de CA y los ácidos gálico y tánico aunque muestran valores más cercanos entre sí, el segundo tiene un valor más pequeño que el primero. Puesto que el ACG tiene sólo dos grupos fenólicos capaces de captar radicales libres en comparación con los ácidos tánico y gálico, parece congruente que su CA sea menor en comparación con estos ácidos, en cambio esperaríamos que el AT que contiene muchos grupos hidroxilo debería tener una CA mayor que el AG, aunque podríamos suponer que la reactividad química se ve afectada por impedimento estérico, lo que posiblemente influirá en su CA determinada por este método.

La capacidad secuestradora de radicales estará estrechamente relacionada con la estructura química de cada compuesto y esto nos permite confrontar los resultados obtenidos con dicha estructura, dada la reacción que se lleva a cabo en este ensayo resulta evidente que los valores obtenidos reflejaran sólo la reactividad química bajo las condiciones específicas aplicadas en dicho ensayo (Huang et al, 2005), así pues si se cambia el estándar respecto al cual se expresan los valores, estos pueden variar considerablemente, por ejemplo, aplicando el método ORAC y refiriendo los valores con respecto al trolox, Tabart J. y colaboradores (2009) encontraron que la CA del ACG es cinco veces mayor que la del AG.

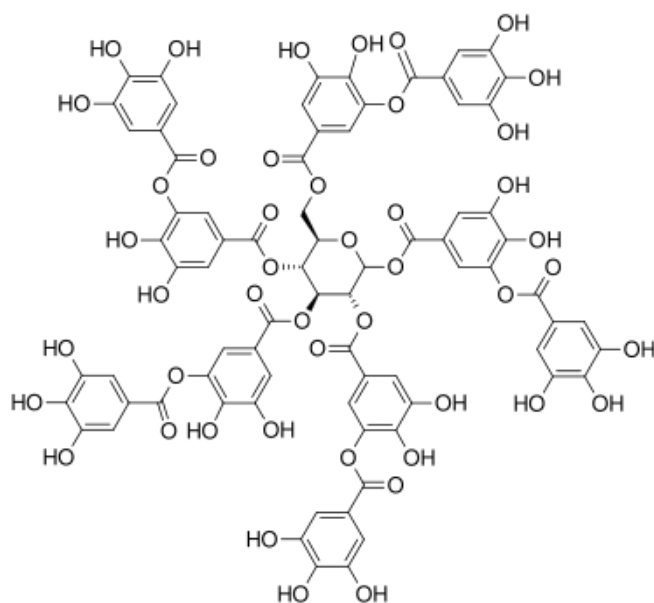


Ácido clorogénico



Ácido gálico





Ácido tánico

Figura 4-7. Estructuras químicas de otros compuestos fenólicos

#### 4.5. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE CAFÉ Y CACAO. COMPARACIÓN CON VAINILLA

Con la finalidad de comparar la CA de los extractos de vainilla con otro tipo de muestras alimenticias, también se determinó la CA de dos extractos de café (Café Planchuela Verde y Café Planchuela Tostado) y un extracto de Cacao. Los resultados se muestran en la tabla 4-9.

| MUESTRA | CA<br>mgAC/gMuestra |
|---------|---------------------|
| EAMFZ   | 55.09               |
| MOZ     | 26.74               |
| EAMFG   | 63.98               |
| CPV     | 18.96               |
| CPT     | 11.03               |
| Cacao   | 14.65               |

Tabla 4-9. Valores de CA (mg AC/g Muestra) para extractos de Vainilla, Café y Cacao

La CA de los extractos de vainilla determinada por este método es mayor que la del café y el cacao. No obstante debemos de considerar que de estos 3 alimentos el café sería el que contribuiría más a la ingesta de antioxidantes dado que su consumo en la población mexicana es mucho mayor (1.6 Kg/persona/año) en comparación con el cacao (0.9 Kg/persona/año) según las estadísticas más recientes (FAO, 2005) y aunque no hay un dato para el consumo de vainilla, el consumo de especias fue sólo de 0.6 Kg/persona/año, pues estas sólo se consumen en pequeñas cantidades, en el caso de la vainilla apenas unas cuantas gotas.

Por otro lado, la CA del café verde es mayor a la del café tostado y el cacao, en tanto que este último presenta mayor actividad antioxidante que el café tostado.

Se ha reconocido que los ácidos clorogénicos son de los compuestos fenólicos que contribuyen de manera importante con la CA del café. El contenido de ácidos clorogénicos es de 7% en el café verde y se descomponen parcialmente (30 a 70%) durante el tostado (Gotteland et al, 2007), por ello, resulta lógico que la CA del café verde sea mayor a la del café tostado.

Es conveniente aclarar que la CA del café no se debe únicamente a los compuestos polifenólicos pues el proceso de tostado induce a la formación de compuestos que también poseen propiedades antioxidantes, sin embargo, la contribución de estos compuestos a la CA estará evidentemente influenciada por el grado de tostado, también se ha reconocido a la cafeína como un potente antioxidante (Shi et al, 1991; Devasagayam et al, 1996), sin embargo, en este estudio se probaron cuatro concentraciones diferentes ( sección 4.4) y los resultados no mostraron valores de CA.

#### 4.6. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

Se obtuvieron dos curvas de calibración una de ácido cafeico y otra de vainillina para referir los valores de CA con respecto a cada uno de estos compuestos fenólicos. La tabla 4-10 resume los coeficientes de correlación, pendiente ( $m$ ) e intercepto ( $b$ ) para el intervalo lineal de 5 a 100 mg/L y de 8 a 20 mg/L para ácido

cafeico y vainillina respectivamente. En el anexo (Figuras B y C) se muestran los diagramas a partir de los cuales se generaron estas curvas de calibración.

| Compuesto de Referencia | Pendiente ( <i>m</i> ) | Intercepto ( <i>b</i> ) | <i>r</i> |
|-------------------------|------------------------|-------------------------|----------|
| Ácido cafeico           | 0.0114 ± 0.0001        | 0.017 ± 0.0058          | 0.9998   |
| Vainillina              | 0.0081 ± 0.0002        | 0.0391 ± 0.0032         | 0.9988   |

**Tabla 4-10.** Ecuaciones de las rectas para las curvas de calibración de ácido cafeico y vainillina [y(Absorbancia)=mx(mg/L)+b]

Para cada uno de los extractos ensayados por el método ORAC se realizó la dilución apropiada y después se inyectó tres veces en el sistema FIA descrito en la sección 3.9 y se obtuvo un promedio de las tres señales. Para los extractos de vainilla se sacó el promedio de las extracciones independientes realizadas para cada tipo de extracto así como el de sus respectivos valores de concentración de vainillina. Los extractos de café y cacao también se analizaron por este método. Los resultados se muestran en las tablas 4-11 y 4-12.

| MUESTRA            | mg AC/g Vainilla | mg Vai/g Vainilla | %Vainillina |
|--------------------|------------------|-------------------|-------------|
| EAMFZ              | 24.03 ± 0.16     | 28.16 ± 0.21      | 1.16        |
| EAMFZ <sub>s</sub> | 11.16 ± 0.55     | 13.05 ± 0.73      | 0.57        |
| MOZ                | 12.18 ± 0.12     | 14.43 ± 0.17      | 0.62        |
| EAMFG              | 30.88 ± 0.95     | 36.76 ± 1.25      | 1.81        |

**Tabla 4-11.** CA de extractos de vainilla con respecto a AC y Vainillina (Vai)

| MUESTRA          | mg AC/g Muestra | mg ACG/ g Muestra |
|------------------|-----------------|-------------------|
| CPV <sup>d</sup> | 23.97           | 38.02             |
| CPT <sup>d</sup> | 10.11           | 16.26             |
| Cacao            | 17.86           | NA                |

**Tabla 4-12.** CA en extractos de café y cacao. <sup>d</sup>Con respecto a AC y ácido clorogénico(ACG).

NA: No aplica

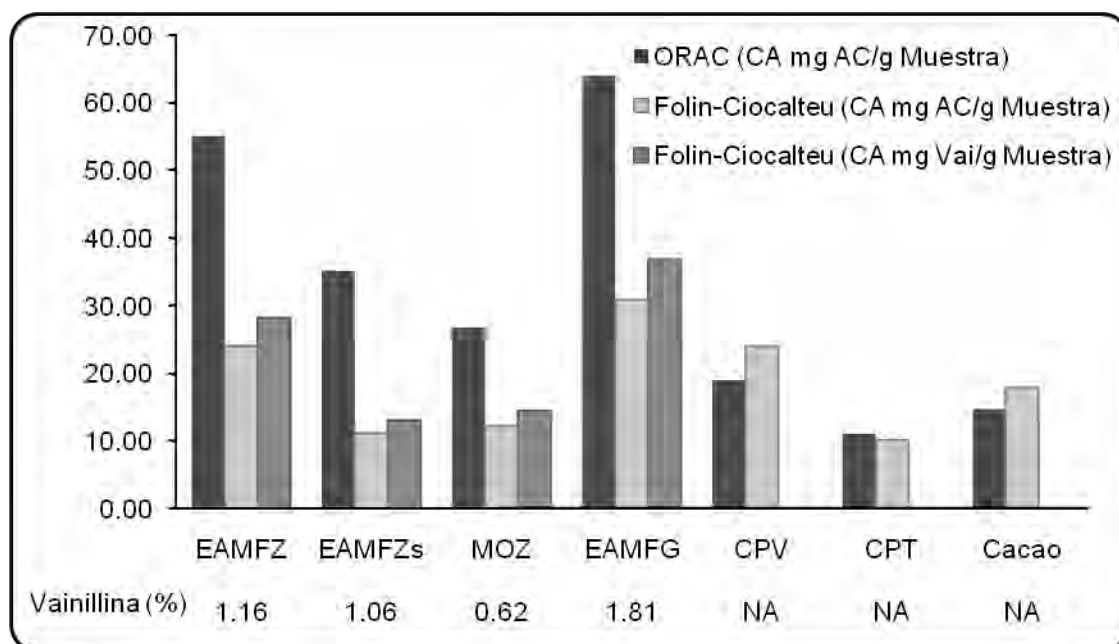
Para los extractos de vainilla los valores de CA utilizando vainillina como referencia son 1.2 veces mayores que sus correspondientes valores referidos con respecto a ácido cafeico en tanto que para los extractos de café los valores con respecto al ácido clorogénico son 1.6 veces mayores que los referidos con respecto al ácido cafeico. Esto se debe a que la capacidad reductora de las muestras estará dada principalmente por los compuestos fenólicos mayoritarios, para los extractos de vainilla “la vainillina” y para los de café “el ácido clorogénico”, por lo tanto, la respuesta que da cada muestra frente a la concentración de estos compuestos en específico proporcionara valores mayores. Así pues, se encontró que con ambos patrones la EMF aplicada a las vainas comerciales tiene mayor CA (30.88 mg AC/g vaina y 36.76 mg Vai/g vaina) en comparación con los otros extractos. Por otro lado, el CPV tiene mayor CA que el CPT y el Cacao, pero este último mayor que el CPT.

### 4.6.1. EVALUACIÓN DEL MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU

Se comparó el método ORAC implementado con el de Folin-Ciocalteu ya que tienen mecanismos diferentes, el método ORAC se basa en una reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno mientras que en el de Folin-Ciocalteu se involucran reacciones de transferencia de electrones y de complejación ocurridas entre los compuestos reductores en la muestra y el Mo (VI) del RFC. Además se han acumulado una gran cantidad de datos que lo han convertido en un ensayo de rutina en el estudio de antioxidantes fenólicos, pues ha mostrado ser conveniente, simple y reproducible (Huang et al, 2005). Específicamente en el lugar de trabajo en donde se desarrollo este proyecto se ha evaluado su repetibilidad y su reproducibilidad siendo 0.67% y 0.71% respectivamente.

### 4.7. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS ORAC Y FOLIN-CIOCALTEU PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CA EN EXTRACTOS DE VAINILLA, CAFÉ Y CACAO

En la figura 4-8 se muestra la representación grafica de los valores de CA obtenidos por el método ORAC y por el método FIA con el reactivo de Folin-Ciocalteu.



**Figura 4-8.** CA expresada como equivalentes de AC o Vainillina (mg/g Muestra) de Vainilla, Café y Cacao. NA: No Aplica

Se observa que los valores ORAC para los cuatro extractos de vainilla son mayores que sus correspondientes con el RFC, en cambio cuando se probaron las muestras de café y cacao los valores con el RFC son ligeramente mayores a sus correspondientes valores ORAC excepto para el CPT (Valor ORAC: 11.03 mg AC/g Muestra; Valor RFC: 10.11 mg AC/g Muestra), desde luego esta discrepancia puede deberse a la precisión, pues el método ORAC tiene más error.

No obstante, es claro que la CA del cacao y del café por el método ORAC no es tan alta como en el caso de la vainillina y el poder reductor del café y del cacao es equivalente por cualquiera de los dos métodos, esto puede deberse a que los compuestos fenólicos presentes en los extractos de vainilla son más efectivos o tienen mayor reactividad contra los radicales peroxilo que los que están presentes en los extractos de café y cacao. Esto resulta congruente con el hecho de que la vainillina (mayoritaria en la vainilla) en efecto tiene mayor reactividad contra los

radicales peroxilo que por ejemplo el ACG (principal polifenol en el café) al menos bajo las condiciones específicas del ensayo ORAC implementado (fig. 4-6).

### 4.7.1. CORRELACIÓN ENTRE LOS MÉTODOS

En general existe una alta correlación lineal entre los valores con el RFC y los valores ORAC para las muestras de vainilla independientemente del estándar de referencia utilizado en la metodología con el RFC:  $r=0.967$  con respecto a AC y  $0.964$  con respecto a Vainillina.

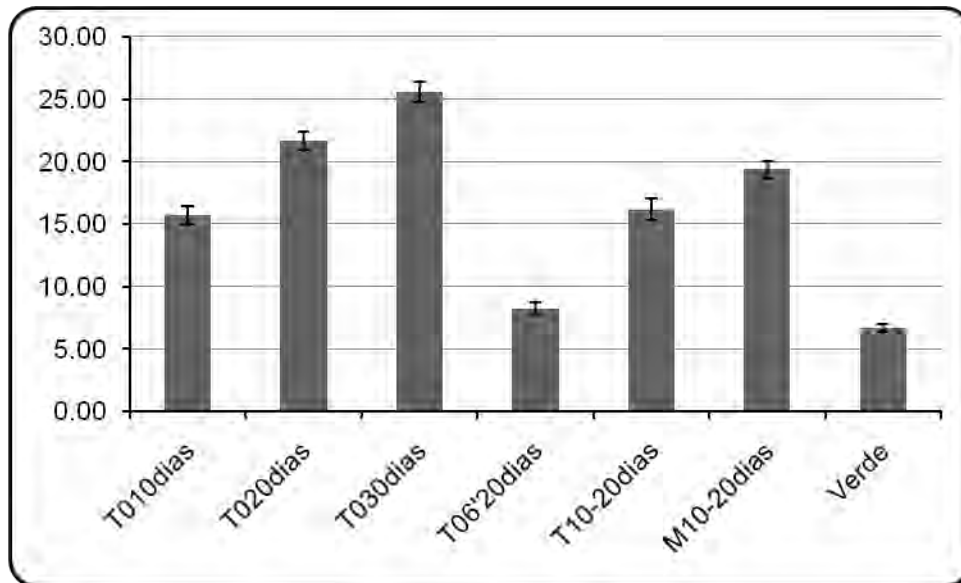
Así mismo para las otras muestras (café y cacao) el coeficiente entre los valores ORAC y los valores por el RFC es prácticamente 1, es decir, son casi iguales por ambos métodos y en consecuencia la correlación es bastante buena ( $r= 0.993$ ), se ha establecido una correlación entre estas tres muestras porque su comportamiento es similar entre ellas y diferente con respecto a las de vainilla (los valores ORAC para los extractos de vainilla son mayores que por el RFC).

No obstante, resulta de interés que al no existir un consenso entre varios autores, algunos han encontrado una buena correlación entre estos dos métodos específicos, pero algunos otros como Wu X. y colaboradores (2004) al aumentar el número y la diversidad en el tipo de muestras alimenticias determinan que no hay una buena correlación entre estos métodos, sin embargo, podemos hacer notar que esto dependerá del compuesto con respecto al cual se exprese la CA pues generalmente en el ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza el ACG o el AG independientemente de la muestra y el trolox es el más utilizado en el ensayo ORAC.

En este estudio tanto el método ORAC como el método con el RFC se expresan con respecto al AC pues de esta manera los resultados pueden ser comparables. Si bien, los valores por el método RFC también se expresaron con respecto a vainillina (tabla 4-12) y la correlación resulta prácticamente igual que con respecto al AC, ya se ha discutido que la vainillina es el compuesto fenolico principal en los extractos (sección 4.6) y por ello también resulta una buena referencia.

4.8.EFECTO DEL MARCHITADO TRADICIONAL DE LA VAINILLA DURANTE EL PROCESO DE BENEFICIO SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En la figura 4-9 se presenta la representación grafica de los valores de CA obtenidos por el método ORAC para los extractos que se obtuvieron de las vainas sometidas al proceso de beneficio indicado en la sección 3.10.



**Figura 4-9.** CA de vainas sometidas a un proceso de curado por 10, 20 y 30 días. T0: Tratamiento de marchitado tradicional (inmersión en agua a 60°C durante 3 min), T06': inmersión en agua a 60°C durante 6 min, T10: Tratamiento de marchitado tradicional y posmarchitado con radiación ultrasónica por 10 min a 38°C, M10: Marchitado con microondas durante 20 seg además de radiación ultrasónica por 10 min a 38°C.

Se puede observar en la figura 4-9 que conforme aumenta el tiempo de beneficio también se incrementa la CA.

Pacheco (2009) encontró que el máximo rendimiento de vainillina se consigue a los 20 días de beneficio y posteriormente se da una disminución al aumentar el tiempo de beneficio a 30 días. Así pues resulta congruente que a los 10 días de beneficio la CA sea menor que a los 20 días pues el rendimiento de vainillina se incrementa a los 20 días. No obstante, a los 30 días se encontró un incremento en la CA.

Cuando el tratamiento de marchitado tradicional se hace por 6 min en lugar de 3 min hay una disminución del 61.8 % en la CA, si consideramos que el objetivo de la etapa de marchitado es promover la descompartimentación celular por ruptura de la membrana celular de manera que las enzimas entren en contacto con el sustrato, el tratamiento no debe conducir a la inhibición enzimática como para disminuir la producción de vainillina lo que seguramente ocurre cuando el tratamiento térmico se aumenta a 6 min, pues aunque la inmersión en agua caliente se ha realizado a temperaturas más altas (70 y 80 °C) los tratamientos no sobrepasan los 3 min (Pardio et al, 2009). Así entonces, al haber una disminución en el rendimiento de vainillina habrá la consecuente disminución en la CA.

Cuando se aplica radiación ultrasónica posterior al tratamiento de marchitado tradicional (T10-20 días) el rendimiento de vainillina disminuye ya que la sonicación puede provocar oxidación u otras reacciones que disminuyen el contenido de vainillina (Pacheco, 2009) y por lo tanto su CA disminuye con respecto al tratamiento tradicional (T0-20 días).

Al aplicar un tratamiento por microondas en lugar del tradicional (M10-20 días) la CA disminuye un 10.5% pero como además a este tratamiento se le adiciono un posmarchitado con sonicación por 10 min (al igual que a T10-20 días) este pudo provocar reacciones que disminuyen el rendimiento de vainillina pese a que este podría haber sido igual o mayor al procedimiento tradicional (T0-20 días) lo mismo que su CA. Es decir, la sonicación por 10 min posterior al tratamiento de marchitado afecta más la CA del tratamiento de marchitado tradicional que la del tratamiento con microondas.

Estas observaciones se hacen con base en que se ha establecido que el contenido de vainillina está relacionado (aunque no de manera proporcional) con la CA (sección 4.3.3) sin embargo, sería necesario determinar el contenido de vainillina en los extractos mencionados.



### 5. CONCLUSIONES

- Los extractos obtenidos de las vainas de vainilla utilizando microondas focalizadas poseen mayor capacidad antioxidante que cuando el extracto es obtenido por el método tradicional y sus valores están relacionados con la concentración de vainillina.
- Los valores de capacidad antioxidante obtenidos por el método ORAC, son mayores que los obtenidos por el método FIA-Folin Ciocalteu, sin embargo, el método FIA-Folin Ciocalteu es más preciso (0.71% a 5.60%) y más rápido (24 determinaciones/hora contra 2 determinaciones/hora) en comparación con el método ORAC
- No obstante que los dos métodos utilizados tienen mecanismos diferentes existe una alta correlación lineal entre ellos ( $r=0.967$ ) entre ellos
- Los extractos de vainilla tienen mayor capacidad antioxidante que el café y el cacao, sin embargo, el café sería el que contribuiría más a la ingesta de antioxidantes dado que su consumo en la población mexicana es mayor
- La capacidad antioxidante de las vainas con un tratamiento de marchitado tradicional aumenta conforme se incrementa el tiempo de beneficio. Además, un tratamiento térmico prolongado durante el marchitado tradicional así como un tratamiento con radiación ultrasónica (posmarchitado) disminuyen la capacidad antioxidante de las vainas curadas

## 6. BIBLIOGRAFÍA

ASERCA (Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria) (2002a). La vainilla en México, una tradición con un alto potencial. *Claridades Agropecuarias* (101), 3-16.

ASERCA (2002b). La vainilla, un "extracto" ampliamente utilizado por la industria de alimentos en el mundo. *Claridades Agropecuarias* (101), 17-26.

Bisby R. H., Brooke R. & Navaratnam S. (2008). Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Food Chemistry*, 108, 1002-1007.

Cañizares Macías, M. P. (2002). Análisis por inyección en flujo: Herramienta clave para la automatización analítica. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 46 (2), 167-174.

Cao G., Alessio H. M. & Cutler R. G. (1993). Oxygen-Radical Absorbance Capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 14, 303-311.

Celeste M., Tomás C., Cladera A., Estela J. M. & Cerdà V. (1992). Enhanced automatic flow-injection determination of the total polyphenol index of wines using Folin-Ciocalteu reagent. *Analytica Chimica Acta*, 269, 21-28.

Circu M. L. & Yee Aw T. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 48, 749-762.

Devasagayam T. P., Kamat J. P., Mohan H. & Kesavan P. C. (1996). Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipoperoxidation induced by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta*, 1282, 63-70.

Dignum M. J., Kerler J. & Verpoorte R. (2002). Vanilla curing under laboratory conditions. *Food Chemistry*, 79, 165-171.

Dignum M. J., Kerler J. & Verpoorte R. (2001). Vanilla production: Technological, chemical and biosynthetic aspects. *Food Reviews International*, 17 (2), 199-219.

Drago-Serrano M. E., López-López M. & Sainz-Espuñes T. R. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37 (4), 58-68.

Espín J. C., García-Conesa M. T. & Tomás-Barberán F. A. (2007). Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry*, 68, 2986-3008.

FAOSTAT. (2005). Recuperado el 16 de Febrero de 2010, de <http://faostat.fao.org/>

- Frankel E. N. & Finley J. W. (2008). How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4901-4908.
- Frankel E. N. & Meyer A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941.
- González Nuñez L. N. (2010). Extracción y cuantificación de cafeína y teobromina en granos de cacao. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química, México, 62 pp.
- Gordon M. H. (2001). El desarrollo del enranciamiento oxidativo en los alimentos. En *Antioxidantes de los Alimentos. Aplicaciones Prácticas*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. (págs. 7-21).
- Gotteland M. & de Pablo S. V. (2007). Algunas verdades sobre el café. *Revista Chilena de Nutrición*, 34 (2), 1-23.
- Gutteridge J. M. & Halliwell B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393, 561-564.
- Hágsater E., Soto Arenas M. À., Salazar Chávez G. A., Jiménez Machorro R., López Rosas M. A. & Dressler R. L. (2005). *Las Orquídeas de México*. Instituto Chinoín A.C., Redacta S.A. de C.V. México. 304 pp.
- Halliwell B. & Gutteridge J. M. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine* (4a. ed.). Oxford University Press. Gran Bretaña.
- Hernández J. H. (Noviembre de 2009). El cultivo: la vainilla (segunda parte). Fundación Produce Veracruz, A. C. *Agroentorno*, 32-35.
- Huang D., Ou B. & Prior R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Jiménez Martínez T. S. (2007). Determinación del contenido de agua en muestras de especias y granos de café por medio de la extracción asistida con ultrasonido y detección con el reactivo de Karl Fischer en línea. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química, División de Estudios de Posgrado. 80 pp.
- Krinsky N. I. (1992). Mechanisms of action of biological antioxidants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 200 (2), 248-254.

- Longares - Patrón A. & Cañizares - Macías M. P. (2006). Focused microwaves-assisted extraction and simultaneous spectrophotometric determination of vanillin and *p*-hydroxybenzaldehyde from vanilla fragans. *Talanta*, 69, 882-887.
- Mariezcurrera M. D., Zavaleta H. A., Waliszewski K. N. & Sánchez V. (2008). The effect of killing conditions on structural changes in vanilla (*Vanilla planifolia*, Andrews) pods during the curing process. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1452-1457.
- Miranda L. D. (2008). Química de los Radicales Libres. *En Radicales Libres y Estrés Oxidativo. Aplicaciones Médicas*. Manual Moderno, México. (págs. 3-21).
- Mochón S. (1994). Quiero entender el cálculo. Un enfoque diferente basado en conceptos y aplicaciones. Grupo Editorial Iberoamérica. México. 368 pp.
- Murillo G. O. (1995). *Ficha Técnica de Industrialización de Vainilla*. Dirección de Mercadeo y Agroindustria. Área Desarrollo de Producto. Consejo Nacional de Producción. Costa Rica.
- Odoux E., Chauwin A. & Brillouet J. M. (2003 a). Purification and characterization of vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews)  $\beta$ -D-Glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3168-3173.
- Odoux E., Escoute J. & Verdell J. (2006). The relation between glucovanillin,  $\beta$ -D-glucosidase activity and cellular compartmentation during the senescence, freezing and traditional curing of vanilla beans. *Annals of Applied Biology*, 149, 43-52.
- Odoux E., Escoute J., Verdeil J. & Brillouet M. (2003 b). Localization of  $\beta$ -D-glucosidase activity and glucovanillin in vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews). *Annals of Botany*, 92, 437-444.
- Ou B., Hampsch-Woodill M. & Prior R. L. (2001). Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity using Fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4619-4626.
- Pacheco Reyes I. (2009). Evaluación del efecto de sonicación-microondas en el beneficio de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews). Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-OAXACA, Oaxaca de Juárez. 66 pp.
- Padilla F. C., Rincón A. M. & Bou-Rached L. (2008). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58 (3), 303-308.
- Pardio V. T., Mariezcurrera M. D., Waliszewski K. N., Sánchez, V. & Janezur, M. K. (2009). Effects of killing condition of vanilla (*Vanilla planifolia*, Andrews) pods

during the process on aroma composition of pod ethanol extract. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2417-2423.

Pastene E. R. (2009). Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8 (6), 449-455.

Pastene E., Gómez M., Speisky H. & Nuñez-Vergara L. (2009). Un sistema para la detección de antioxidantes volátiles comúnmente emitidos desde especias y hierbas medicinales. *Quim. Nova*, 32 (2), 482-487.

Pietta P. G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.

Rao S. R. & Ravishankar G. A. (2000). Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 289-304.

Rice-Evans C. A., Miller N. J. & Paganga G. (1996). Structure - Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (7), 933-956.

Rosado-Zarrabal T. L., Salgado-Cervantes M. A., Robles-Olvera V. J., García-Alvarado M. A. & Rodríguez-Jiménez G. C. (2007). Efecto del tipo de marchitamiento en la evolución de los compuestos aromáticos en un beneficio controlado de vainilla (*Vanilla planifolia*). V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones, Instituto Tecnológico de Veracruz, Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA). 1072-1080.

Shi X., Dalal X. S. & Jain A. C. (1991). Antioxidant behaviour of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food Chem. Toxicol.*, 29, 1-6.

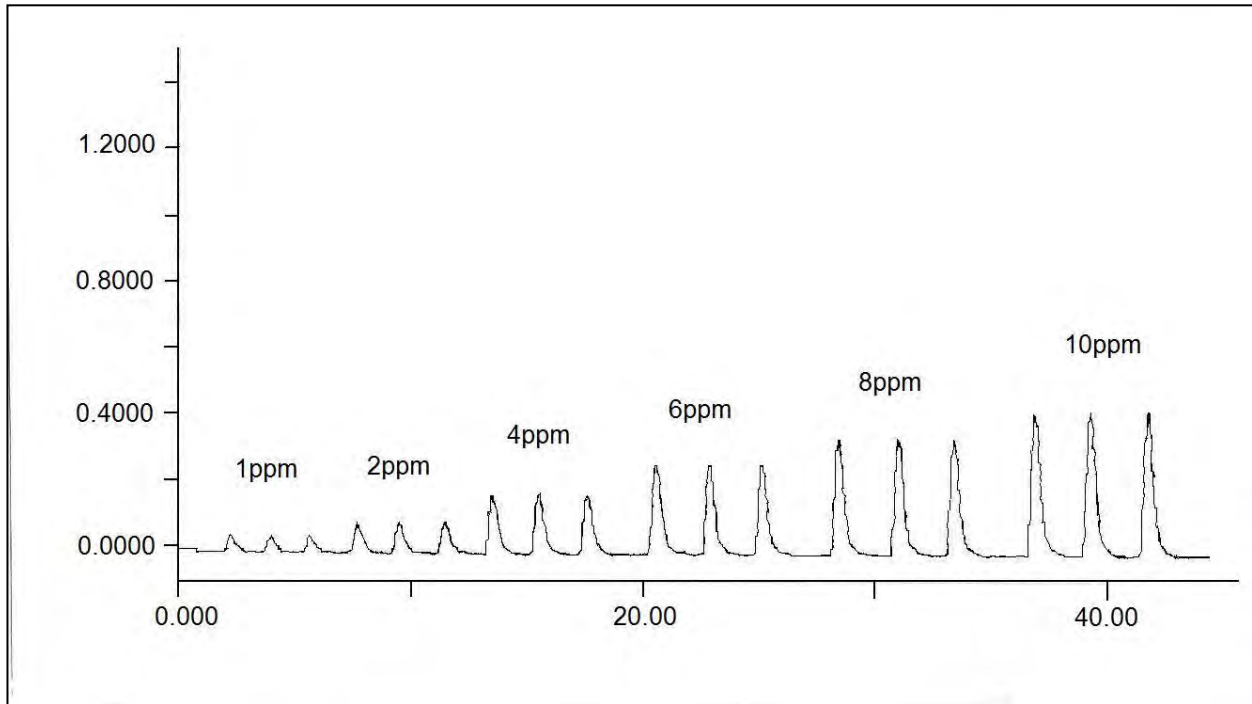
Singleton V. L., Orthofer R. & Lamuela – Raventós R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

Sinha A. K., Sharma U. K. & Sharma N. (2008). A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59 (4), 299-326.

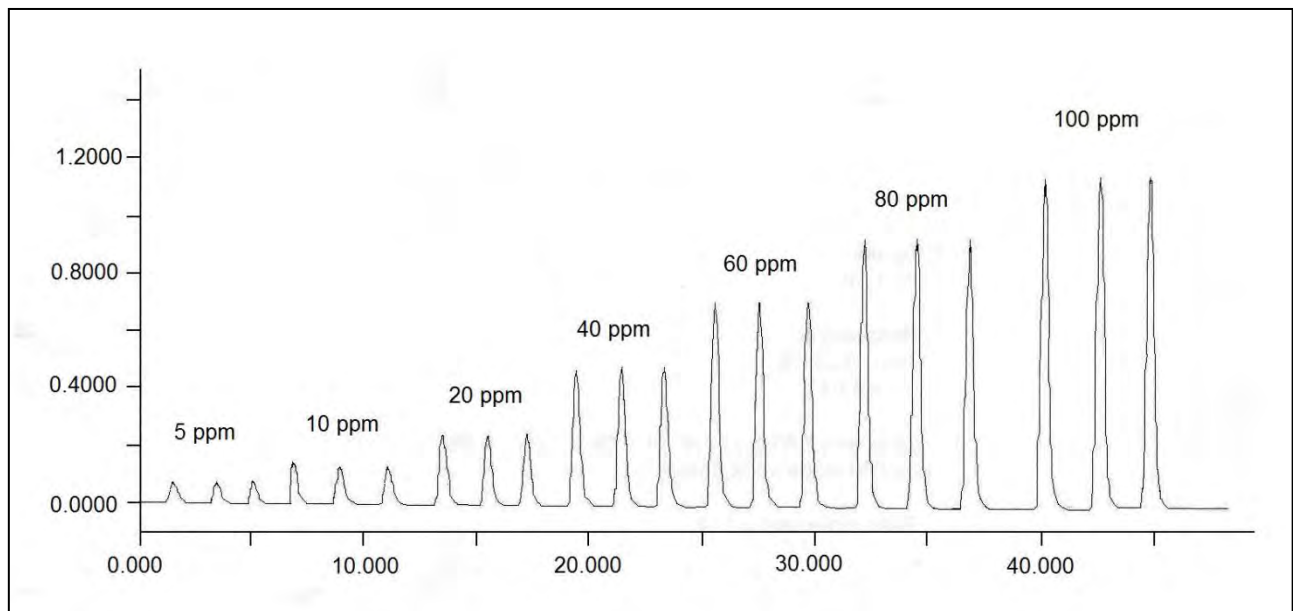
Sinha A. K., Verma S. C. & Sharma U. K. (2007). Development and validation of an RP- HPLC method for quantitative determination of vanillin and related phenolic compounds in *Vanilla planifolia*. *J. Sep. Sci.* 30, 15-20.

- Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J. O. & Dommes J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various test. *Food Chemistry*, 113, 1226-1233.
- Valcarcel M. & Luque de Castro M. D. (1984). Análisis por Inyección en Flujo. Departamento de Química Analítica. Universidad de Córdoba Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba. 449 pp.
- Valdez - Flores C. (2006). Determinación de vainillina en extractos obtenidos con microondas focalizadas y ultrasonidos acoplado la dilución y detección en línea. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química, División de Estudios de Posgrado. 97 pp.
- Valdez – Flores C. & Cañizares – Macías M. P. (2007). On - line dilution and detection of vanillin in vanilla extracts obtained by ultrasound. *Food Chemistry*, 105, 1201-1208.
- Waliszewski K. N., Márquez O. & Pardo V. T. (2009). Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean. *Food Chemistry*, 117, 196-203.
- Wong S. P., Leong L. P. & Koh J. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, 99, 775-783.
- Wright M. R. (2004). An Introduction to Chemical Kinetics. John Wiley & Sons, Gran Bretaña.
- Wu X., Beecher G. R., Holden J. M., Haytowitz D. B., Gebhardt S. E. & Prior R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4026-4037.
- Yanishlieva N. V., Marinova E. & Pokorny J. (2006). Natural antioxidant from herbs and spices. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 108, 776-793.
- Yanishlieva - Maslarova, N. V. (2001). Inhibición de la Oxidación. En *Antioxidantes de los Alimentos. Aplicaciones Prácticas*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. (págs. 23-68).
- Zulueta A., Esteve M. J. & Frígola A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114, 310-316.

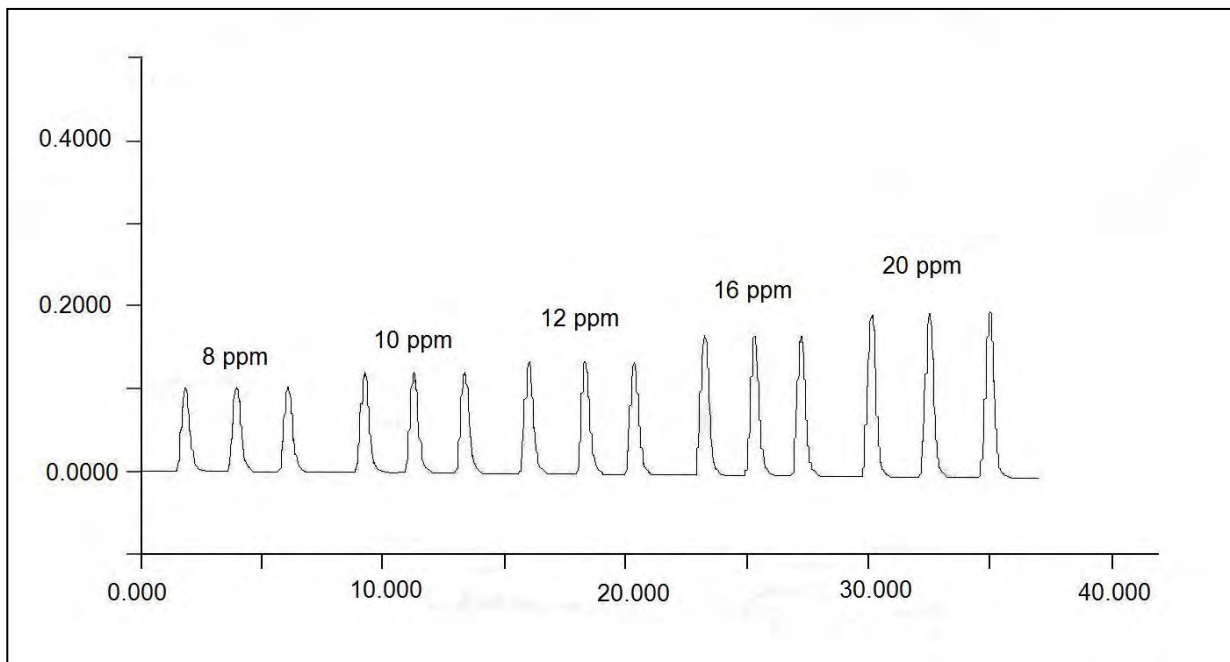
ANEXO



**Figura A.** Diagrama de disoluciones estándar de vainillina en un intervalo de concentración de 1 a 30 mg/L, obtenido con la configuración FIA señalada en la sección 3.7



**Figura B.** Diagrama de disoluciones estándar de ácido cafeico en un intervalo de concentración de 5 a 100 mg/L, obtenido con la configuración FIA señalada en la sección 3.9



**Figura C.** Diagrama de disoluciones estándar de vainillina en un intervalo de concentración de 8 a 20 mg/L, obtenido con la configuración FIA señalada en la sección 3.9