



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LOS ENSAYOS
PARA EVALUAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
MEDIANTE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUIMICA

PRESENTA:

TANIA PATRICIA LOZANO GARCÍA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor Pedro Villanueva González

VOCAL: Profesor: José Luz González Chávez

SECRETARIO: Profesor: José de Jesús García Valdés

1er. SUPLENTE: Profesor: Araceli Patricia Peña Álvarez

2° SUPLENTE: Profesor: Adrián de Santiago Zárate

Este trabajo se realizó en el laboratorio 113 edificio F, Facultad de química. Ciudad Universitaria, México D.F, bajo la dirección del Dr. Jesús García Valdés

Asesor del tema:

Dr. José de Jesús García Valdés

Sustentante:

Tania Patricia Lozano García

Dedicatoria

Mi trabajo y esfuerzo tiene un motor, una fuerza que ha creído en mi en todo momento, en cada paso en cada instante ha estado conmigo en buenas y malas siempre, por ello este trabajo es infinitamente dedicado a Dios, que me ha sorprendido en las millones de formas en las que se ha manifestado, GRACIAS por no abandonarme.

A las dos personas por las cuales estoy aquí, siempre dándome ánimos y que han estado conmigo, por que detrás de esta intensa lucha están ellos y no por restarles importancia, sino por que la mujer que soy y hasta donde he llegado ha sido gracias a su labor, mi más profunda admiración a ambos, por sus sacrificios, angustias, alegrías y demás, por compartir conmigo la vida, mis papas, Patty y Salvador.

A mis hermanas, Nubia Ariana y Yuly Daniela por su tiempo, preocupación, dedicación y sobre todo por su paciencia, chicas por que aunque nos duela seremos tres al infinito y más allá.

A los dos integrantes mas recientes de la familia Alan, por su apoyo incondicional y a Alan David que con su infancia e infinita alegría me han hecho tan feliz, por que espero aprender mas de ti.

A Iván y César por su amistad, confianza y ayuda, chicos los quiero, por que no se puede vivir con tanto benceno jajaj

A Rosa, Ernesto y Alina, por su tiempo, confianza, por compartir conmigo a su pequeña familia.

A una personita especial, que ha sabido ser un gran amigo del que he tenido las mejores palabras de ánimo y aprecio GRACIAS precioso HBR.

A los queretanos Benjamin por que desde que nos conocemos has creído en mi y me hechas porras, a mi niña linda, Giovanna, por tantas y tantas vivencias, por el rencuentro después de tanto tiempo y que parece que nunca nos separamos seguimos siendo amigas-hermanas. A Esmeralda juntas en buenas, malas y peores pero siempre a pie de cañon GRACIAS..., Hugo por tu ayuda, consejos y por esa amistad que trasciende fronteras. A todos aquellos con los que he compartido camino y que si los nombro uno a uno me quedare sin hojas a Arturo Álvarez, Frank, Tania, Toño, Collado, Ana Torres, Vero, Nare, Giovanni, Rafa, Ile, Edder...

A mis compañeras de laboratorio: Thalina, Roxana, Xochi, Suani, Sandra, por sus consejos ánimos y apoyo.

A una persona que me dio la oportunidad al creer en mí, en mi trabajo pero sobre todo por que compartió conmigo una amistad GRACIAS.

A dos personitas que ya casi al final de este trabajo las conocí, Damaris y Gladis, por regalarme sus inmensas ganas de salir adelante y recordarme que aun en las mas difíciles de las situaciones si se quiere se puede.

Y finalmente, pero con la misma importancia que en un principio a mi Universidad por darme la oportunidad de vestirme con su gloria al convertirme en una profesionista, a mi facultad de química, entrañablemente parte de mi vida formativa en el área de la química.

Por mi raza hablará el espíritu.

Agradecimientos

A la UNAM y a la Facultad de Química por brindarme una formación de calidad y por permitirme ser orgullosamente universitaria.

Al Dr. Jesús García por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y por el apoyo durante la realización de éste proyecto.

A los profesores Pedro Villanueva y José Luz González por la dedicación en la revisión de éste trabajo, y el enriquecimiento del mismo con su invaluable observaciones y sugerencias.

A mi familia por confiar en mí.

A la vida y desde luego a Dios.

...Me gustaría decir que: me gusta la gente con capacidad para asumir las consecuencias de sus acciones; la gente que arriesga lo cierto por lo incierto para ir detrás de un sueño; la gente que cultiva sus sueños hasta que sus sueños se apoderan de su propia realidad. Me gusta la gente capaz de entender que el mayor error del ser humano es intentar sacarse de la cabeza aquello que no sale del corazón.... me gusta la gente q busca soluciones... Mario Benedetti, La gente que me gusta

ÍNDICE

Índice General.	1
i. Abreviaturas.	6
ii. Índice de figuras.	11
iii. Resumen.	15
1. Introducción.	17
2. Antecedentes.	19
3. Justificación.	21
4. Objetivos.	22
5. Hipótesis.	23
6. Metodología.	24
7. Radicales libres y antioxidantes.	27
7.1. Oxígeno.	30
7.1.1. Especies reactivas de oxígeno ROS.	31
7.1.1.1. Generalidades.	31
7.1.1.2. Formación de las ROS:	34
7.1.1.2.1. Oxígeno singulete $^1\text{O}_2$.	35
7.1.1.2.2. Anión hidroxilo HO^\bullet .	35
7.1.1.2.3. Ácido hipocloroso (HClO).	37
7.1.1.2.4. Radical superóxido $\text{O}^{\bullet-2}$, Peróxido de hidrógeno H_2O_2 ,	
Radical peroxil ROO^\bullet .	37
7.2. Peroxidación lipídica.	38
7.2.1. ROS, el oxígeno y los radicales libres en las células.	39

7.3. Prooxidante y antioxidante términos no análogos a reductor y oxidante.	42
7.4. Clasificación de los antioxidantes.	44
7.4.1. Antioxidantes endógenos – exógenos.	44
7.4.2. Antioxidantes primarios- secundarios.	44
7.4.3. Antioxidantes de acuerdo a su origen.	45
7.4.4. Antioxidantes de acuerdo al mecanismo de ataque a radicales libres.	45
7.5. Mecanismos antioxidantes.	45
7.5.1. Prevención.	46
7.5.2. Intercepción.	46
7.5.2.1. Enzimáticos.	
7.5.2.2. No- enzimáticos.	
7.5.3. Reparación.	48
7.6. Medida de la capacidad antioxidante.	49
7.6.1. Ensayos basados en la transferencia de electrones.	52
7.6.2. Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno.	53
7.6.3. Diferencia entre los mecanismos de acción de los antioxidantes, transferencia de átomos de hidrógeno o transferencia de electrones.	54
7.7. ¿Qué compuestos químicos podemos utilizar como antioxidantes?	55
7.7.1. Compuestos químicos con actividad antioxidante, que no son polifenoles.	56

7.7.2. Compuestos Fenólicos.	57
7.7.2.1. Clasificación de los compuestos fenólicos.	58
7.7.2.2. Polifenoles: Flavonoides, Xantonas, Vaniloides.	62
7.7.2.3. Flavonoide.	62
7.7.2.4. Xantonas.	63
7.7.2.5. Vaniloides.	64
7.7.2.6. Propofol.	64
7.7.2.7. Morfina.	65
7.7.2.8. Isoespintanol.	66
7.7.2.9. Melatonina.	66
7.7.2.10. Ácido cafeico.	67
7.7.3. Mecanismos antioxidantes de los polifenoles.	68
7.7.4. Especies reactivas de oxígeno y los antioxidantes.	69
7.8. Determinación de la capacidad secuestradora.	69
Ensayos para la evaluación de la capacidad antioxidante.	
7.8.1. Ensayos que implica directamente una especie reactiva de oxígeno.	70
7.8.1.1. Radical peroxilo ROO [•] .	70
7.8.1.2. Anión radical superoxido (O ₂ ^{•-}).	71
7.8.1.3. Peroxido de hidrógeno H ₂ O ₂ .	71
7.8.1.4. Radical hidroxilo [•] OH.	72
7.8.1.5. Oxígeno singulete (¹ O ₂).	73

7.8.2. Ensayos para conocer la actividad antioxidante de un compuesto.	73
7.8.2.6. Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)	74
7.8.2.7. Parámetro de análisis de la intercepción total del radical peroxilo (TRAP).	76
7.8.2.8. Capacidad total de barrido del radical oxígeno (TOSC)	77
7.8.2.9. Ensayo de blanqueamiento de Crocin	78
7.8.2.10. Método del ácido tiobarbitúrico (ATB).	79
7.8.2.11. Linoleico.	80
7.8.2.12. Análisis de blanqueamiento de la molécula de caroteno	81
7.8.2.13. Capacidad de absorción de radicales hidroxilo (HORAC).	82
7.8.2.14. Capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (TEAC).	82
7.8.2.15. Ensayo de captura del radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH).	84
7.8.2.16. Capacidad del plasma para reducir el ion férrico (FRAP).	85
7.8.2.17. Folin-Ciocalteu capacidad reductora y contenido fenólico (FC).	87
7.8.2.18. Ensayo de la captura del radical N,N-dimetil- <i>p</i> -fenilenediamina (DMPD)	88
7.8.2.19. Medición de la capacidad antioxidante por reducción del ión cobre (II) (CUPRAC)	89
7.8.2.20. Resonancia paramagnética electrónica (RPE)	90
7.8.3. Métodos Electroquímicos: Voltamperometría Cíclica, Herramienta para la evaluación de la capacidad reductora de compuestos químicos.	92
8. TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS.	94
8.1. Electroquímica.	94
8.1.1. Reacciones redox.	94
8.1.2. Transferencia de carga en una reacción electroquímica.	95

8.1.2.1.	Transporte de materia por migración.	95
8.1.2.2.	Transporte de materia por difusión	96
8.1.2.3.	Transporte de materia por convección	96
8.2.	Celda Electroquímica.	98
8.2.3.	Electrodo.	98
8.2.3.1.	Tipos de Electroodos.	99
8.2.3.2.	Sistema de tres electrodos.	100
8.2.3.3.	Ventajas y desventajas de un sistema de tres electrodos.	101
8.2.4.	Disolvente.	101
8.2.5.	Electrolito Soporte.	103
8.2.6.	Atmósfera de trabajo.	103
8.3.	Voltamperometría.	104
8.3.7.	Técnicas voltamperométricas en régimen de difusión pura.	104
8.3.8.	Métodos electroquímicos auxiliares en la medida de la capacidad antioxidante.	108
8.3.9.	Estudio de la capsaicina con técnicas electroquímicas	117
9.	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.	121
9.1.	Cromatografía líquida.	121
9.2.	Cromatografía líquida de alta resolución.	122
9.2.1.	Instrumentación.	122
9.2.2.	Detectores.	124
9.2.2.1.	Detectores de absorbancia.	125
9.2.2.2.	Detectores de absorbancia de radiación ultravioleta con filtros.	125
9.2.2.3.	Detectores de absorbancia de radiación ultravioleta con monocromadores.	126

9.2.2.4.	Detectores de absorbancia de radiación de infrarrojo.	126
9.2.2.5.	Detectores de radiación fluorescente.	126
9.2.2.6.	Detectores de índice de refracción.	127
9.2.2.7.	Detector de dispersión de luz.	127
9.2.2.8.	Detectores electroquímicos.	127
9.3.	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector electroquímico, herramienta para la evaluación de la capacidad antioxidante. Cromatografía líquida de alta resolución como herramienta importante en la determinación de capacidad antioxidante de compuestos químicos, con especial atención a la capsaicina.	129
10.	Conclusiones.	138
11.	Bibliografía.	139

i.- Abreviaturas

A ₀	Absorbancia control
A ₁	Absorbancia muestra
KMBA	Ácido α -ceto- γ -metilbutírico
CAF	Ácido cafeíco
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil cromano-2-carboxílico
FC	Análisis total de los fenoles Folin-Ciocalteu
AOxH	Antioxidante
O ₂ ⁻	Anión superóxido
ASTA	Organización americana del comercio de especies.
ABC	Área Bajo la Curva
S	Área bajo la onda anódica
BAP	balance antioxidante y prooxidant
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CAOxH	capacidad antioxidante
Cap	Capsaicina

ArOH	Compuesto fenólico
I_a	Corriente anódica
i_p	Corriente de pico
CBA	Crocin bleaching assay (siglas en inglés)
CUPRAC	Cupric reducing antioxidant potential (siglas en inglés)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ELSD	Detector de dispersión de luz
ECD	Detectores electroquímicos
DCap	Dihidrocapsaicina
EINP	Electrodo idealmente no polarizable
EIP	Electrodo idealmente polarizable
EPR	Electron Paramagnetic Resonance (siglas en inglés)
GAEL	Equivalente del ácido gálico
TE	Equivalente de Trolox
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry (siglas en inglés)
GSH	Glutación
HORAC	Hydroxyl radical absorbance capacity (siglas en inglés)
HPLC-ED	High performance liquid chromatography electrochemical detection (siglas en inglés)
Kcal o Cal	kilocalorías

ABREVIATURAS

RH	lípidos
M	Molar
LDL	Low-density lipoproteína (siglas en inglés)
MDA	Malondialdehído
μM	micromolar
mM	milimolar
mV	milivoltio
nm	nanómetro
DMPD	N,N-dimetil- <i>p</i> -fenilenediamine (siglas en inglés)
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singulete
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity (siglas en inglés)
ppm	partes por millón
PBN	Phenyl N- <i>tert</i> -butylnitrone (siglas en inglés)
$E_{1/2}$	Potencial de media onda
E_f	Potencial final
E_i	Potencial inicial
ProOx	Pro oxidante
UV	Radiación ultravioleta
RO^\bullet	Radical Alcoxilo

ABREVIATURAS

HO ₂ [•]	Radical Hidroperoxil
RL	Radicales Libres
HO [•]	Radical hidroxilo
ROO [•]	Radical peroxilo
ROS	Reactive oxygen species (siglas en inglés)
RNS	Reactive nitrogen species (siglas en inglés)
REDOX	Reacciones óxido reducción
ARN	Ácido ribonucleico
s	segundos
SHU	Scoville heat units (siglas en inglés)
SOD	superóxido dismutasa
NBT	Tetrazolium del nitroblue (siglas en inglés)
FRAP	The ferric reducing activity/antioxidant power (siglas en inglés)
TOSC	Total oxyradical scavenging capacity (siglas en inglés)
TRAP	Total Radical trapping power (siglas en inglés)
HAT	Hydrogen atom transfer (siglas en inglés)
ET	Electron transfer (siglas en inglés).

ABREVIATURAS

TEAC	Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity Trolox (siglas en inglés)
VCEAC	Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (siglas en inglés)
V	Voltio
VC	Voltamperometría cíclica
DPPH [•]	1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl free radical (siglas en inglés)
ABTS	2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (siglas en inglés)
ABAP	2,2'-azobis 2-amidinopropano
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihidrocloro
TMB	3,3', 5, 5' -Tetrametilbenzidina.

ii.- Índice de Figuras

7.1	Formación de Radicales libres.	29
7.2	Configuración electrónica del oxígeno molecular (O ₂).	33
7.3	Generación de las especies reactivas de oxígeno a partir de oxígeno molecular.	34
7.4	Factores endógenos promotores de especies reactivas de oxígeno.	36
7.5	Intercambio electrónico en la molécula de O ₂ , formación de otras especies reactivas de O ₂ .	36
7.6	Configuración electrónica de especies reactivas de oxígeno.	37
7.7	Reacción en cadena de radicales libres de O ₂ . Peroxidación lipídica.	42
7.8	Producción de oxidantes en la mitocondria.	43
7.9	Generación de especies reactivas de oxígeno en la célula.	44
7.10	Daños ocasionados a la célula por factores externos en la formación de radicales libres.	45
7.11	El estrés oxidativo producto del desbalance radicales libres y antioxidantes.	47
7.12	Esquema de ensayos competitivos y no competitivos.	55
7.13	Variación de la absorbancia en función de la concentración de antioxidantes.	57
7.14	Estructura química que comparten la mayoría de los antioxidantes.	60
7.15	Estructura de la escopoletina y el ácido homovainílico, moléculas oxidables útiles en los ensayos de secuestro del H ₂ O ₂ .	77

7.16	Molécula blanco, en la determinación de la capacidad antioxidante por ensayo ORAC.	80
7.17	Pro-oxidante generador de ROO [•] es el compuesto 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihidrocloro (AAPH), para los ensayos ORAC, TRAP, LINOLEICO.	80
7.18	ORAC su cuantificación se basa en el área bajo la curva (ABC).	81
7.19	Molécula blanco, en la determinación de la capacidad antioxidante por ensayo TRAP, HORAC.	82
7.20	Proceso de oxidación del KMBA a Etileno.	83
7.21	Molécula blanco caroteno de Crocin.	84
7.22	Reacción TBA y MDA para obtener un producto colorido.	86
7.23	Molécula blanco, en la determinación de la capacidad antioxidante por ensayo LINOLEICO.	86
7.24	Molécula blanco, en la determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo de blanqueamiento de la molécula de caroteno.	87
7.25	Ensayo TEAC se basa en la inhibición del radical catiónico ABTS.	89
7.26	Ensayo DPPH se basa en la inhibición del radical DPPH estable.	91
7.27	Ensayo FRAP se basa en la reducción al complejo ferroso [Fe (II) - (TPTZ) 2] ²⁺ a un complejo colorido.	93
7.28	Ensayo DMPD se basa en la inhibición del radical catiónico <i>N,N</i> -dimetil- <i>p</i> -fenilendiamina.	96
7.29	Ensayo de la capacidad antioxidante por reducción del ión cobre (II), se basa en la reducción del complejo bis (neocuproina) cobre (II).	97
8.1	La materia se puede acercar al electrodo de tres formas: migración, difusión y convección.	102

8.2	La especie electroactiva es transportada por difusión y por migración.	103
8.3	Existe un gradiente de concentración, a medida que pasa el tiempo se hace menos pronunciado.	104
8.4	Celda Electroquímica: el electrodo representa el conductor electrónico y el electrolito figura como el conductor iónico.	105
8.5	Tipos de electrodos: "electrodo idealmente polarizable" (EIP) y "electrodo idealmente no polarizable" (EINP).	107
8.6	Sistema de tres electrodos	108
8.7	Barrido de potencial inicia en E_i y finaliza en E_f .	112
8.8	Señal de excitación potencial tiempo triangular, utilizada en voltamperometría cíclica.	114
8.9	Voltamperograma cíclico de $K_3Fe(CN)_6$ en KNO_3 1 M en un electrodo de Pt.	115
8.10	Voltamperograma cíclico, dependiente del pH.	119
8.11	Voltamperograma cíclico para Capsaicina.	126
8.12	Mecanismo de oxidación de la Capsaicina.	127
8.13	Dicapsaicina, dímero producto de la oxidación de la Capsaicina.	128
9.1	Componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución típico.	131
9.2	Detector de absorbancia.	133
9.3	Cromatograma HPLC- UV del chile jalapeño	142
9.4	Cromatograma HPLC- UV del chile habanero.	143
9.5	Estructura externa de un chile.	144

9. 6	Cromatograma de Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector electroquímico (100 mg mL^{-1}).	144
------	--	-----

iii. Resumen

La formación excesiva de radicales libres, en específico especies reactivas de oxígeno, consecuencia de la exposición prolongada a factores como la radiación ultravioleta, la contaminación incrementan las condiciones de estrés oxidativo dentro de la célula ocasionando apoptosis, es decir, causa deterioro oxidativo de productos alimenticios así como en la patogénesis de enfermedades como: arteriosclerosis, diabetes mellitus, inflamación crónica, desordenes neurodegenerativos y algunos tipos de cáncer^[202,213, 214]. La célula de forma natural produce antioxidantes (AOxH) que previenen esta condición, sin embargo continuamente se expone a condiciones patológicas, entonces el mecanismo de defensa antioxidante es insuficiente, así es como surge la necesidad de introducir a la célula sustancias que contribuyan a disminuir el daño ocasionado, en su mayoría estos compuestos son extractos de plantas^[129]. Se define a un antioxidante como una especie que en bajas concentraciones, en relación con el sustrato oxidable, evita o previene la oxidación de este último, por ejemplo algunas enzimas, así como algunas sustancias quelantes de los metales que están involucrados en la generación de especies reactivas de oxígeno. Las especies a oxidar reaccionan con el antioxidante y no con el sustrato original, es decir, el antioxidante reemplaza al sustrato^[85,86].

Los compuestos extraídos de fuentes naturales en su mayoría previenen la peroxidación lipídica, este hecho hace pensar que se pueden emplear como antioxidantes, los ejemplos que se han estudiado a fondo son: polifenoles^[165, 195], flavonoides^[143], xantonas^[139, 210] y vaniloides (ejemplo de interés: Capsaicina)^[145]. Los antioxidantes de origen natural, son de gran interés porque son consumidos en la dieta sin necesidad de suministrarlos de forma artificial^[142]. Sin embargo la evaluación de la capacidad antioxidante de una sustancia, no es tan trivial como podría parecer, ya que la mayoría de los compuestos en estudio provienen de un conjunto de sustancia similares, esto implica que la evaluación directa de la capacidad antioxidante no ha sido propiamente investigada, y se limita a ensayos indirectos como: ORAC, TRAP, TOSC, ATB, Linoleico, ensayo de blanqueamiento de la molécula de caroteno, HORAC, TEAC, DPPH, FRAP, FC, DMPD, CUPRAC^[141,148, 183, 229], donde el antioxidante compite por la especie reactiva y la capacidad antioxidante se mide por comparación con sustancias conocidas como el trolox, α -tocoferol, el BHA y el BHT. Se han sugerido varias metodologías para la medición de la capacidad total antioxidante, éstas se basan en la capacidad que tiene la muestra de atrapar específicamente a las especies reactivas de oxígeno, sin embargo no es suficiente para la evaluación completa del antioxidante^[151]. Se ha estudiado (Chevion, 1997) el uso de técnicas electroquímicas como herramienta en la evaluación de la capacidad total antioxidante de moléculas de bajo peso molecular, éstas pueden indicar la habilidad de los compuestos, para donar electrones en un determinado

potencial anódico. La capacidad total antioxidante de una muestra, evaluada por métodos electroquímicos, se ha definido en función de la combinación de dos parámetros. Primero el potencial de oxidación del antioxidante, caracterizado por $E_{1/2}$, y que refleja específicamente el poder reductor de cada componente. El segundo parámetro, es la intensidad de corriente, indicador de la concentración de la especie. La integración de ambos factores equivale a la capacidad antioxidante total de la muestra, sin necesidad de determinar la capacidad antioxidante de cada componente ^[40,41, 42, 186].

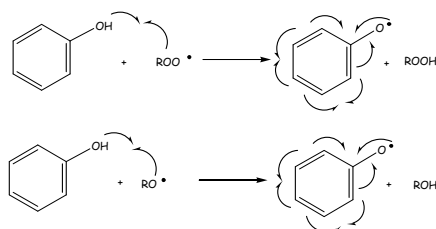
A lo largo de este trabajo se describirá la importancia de los radicales libres, antioxidantes y de la capacidad antioxidante, así como los diferentes ensayos que permiten su evaluación. De la misma forma una breve reseña de la capacidad antioxidante de un extracto natural, la capsaicina, principal compuesto causante de la pungencia de los chiles, perteneciente a un conjunto de sustancias llamadas capsaicinoides, que comparten una estructura aromática llamada grupo vanilil ^[145, 160]. La capsaicina, se utiliza frecuentemente por sus propiedades como antiartrítico, analgésico, antioxidante y agente anticancerígeno. Biológicamente la capsaicina ha sido ligada al receptor potencial del tipo 1 vanilloide receptor transitorio (conocido como, TRPV1), un canal iónico que responde naturalmente a los estímulos nocivos, tales como temperaturas altas y pH ácido, es decir, es la responsable de la sensación de ardor experimentada después de comer los chiles picantes. Por lo anterior se propone a la capsaicina como una sustancia con propiedades antioxidantes ^[182,205].

1.- Introducción:

El objetivo de esta revisión, es el estudio de los ensayos más importantes que se emplean en la evaluación de la capacidad antioxidante de compuestos químicos. La cual se relaciona desde un punto de vista cualitativo así como cuantitativo para compuestos polifenólicos ^[1]. De forma breve se expone que la evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* requiere el uso de diversos métodos que proporcionen una información diferente y complementaria. Los métodos *in vivo* tienen la ventaja de valorar las transformaciones metabólicas que sufren los fenoles en el organismo y que modifican su actividad ^[8,138].

Las especies reactivas de oxígeno se producen de manera natural en la célula, ya que son parte de los diferentes procesos oxidativos ^[23]. El desajuste en las condiciones normales, por exposición a fuentes de radiación y a humo de cigarro, ocasionan la desenfadada producción de especies reactivas de oxígeno, principalmente del radical más tóxico: *OH. Las ROS son clave en el deterioro oxidativo de productos alimenticios así como en diversas patogénesis: arterioesclerosis, diabetes mellitus, inflamación crónica, desórdenes neurodegenerativos y algunos tipos de cáncer. El organismo dispone de mecanismos de defensa antioxidante frente a las especies reactivas de oxígeno, que comprenden sistemas enzimáticos y no enzimáticos ^[23, 28,37]. Ciertas enzimas neutralizan las especies reactivas. Los sistemas defensivos no enzimáticos, abarcan una serie de compuestos antioxidantes como albúmina, celuloplasmina, transferrina, glutatión, bilirrubina, ácido úrico, ubiquinona o melatonina. En ciertas situaciones extremas, estas defensas no son suficientes y las especies reactivas producen daño oxidativo, tanto en biomoléculas como en componentes celulares. Los antioxidantes no sólo previenen la generación de especies reactivas de oxígeno, sino que pueden interceptar a éstas especies y los convierte en no reactivas y finalmente pueden reparar el daño cuando los dos mecanismos anteriores no son efectivos ^[53, 58].

Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Se sintetizan como metabolitos secundarios con funciones de defensa, y son en gran medida responsables de las propiedades del color, la astringencia, el sabor y aroma de los vegetales. Se encuentran en las verduras y frutas, y en productos derivados como el vino o la cerveza. Todos tienen en su estructura uno o más anillos aromáticos con al menos un sustituyente hidroxilo. Su estructura química es propicia para secuestrar radicales libres, debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno desde el grupo hidroxilo aromático puede ser donado a la especie radical, y produce una estructura estable, quinona, que soporta al electrón desapareado ^[50, 55, 66].



La actividad antioxidante de los polifenoles depende del número y la localización de los grupos hidroxilo que contiene en su estructura. Además de su actividad antioxidante, se han atribuido otras propiedades biológicas a los compuestos fenólicos: inhiben la agregación plaquetaria y ejercen como agentes vaso relajantes, antiinflamatorios y anticancerígenos ^[66].

Se han sugerido varias metodologías para la medición de la capacidad total antioxidante de muestras biológicas como sangre, otros fluidos corporales y extractos de plantas. Estos ensayos se basan en la capacidad que tiene la muestra de atrapar específicamente a las especies reactivas de oxígeno, pero es insuficiente para evaluar la capacidad específica de un antioxidante en una mezcla compleja ya que son aditivos los efectos de cada componente. Se ha propuesto el uso de técnicas electroquímicas en la evaluación de la capacidad total antioxidante de moléculas de bajo peso molecular y que discrimine mediante el potencial redox el aporte de cada uno de los componentes. Estas técnicas pueden indicar la habilidad de los compuestos para donar electrones a un valor de potencial anódico particular, además de la capacidad antioxidante total dependiendo del medio de reacción ^[71, 116, 138, 141].

2.- Antecedentes.

Se han realizado diversos estudios enfocados a la medición de la capacidad antioxidante de compuestos químicos de origen natural, todos ellos comienzan en un punto importante que es el daño ocasionado por los radicales libres en las células y como precursores de diferentes patologías, estas investigaciones tienen su origen en 1954, cuando Rebeca Gerschman y Daniel Gilbert, sugieren por primera vez que los radicales libres eran agentes tóxicos y generadores de enfermedades. Describen a los radicales libres como moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón impar en la órbita externa y una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Dos años después, 1956, Herman Deham, sugiere que estas especies tienen un papel fisiológico, particularmente en el proceso del envejecimiento ^[233, 235].

Los principales estudios respecto a antioxidantes fueron realizados por Halliwell, inician en 1984 ^[85] con una profunda explicación de las características químicas del oxígeno, su importancia biológica y principales reacciones metabólicas en la que están involucradas las especies reactivas de oxígeno. Sus investigaciones hacen referencia a los diferentes mecanismos antioxidantes y a los efectos de las especies reactivas de oxígeno causantes de estrés oxidativo (Halliwell 1987) ^[86], en algunos casos contribuyó en la caracterización de antioxidantes y en medición de la capacidad antioxidante en medios de importancia biológica (Halliwell, Aeschbacht 1995 y Halliwell, Gutteridge 1995) ^[88,89]. Halliwell es precursor de estas investigaciones, pero existen infinidad de artículos que describen los diferentes ensayos que se puede utilizar para este fin, lo que ha conducido a tratar de unificar todos los criterios posibles que permitan la generalización de enfoque, un trabajo importante es el de Magalhaes en el 2008 ^[138], el cual explica los diferentes ensayos indirectos, el mecanismo que siguen y el esquema biológico al que se adaptan, se hace una clara diferencia entre las especies reactivas de oxígeno y las de nitrógeno, de mayor importancia biológica. Además de proponer los requisitos básicos que se deben considerar en el momento de elegir un ensayo, que se adecue a los objetivos de cada investigación.

Este trabajo se complementa con ensayos biológicos Kohen 2002 ^[119], en los cuales integran diferentes perspectivas enfocadas al estrés oxidativo, causas y consecuencias, para al final presentar las evidencias biológicas de lo que ocurre en los tejidos a causa de este fenómeno. En el trabajo de Magalhaes, se menciona brevemente el uso de las técnicas electroquímicas como auxiliar en la medida de la capacidad antioxidante, estos estudios que se enfocan directamente en técnicas electroquímicas, son los realizados por Chevion 1997 ^[40,41], en los que se propone la evaluación de la capacidad antioxidante de compuestos de bajo peso molecular, en fluidos corporales, ya que éstos actúan de forma directa con las especies reactivas de oxígeno, protegiendo a las células del estrés oxidativo, esto es resultado de las propiedades reductoras de las moléculas. En un trabajo posterior (Chevion 2000) ^[42], establece dos parámetros importantes en las determinaciones electroquímicas el área bajo la curva y la intensidad de corriente, relacionada estrechamente con las propiedades antioxidantes de los compuestos mencionados.

De nuestro interés es el compuesto causante de la pungencia de los chiles, perteneciente a la clase de los capsaicinoides, la capsaicina (Rosa 2002) ^[201]. En estudios anteriores acerca de la capsaicina sólo se determinan los niveles de pungencia de las diversas especies de chiles, que en un principio se realizaba con experimentos organolépticos, los resultados obtenidos son subjetivos ya que dependen de los individuos experimentales, posteriormente se comienza con el uso de técnicas cromatográficas. El usó la cromatografía de gases para cuantificar cada uno de los capsaicinoides, Suzuki 1947 y colaboradores ^[223] emplearon la espectroscopía ultravioleta para dicho fin, recientemente la Cromatografía Líquida de alta resolución ofrece precisión y exactitud con complicaciones mínimas. En el caso de la capsaicina se ha utilizado Cromatografía Líquida de alta resolución acoplada a un detector para el estudio del contenido de capsaicina en varias partes del fruto de Capsicum (Supalkova, 2007) ^[220], además de la identificación y cuantificación de capsaicinoides tanto los que provocan la pungencia en los chiles, así como de los capsaicinoides no pungentes (Singh 2009)^[216]. Y finalmente, se propuso el uso de voltamperometría de redisolución de especies adsorbidas mediante pulsos diferenciales para la cuantificación del picor de diferentes salsas

picantes, este mismo estudio permitió la elucidación del mecanismo óxido reducción que acompaña al fenómeno electroquímico de la capsaicina (Kachoosangui 2008)^[111].

3. Justificación

La formación de las especies reactivas de oxígeno (ROS: H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, O_2^{\bullet} , $\bullet OH$) en condiciones de estrés oxidativo ocasionan la muerte celular. De manera natural la célula produce antioxidantes que previenen esta condición, sin embargo al estar expuesta a condiciones patológicas, el mecanismo de defensa antioxidante es insuficiente, por lo que se ha visto la necesidad de introducir a la célula sustancias que contribuyan a disminuir el daño ocasionado, en su mayoría estos compuestos son extractos de plantas, que en su estructura cuentan con componente fenólico o bien un derivado de él. Se han empleado diversos ensayos para evaluar la capacidad antioxidante, sin embargo éstos se han enfocado a mediciones indirectas a través de la formación de complejos, del cual la contribución en la medida de la capacidad antioxidante no es tan evidente, en algunos casos, los compuestos se estudian de manera aislada y no en conjunto, como se encuentra en los tejidos o en los alimentos. Se ha propuesto el empleo de las técnicas electroquímicas para evaluar la capacidad antioxidante de una matriz compleja, se aprovecha que cada componente tiene un potencial óxido reducción y puede ser monitoreado por técnicas electroquímicas, voltamperometría cíclica o por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector electroquímico, ambas describen íntegramente la capacidad antioxidante y basan su análisis en la forma de la onda de corriente anódica, y potencial de media onda característica de cada componente en la mezcla.

4.- Objetivos

Objetivos generales

Recopilar de manera sencilla y clara los principales ensayos químicos que se emplean en la evaluación de la capacidad antioxidante de compuestos naturales, así como su relación con el posible empleo de técnicas electroquímicas como medida directa.

Objetivos particulares

Descripción breve de los principales conceptos involucrados radicales libres y su contraparte los antioxidantes.

Explicar de manera reducida los principales ensayos químicos para evaluar la capacidad antioxidante de un compuesto.

Resumir brevemente el uso de las técnicas electroquímicas en la evaluación de la capacidad antioxidante de compuestos químicos, principalmente de la capsaicina.

5.- Hipótesis

La capacidad antioxidante de un compuesto puede ser evaluado de forma directa. Si se parte de la premisa que los compuestos a evaluar (antioxidantes y especies reactivas), son activos electroquímicamente, es decir, tienen señales de óxido-reducción características, éstas se verán o no afectadas al modificar el medio de reacción, por ejemplo: en el caso de las especies reactivas su señal electroquímica característica sufrirá o no un cambio al adicionar al medio un antioxidante.

6. Metodología. ^[97]

Diseño de la investigación

El término diseño designa el esquema, prototipo o modelo que indica el conjunto de decisiones, pasos y actividades a realizar para guiar el curso de una investigación. A continuación se presenta el diseño de investigación a utilizar:

Planteamiento inicial: Punto de partida de la investigación, se expone el problema, se especifican los objetivos y surge la necesidad de la información

Planificación de la investigación: Una vez delimitados los objetos de la investigación, hay que dar un paso más y organizar el conjunto de operaciones básicas que permitan llevar a cabo el proceso de investigación.

Recopilación de datos. Una vez que se tiene una secuencia de la investigación se inicia la recopilación de información en libros, revistas, Internet, etc.

Análisis de resultados. Se revisa a fondo la información recopilada haciendo uso de distintas herramientas de análisis para generar resultados.

Elaboración del plan. Se comienza con una metodología que nos permite generar resultados y éstos a su vez llevar a las conclusiones pertinentes de la investigación. En esta parte también se hace mención de los textos que sirvieron de apoyo.

Tipos de investigación

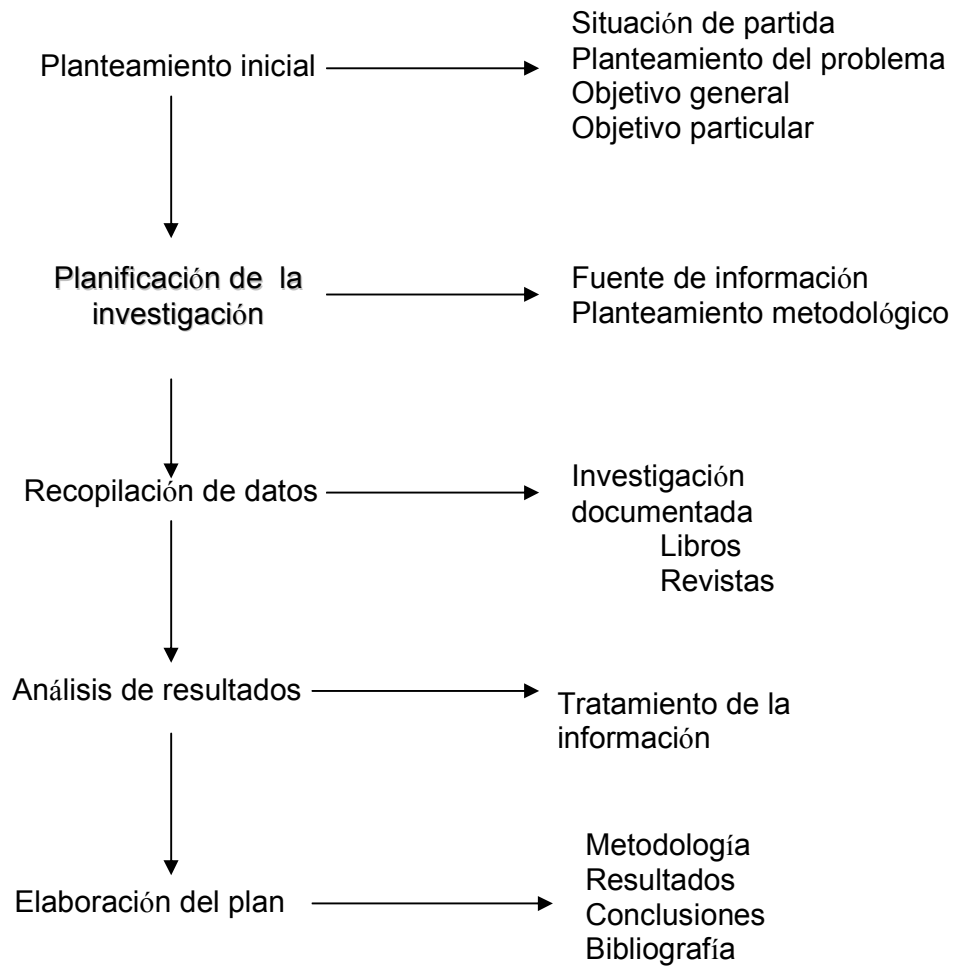
Investigación documental: La investigación documental que se utilizó durante toda nuestra investigación se apoyo en fuentes de carácter documental, éstos son documentos de cualquier especie, llámense libros, revistas, artículos, Internet, etc., con el fin de generar un escrito que tenga una conexión de ideas de varios autores, así como las mías. Para realizar esta investigación con éxito se reunieron, interpretaron y reportaron datos forma imparcial, correcta y clara.

Investigación exploratoria: Necesaria para obtener una investigación preliminar de la situación, lograr una formulación más precisa del problema identificando las diferentes variables para la toma de decisiones, con el fin de incluir mejores alternativas.

Las técnicas de investigación a utilizar serán:

Análisis de documentos: revisar y analizar principalmente información documental que contengan los temas: radicales libres, especies reactivas de oxígeno, antioxidantes, compuestos fenólicos, ensayos de capacidad antioxidante, técnicas voltamperométricas, cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector, capsaicina, entre otros.

Internet: Se utilizará por ser en la actualidad uno de los principales medios para obtener información y con facilidad.



7. Radicales libres y Antioxidantes.

La toxicidad de los radicales libres se comenzó a estudiar a finales de los años 30, cuando los químicos de la Asociación de Productores de Caucho Británico observaron grietas en la goma de más edad. El envejecimiento de esta goma se atribuyó a la capacidad de algunos átomos que poseen uno o más electrones no apareados, convirtiéndolos en especies altamente tóxicas, y que conlleva al fenómeno llamado oxidación de la materia orgánica. Más tarde en 1954, el Dr. Denham Harman propone extender la teoría de los radicales libres o de la oxidación a sistemas vivos, es decir, los radicales libres de oxígeno provocan el envejecimiento celular. Radicales libres que más tarde son llamados especies reactivas de oxígeno. Un radical libre se describe como los átomos o moléculas que en su estructura atómica presentan uno o más electrones no apareados girando en un orbital externo y una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Los radicales libres pueden ser catiónicos, aniónicos o bien de carga neutra, al tener electrones desapareados son extremadamente reactivos, por ejemplo: el átomo de hidrógeno, tiene un electrón desapareado y el oxígeno tiene dos electrones desapareados. Químicamente al ser inestable es muy activo debido a que el electrón desapareado busca otro electrón para regresar al estado de menor energía, es decir, el átomo tiene la necesidad de quitar un electrón a una molécula vecina, de manera estricta la "oxida", alterando su estructura, convirtiéndola a su vez en otro radical libre dispuesto a captar un electrón y recuperar el equilibrio atómico (Fig. 7.1) ^[85, 196, 205, 208, 234, 236]

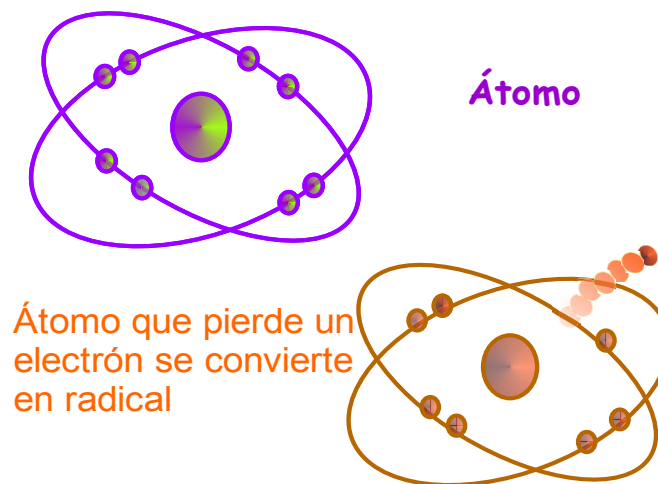
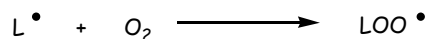


Fig. 7.1. Formación de radicales libres.

Los RL's se generan a partir de tres mecanismos principales ^[65, 85, 234, 236]:

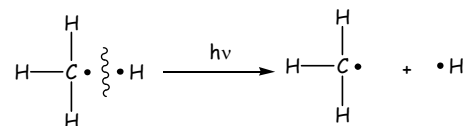
- ❖ Adición de un electrón proveniente de una molécula (L[•]), transferencia electrónica, proceso común en los sistemas biológicos.



- ❖ Pérdida de un protón (H⁺) de una molécula (LH).

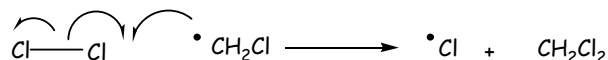


- ❖ Ruptura homolítica: En el enlace covalente de una molécula a cada fragmento le pertenece uno de los electrones apareados que lo forman, al elevar su temperatura de 450 a 600 °C se rompen las uniones del tipo C-C, C-H o C-O, esto también ocurre por la exposición a radiaciones como luz ultravioleta, rayos γ o rayos X que generan radicales [•]OH y H[•] radical.

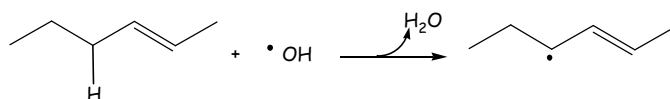


Si un radical libre cede un electrón a una molécula no radical o toma un electrón de ella, o simplemente se une a ella, se produce un nuevo radical, a este conjunto de reacciones se les conoce como, reacción en cadena. Los tipos de reacciones en cadena más importantes se enlistan a continuación ^[65, 85, 173].

- 1) El radical puede entrar en otra molécula, el aducto es la molécula con un electrón desapareado.



- 2) Un radical reactivo puede abstraer un átomo de hidrógeno de un enlace del tipo C-H.



En el caso de los seres vivos, los radicales libres son formados por fuentes internas, reacciones metabólicas, por ejemplo, el metabolismo de los alimentos, la respiración y fuentes exógenas (xenobióticos), como la contaminación industrial, tabaco, medicamentos, aditivos químicos en los alimentos procesados, pesticidas, rayos ultravioleta, ultrasonido, rayos X y rayos γ , iones metálicos, disolventes industriales, ozono, anestésicos, etc. Este conjunto de factores provocan la reducción incompleta del oxígeno, es decir la formación de radicales libres. El daño causado por los radicales libres al tomar electrones de los lípidos y proteínas presentes en la membrana celular, impiden que cumpla con sus funciones como el intercambio de nutrientes, la eliminación de los materiales de deshecho, lo que provoca que sea imposible el proceso de regeneración y reproducción celular. Así es como los radicales libres contribuyen al proceso de envejecimiento ^[66, 205, 208, 209].

Se han mencionado los aspectos negativos de los radicales libres, pero no todos los radicales libres son peligrosos, pues cumplen con funciones que ayudan al óptimo funcionamiento de la célula, por ejemplo: el sistema inmune crea radicales libres para matar virus y bacterias, si la producción de radicales libres sobrepasa la capacidad antioxidante defensa de la célula le ocasiona daños irreversibles. En los sistemas biológicos uno de los principales radicales libres es el oxígeno a partir de él se inician muchos procesos metabólicos de importancia, por ello a continuación de manera breve se describirán algunas propiedades.

Los radicales libres lesionan a las biomoléculas:

Cuadro 7.1. Daño que ocasionan los radicales libres en las biomoléculas.

Biomoléculas	Daño
Lípidos	Peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados en membranas y organelos y su relación con la formación de lipofuscina.
Carbohidratos	Despolimerización de los polisacáridos.
Proteínas	Oxidación de los puentes sulfhidrúlicos de las enzimas.
Ácidos nucleicos	Impidiendo la reproducción celular, hidroxilación de bases, escisión de tramos de DNA, mutaciones.

7.1. Oxígeno

El oxígeno apareció en cantidades significativas en la superficie de la tierra hace más de 2.5 mil millones de años, y la evidencia geológica apoya un origen biológico de la actividad fotosintética de las bacterias verdiazules (cianobacteria). Hoy en día el componente principal del aire seco es el nitrógeno (78 %), seguido por el oxígeno (21 %) una cantidad insignificante del presente total en la tierra, la mayoría se encuentra en las moléculas de agua y depósitos minerales de la corteza terrestre. El oxígeno como elemento existe en el aire como molécula diatómica, fue aislado y caracterizado entre 1772 y 1779 por Priestley, Lavoisier y Scheele, en su momento lo tres coincidieron en que los seres vivos necesitan oxígeno para existir, sin embargo, el exceso de oxígeno es causante de su deterioro. A ellos se les considera como precursores de la teoría de oxidación ^[1, 66, 184].

La molécula de oxígeno se considera un bi-radical, cuenta con dos electrones desapareados, cada uno localizado en un orbital de antienlace (π^*) diferente (Fig. 7.2). Teóricamente los electrones pueden tener spines antiparalelos $\pm 1/2$ de acuerdo con el principio de Pauli, sin embargo los dos electrones del oxígeno al tener el mismo spin, impiden que capte dos electrones simultáneamente en las reacciones en la que interviene. Esta transferencia de electrones de uno a la vez le confiere estabilidad y permite explicar porqué el oxígeno retarda la reacción con radicales, así como la existencia de metales de transición en algunas oxigenasas u oxidasas en sistemas biológicos y porqué lo encontramos en el aire. El oxígeno oxida de manera lenta a un no radical al aceptar un par de electrones de él, ambos electrones deben tener el mismo espin para quedar en los espacios vacantes en los orbitales de tipo π^* , esto le concede ser un buen oxidante (captar electrones de las moléculas que oxida). En un caso contrario, reacciona a menudo excepcionalmente rápido con otros radicales por la sola transferencia de los electrones ^[65, 208].

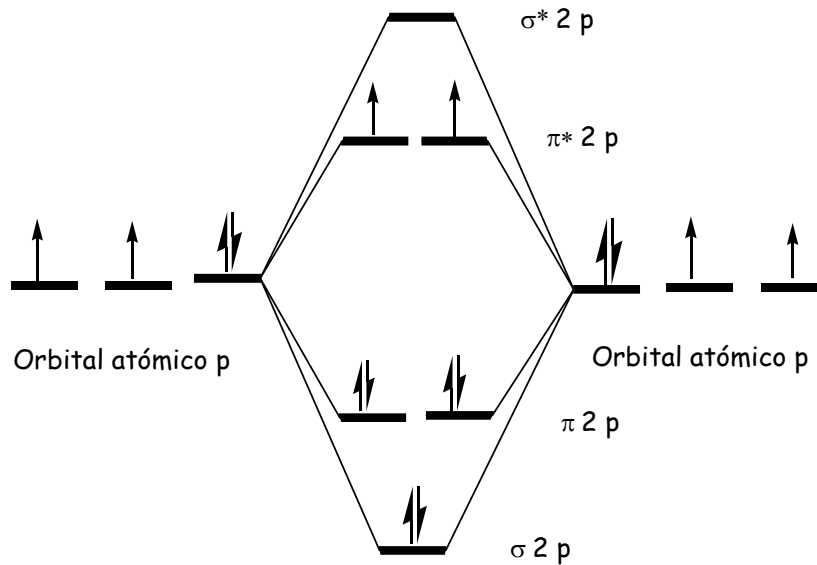


Fig. 7.2 Configuración electrónica del oxígeno molecular.

En la respiración celular el oxígeno funge como aceptor terminal de electrones. Sin embargo la exposición prolongada de los organismos vivos a oxígeno provoca lesiones celulares, cuyos efectos se van acumulando con la edad, a esto se le conoce como envejecimiento. Los efectos de la lesión oxidativa del oxígeno son producto de un porcentaje pequeño de dichas moléculas, que al ser utilizadas por el organismo se convierten en intermediarios reactivos del oxígeno que interaccionan con las biomoléculas de todo tipo: lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.

7.1.1. Especies reactivas de oxígeno

7.1.1.1. Generalidades

Guyton de Morveau en 1787 se convirtió en el primer químico en utilizar el término radical libre al describir una entidad química que forma un ácido cuando reacciona con oxígeno. En los seres vivos el radical libre de mayor importancia es el oxígeno como ya se mencionó, sin embargo, debido a su baja reactividad no ocasiona daños inmediatamente, el deterioro es provocado cuando el oxígeno se convierte en sus formas más activas.

A partir de la molécula de oxígeno gaseoso, y por intercambio electrónico se forman las siguientes especies reactivas (Fig 7.3) ^[65, 208]:

$O_2^{\cdot-}$ anión superóxido

H_2O_2 peróxido de hidrógeno

$\cdot OH$ radical hidroxilo

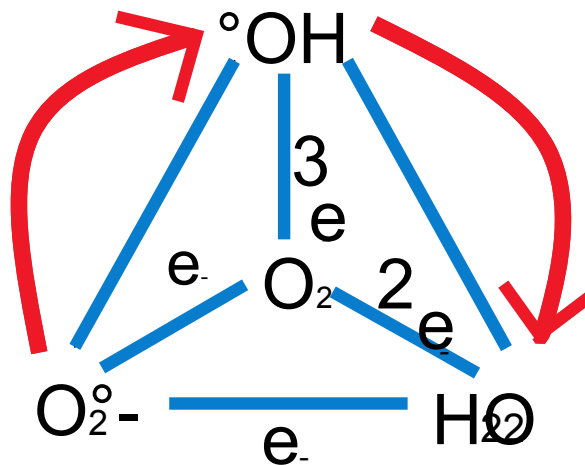


Fig. 7.3 Generación de las especies reactivas de oxígeno, a partir de oxígeno molecular

Estas especies se clasifican como radicales y no radicales de oxígeno (Cuadro 7.2), se han empleado diversos términos para describirlas, se ha preferido llamarlas en conjunto especies reactivas de oxígeno, aún cuando todos los radicales de oxígeno son especies reactivas de oxígeno, no todas las especies reactivas de oxígeno son de tipo radical. No es del todo adecuado emplear este término para algunas especies reactivas de oxígeno que no son radicales, por ejemplo: uno de los más importantes es el peróxido de hidrógeno, que es un no radical. Se forman a partir de oxígeno por reacciones de óxido-reducción, o bien por absorción de energía electromagnética ^[65,72, 85, 87, 208].

Las especies reactivas de oxígeno se generan continuamente a consecuencia de la exposición a fuentes exógenas, ejemplo: medicamentos, contaminantes, quimioterapia, radiación Ultravioleta y endógenas derivadas de procesos fisiológicos normales, como la fosforilación oxidativa (Fig 7.4). En los organismos la formación de los radicales libres derivados del oxígeno es contrarrestada por agentes antioxidantes, si este proceso no es eficiente los radicales libres provocan lesiones intra y extracelulares ^[173].

Cuadro 7.2. Especies reactivas de oxígeno, radicales y no radicales

Especies reactivas de oxígeno, radicales	Vida media (s, segundos).	Especies reactivas de oxígeno, no radicales.	Vida media (s).
Superoxido $O_2^{\cdot -}$	----	Peroxido de hidrógeno	-----
Hidroxilo $\cdot OH$	10^{-9}	Ácido hipocloroso HClO	----
Peroxilo ROO^{\cdot}	7	Ácido hipobromoso HBrO	----
Alcoxilo RO^{\cdot}	10^{-9}	Ozono O_3	----
Hidroperoxilo HO_2^{\cdot}	---	Oxígeno singulete 1O_2	10^{-5}
O_2	2.7×10^3		

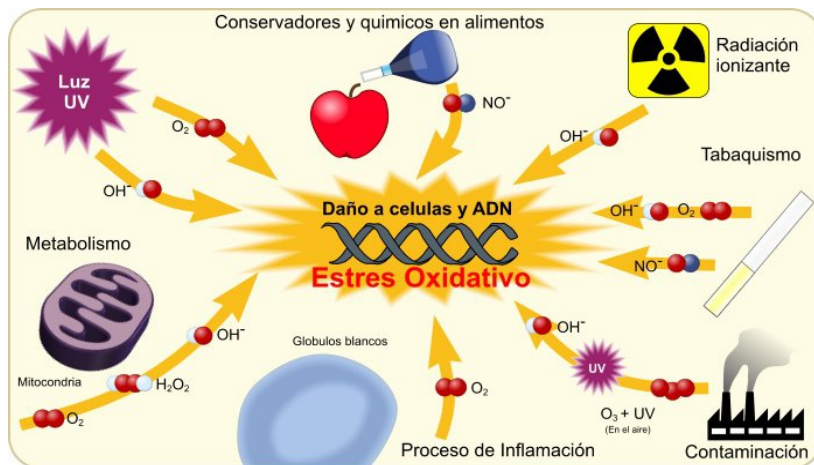


Fig 7.4. Factores endógenos promotores de especies reactivas de oxígeno.

7.1.1.2. Formación de las ROS:

Las especies reactivas de oxígeno son una serie de moléculas resultado del intercambio electrónico en los orbitales de la molécula de oxígeno, inician en el estado de mayor energía, oxígeno singlete, llega a su estado basal, oxígeno, y continúa con la reducción progresiva de la molécula hasta llegar a agua [65, 173, 208, 214, 215] Figura 7.5.

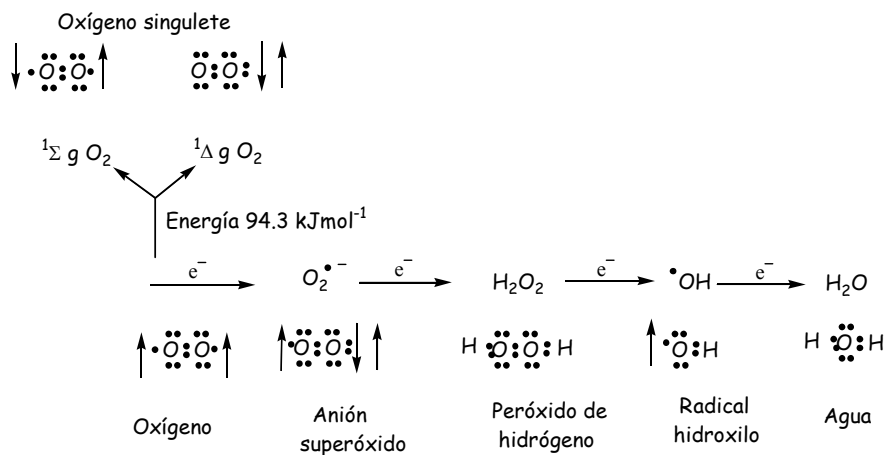


Fig. 7.5 Intercambio electrónico en la molécula de oxígeno, formación de otras especies reactivas de oxígeno.

Cuando el oxígeno molecular acepta un electrón proveniente de un agente reductor, el producto primario generado es un radical libre con carga eléctrica negativa llamado anión superóxido

(O_2^-), capaz de oxidar moléculas orgánicas. La adición de otro electrón conduce a la formación del peróxido de hidrógeno. En esta molécula, que no es un radical libre, la unión entre ambos oxígenos es muy débil, lo que le confiere alta reactividad. El peróxido de hidrógeno se descompone fácilmente al ganar otro electrón, así genera al radical hidroxilo ($\cdot OH$), especie altamente reactiva. La incorporación de un cuarto electrón conduce a la formación de agua (Fig. 5). Otra especie derivada del oxígeno que se ha identificado en los sistemas biológicos, es el oxígeno singulete (1O_2), que puede ser formado por absorción directa de radiación, por fotólisis (destrucción por acción de la luz) del ozono en aire contaminado, irradiación de superóxido o secundariamente a la excitación del óxido de nitrógeno luego de la absorción de energía radiante. En la Figura 7.6, se indican las configuraciones electrónicas para las especies reactivas de oxígeno, en la primera columna se encuentra la del oxígeno molecular, en las siguientes columnas se indican las transiciones electrónicas para cada una de las especies reactivas. La reactividad de las especies reactivas de oxígeno mantiene el comportamiento siguiente: $\cdot OH$ y $^1O_2 > O_2^{\cdot -} > H_2O_2$ [65,72, 85, 87, 208].

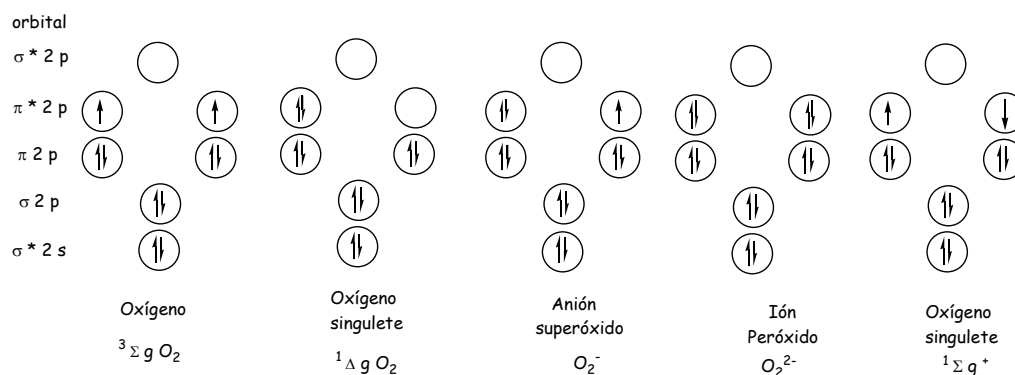


Fig.7.6 Configuración electrónica de especies reactivas de oxígeno.

El intercambio electrónico para la formación de las especies reactivas de oxígeno, depende de las condiciones de reacción en las que se encuentra el oxígeno, se describirá brevemente a las especies reactivas de oxígeno de interés.

7.1.1.2.1. Oxígeno singulete 1O_2 .

El oxígeno singulete (1O_2) se genera por un aporte extra de energía a la molécula de oxígeno, presenta un excedente de energía de 22.4 kcal. Una manera de aumentar la reactividad de oxígeno es mover uno de los electrones desapareados de una manera que disminuya la restricción del spin. El oxígeno singulete (1O_2) puede generarse cuando los electrones que han sido excitados por la luz

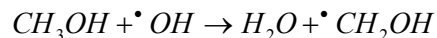
transfieren su energía de excitación a uno de los electrones desapareados del O_2 , que cambian su sentido de giro, y se aparean con el otro electrón libre ^[78]. También puede formarse durante la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ en las reacciones de Haber-Weiss por la descomposición de peróxido de hidrógeno. El oxígeno singlete es más reactivo que el oxígeno y tiene una vida media muy corta (5×10^{-6} s). Al no tener electrones desapareados no es un radical como tal, por lo que el estado excitado decae generalmente al estado de menor energía, O_2 , antes de que reaccione con alguna molécula disponible ^[59, 184].

En los seres vivos el estado excitado del oxígeno puede ser alcanzado cuando los pigmentos biológicos como las clorofilas, retinianos, los flavonoides o las porfirinas, están iluminados en presencia de O_2 . La formación del (1O_2) ocurre *in vivo* en cloroplastos iluminados, en la lente y retina ocular de mamíferos, lo que ocasiona daños al ADN, a las membranas celulares, modificaciones en los aminoácidos, además puede formar endoperóxido con los dienos o los compuestos aromáticos o bien puede ser desactivado físicamente con transferencia de energía ^[173, 65, 208].

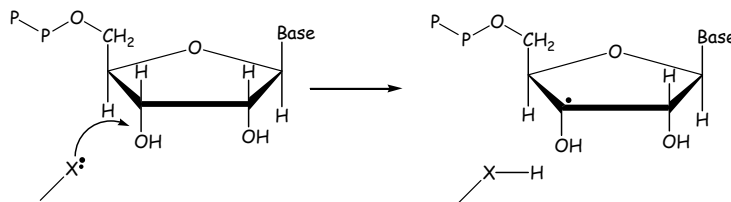
7.1.1.2.2. Radical hidroxilo $\cdot OH$.

La trirreducción del O_2 , con tres electrones, daría lugar al radical $\cdot OH$, experimentalmente no es posible obtenerlo de esta forma ^[98, 105]. Sin embargo, si puede aparecer en los sistemas biológicos como consecuencia de distintos procesos: En primer lugar, puede formarse por radiólisis del agua, por acción de la radiación γ o de los rayos X. El proceso más importante de producción de radicales hidroxilo es la reducción del peróxido de hidrógeno por iones metálicos, en especial en ión ferroso (Fe (II)). La mezcla de peróxido de hidrógeno y Fe(II) se conoce como reacción de Fenton, quien indicó que esta mezcla era capaz de oxidar al ácido tartárico (Fenton, 1894). La fisión homolítica del enlace O-O en el peróxido de hidrógeno produce dos radicales hidroxilo. Esta homólisis puede ser provocada por calor o por radiación ionizante, o bien por la reacción del peróxido de hidrógeno con una sal de Fe (II). Este radical es altamente reactivo con azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, ADN y ácidos orgánicos, en tres tipos de reacciones ^[98, 105, 133, 162, 208].

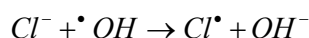
- (i) abstracción de un átomo de hidrógeno.



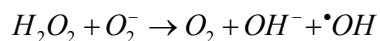
- (ii) Adición: Se agrega al anillo aromático de las estructuras como las purinas y pirimidinas del ADN.



- (iii) Transferencia de electrones



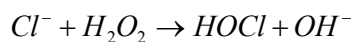
La reactividad de los radicales hidróxilos es tan grande que en sistemas vivos, reaccionan inmediatamente con las moléculas biológicas de su alrededor, produciendo radicales secundarios de reactividad variable. El peróxido de hidrógeno y las sales de hierro están disponibles en los seres vivos, que al entrar en contacto, ocurrirá la reacción de Fenton. Por ejemplo, en los microsomas aislados del hígado contienen suficiente hierro y produce suficiente peróxido de hidrógeno permitiendo la producción de radical hidróxilo. O bien se puede producir el radical hidróxilo por la reacción de O_2^- y peróxido de hidrógeno, de acuerdo con la reacción ^[65, 72, 85, 87].



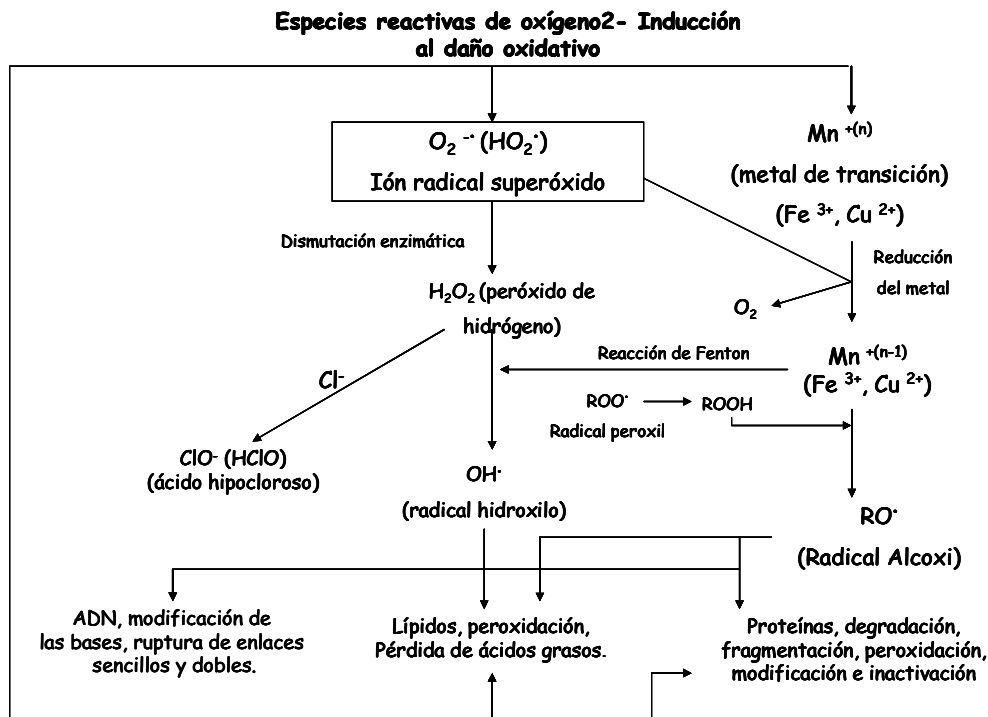
Los radicales hidróxilo generados, reaccionan de manera inmediata. El superóxido y peróxido de hidrógeno son menos reactivos y puede difundir lejos de sus sitios de formación, pero llevan a la generación de radical hidróxilo en diversas partes de célula, siempre que reaccione con un ión del metal de transición. El hierro se acumula especialmente en el hígado, bazo y corazón.

7.1.1.2.3. Ácido hipocloroso (HClO)

Los leucocitos contienen y secretan la enzima mieloperoxidasa, enzima que cataliza la oxidación de iones cloruro por peróxido de hidrógeno y se produce ácido hipocloroso (HClO) ^[66, 78, 80, 184].



La formación de las especies reactivas de oxígeno de interés se resume en el cuadro 7.3:



Cuadro 7.3 Formación y daño ocasionado por las especies reactivas de oxígeno.

Los radicales peroxil (ROO^\bullet), son resultado de la abstracción de un átomo de hidrógeno de un compuesto orgánico o por la adición de un radical a un doble enlace para la formación de un radical de carbono, que en presencia de O_2 da lugar a estos radicales. El radical peroxilo (ROO^\bullet) comúnmente se encuentra en los alimentos y es parte de las muestras biológica, es producto de la cadena de reacciones en la oxidación lipídica y por tanto asociado al deterioro de alimentos.

7.2. Peroxidación lipídica

En las células las reacciones importantes que involucran radicales libres es la autooxidación (peroxidación lipídica) causada principalmente por la reacción en cadena de los radicales de oxígeno con los lípidos. La reacción cuenta con tres fases iniciación, propagación y terminación (Fig.7.7). En la etapa de iniciación el radical lipídico R^\bullet a partir del lípido (RH), usualmente por el ataque de otros radicales, luz, calor, irradiaciones o trazas de metálicas ^[133, 162]. El radical lipídico (R^\bullet) formado reacciona rápidamente con oxígeno para dar un radical peroxilo (ROO^\bullet), que ataca a otra molécula de lípido (RH) y sustrae un átomo de hidrógeno para formar un hidropéroxido lipídico (ROOH), y así se genera un nuevo radical (R^\bullet), que continúa con la cadena de reacción, que inicia de nuevo la

secuencia de propagación. De esta manera, las moléculas de lípidos pueden ser oxidadas hasta hidroperóxidos por muchas formas de iniciación. La etapa más importante es la formación y descomposición de los hidroperóxidos que generan una serie de compuestos oxidados como cetonas, aldehídos, alcanos y alquenos de bajo peso molecular y de alta volatilidad [16, 88, 95, 126, 207], que dan lugar al sabor y olor desagradables del alimento oxidado, o bien son los causantes de algunas enfermedades.

El proceso de autoxidación sin antioxidantes se resume a continuación (Fig. 7.7).

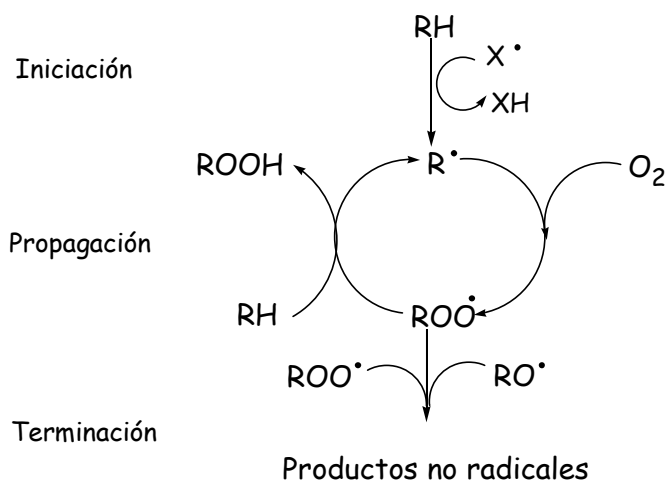


Fig. 7.7. Reacción en cadena de radicales libres de O_2 , Peroxidación lipídica.

7.2.1. ROS, el oxígeno y los radicales libres en las células.

El oxígeno ambiental promueve el metabolismo celular, produciendo energía a través de la cadena respiratoria (enzimas mitocondriales). Vivimos en una atmósfera oxigenada y por lo tanto oxidante. Como el uso y manejo del oxígeno no es perfecto, se producen radicales libres. En los tejidos continuamente se forman especies radicales a partir del oxígeno disuelto como parte de la función normal de las células. Por ejemplo, en los procesos metabólicos endógenos y químicos exógenos, en el cuerpo humano, en alimentos, la producción excesiva de especies altamente reactivas del oxígeno agota la capacidad antioxidante del organismo lo que provoca un desbalance llamado **estrés oxidativo** [66, 80,139], que conlleva a una variedad de procesos fisiológicos y bioquímicos cuyo resultado es el deterioro y muerte celular. De manera natural los tejidos tienen numerosas enzimas que eliminan rápidamente a los radicales libres, por ejemplo, las peroxidasas, catalasas, superóxido dismutasas, etc. que evitan el daño sobre ellos.

En la mitocondria se estima que del 2-4 % del oxígeno consumido durante el transporte de electrones no se reduce a agua por la citocromo C oxidasa, lo que ocurre es la formación de el anión semiquinona, que puede transferir uno o dos electrones al oxígeno molecular con la subsecuente formación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Fig 7.8). Éste, a su vez, puede generar otras especies reactivas de oxígeno; en exceso reaccionan con toda clase de macromoléculas que causan anomalías conductuales, citotoxicidad y daño mutagénico. El anión superóxido es convertido a peróxido de hidrógeno espontáneamente o por vía enzimática. Metabolitamente el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno son formados por enzimas oxidativas, como la xantina oxidasa, las NADPH/NADH oxidasas, la acil CoA oxidasa, se activan en procesos fisiológicos que favorecen la producción de metabolitos tóxicos de oxígeno (Fig. 7.9), ejemplo: los citocromos P-450 y pequeñas moléculas autooxidables como las catecolaminas y las quinonas^[61, 139, 193, 207].

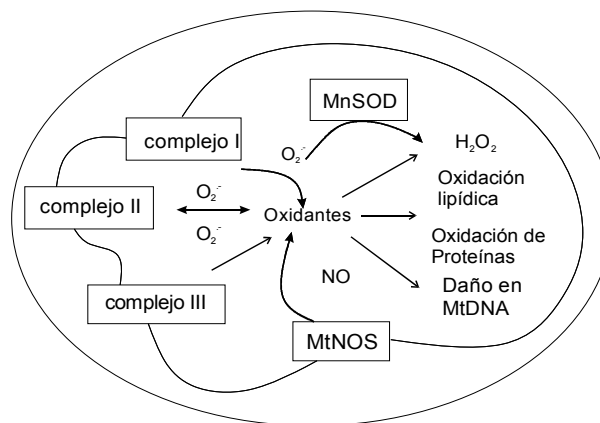


Fig. 7.8 Producción de oxidantes en la mitocondria. Especies intermediarias: superóxido, peróxido de hidrógeno, Óxido nítrico y peroxinitrito, causantes del daño oxidativo. MtNOS, mitocondrial óxido nítrico sintetasa. MnSOD manganeso superóxido dismutasa.

EL sistema inmunológico de las células fagocíticas no fagocíticas generan una importante cantidad de peróxido de hidrógeno, mediante NADPH (Fig. 7.9) oxidasa unida a la membrana, es decir, existe una constante formación de precursores del radical hidroxilo. Otro ejemplo que cuenta con abundancia de especies reactivas de oxígeno, es el cerebro por su tamaño emplea grandes cantidades de oxígeno y hay que sumar que en determinadas áreas posee un alto contenido en hierro, que ocasionan la producción de intermediarios reactivos que lo hacen susceptible a sufrir alguna lesión oxidativa, las neuronas son incapaces de realizar la mitosis y la lesión experimentada puede tener consecuencias devastadoras, o causar lesiones permanentes^[80]. El cerebro está organizado de forma que una lesión en un área determinada puede afectar a la función de otras áreas nerviosas más alejadas dentro del propio cerebro, es sorprendente que a pesar de su importancia, no cuente con un mecanismo de defensa contra la lesión oxidativa como otros tejidos. Un ejemplo más dentro del cuerpo humano es la sangre, en ella algunas especies reactivas de oxígeno de vida media

mayor pueden ser estabilizadas, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, al evitar que reaccionen con iones metálicos catalíticos. Sin embargo, la capacidad antioxidante de la sangre es un resultado de las diversas contribuciones de diferentes compuestos e interacciones metabólicas sistemáticas [61, 72, 139, 158].

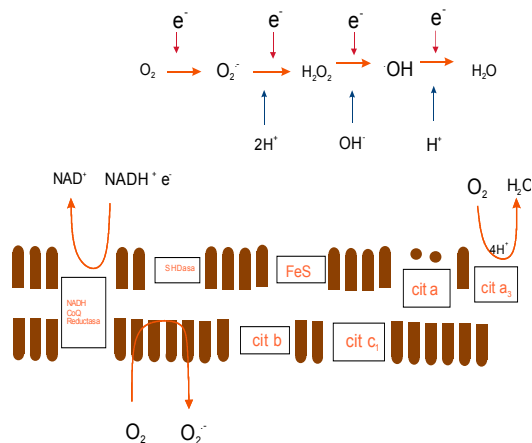


Fig 7.9. Generación de especies reactivas de oxígeno en la célula.

Se ha relacionado a los oxidantes y a los antioxidantes con algunas enfermedades que ocasionan la muerte o deterioran la calidad de vida, así como en la descomposición de los alimentos en su mayoría provocados por radicales libres. Cada célula experimenta unos 10000 impactos de radicales libres al día, se exponen continuamente a estrés oxidativo, en los puntos más vulnerables despliegan en el ambiente intra- y extra- celular una gran variedad de sistemas de defensa basados en antioxidantes, solubles en agua o en lípidos, así como enzimas antioxidantes (Fig. 7.10). Los antioxidantes deben ser adecuados a la vida media corta de los radicales libres, estos comprenden moléculas pequeñas, endógenas y exógenas, macromoléculas con capacidad antioxidante, también enzimas antioxidantes. La capacidad antioxidante celular se da vía mecanismos enzimáticos y no enzimáticos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres. Como se ha mencionado los radicales libres se generan durante el metabolismo, mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía cuya consecuencia es la formación de especies reactivas de oxígeno que se puede prevenir mediante dos tipos de mecanismos (Figura 7.9) [66, 84, 139].

a) Procesos en los que intervienen las propias acciones metabólicas de la célula implicando enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasas y peroxidasas.

b) O bien mediante la eficacia de antioxidantes no enzimáticos como la vitamina E (tocoferol) y β -carotenos, que reaccionan con los radicales libres para prevenir la lesión molecular; éstos son

solubles en lípidos y por ello protegen las membranas celulares. La vitamina C y el ácido úrico, otros neutralizadores de radicales libres, reaccionan con éstos en el citoplasma.

Todos los organismos aerobios incluyendo las bacterias, plantas, y los seres humanos, sufren daño cuando están expuestos a concentraciones de oxígeno arriba de lo normal, lo que significa que no tienen ningún exceso de defensas antioxidantes. En las células existen diferentes ambientes, es decir acuoso o lipídico, dependiendo de las características de sus funciones, es por eso que las sustancias con actividad antioxidante deben cumplir con las mismas características y así actuar adecuadamente. La capacidad antioxidante de una célula está determinada por sistemas enzimáticos, en sangre se asocia a la concentración de antioxidante de bajo peso molecular obtenidos de la dieta, compuestos que son rápidamente gastados y se tienen que cambiar continuamente para mantener el balance con las especies oxidantes- antioxidante, y mantener equilibrada la capacidad antioxidante del plasma de sangre. Una fuente de antioxidante naturales es de suprema importancia para apoyar la protección antioxidante del cuerpo humano, lo que ha abierto un panorama de estudio hacia los ácidos y los flavonoides fenólicos como compuestos con posible capacidad antioxidante, en el contexto de su uso en la industria alimentaria y la industria médica ^[139, 207]. (Fig 7.10).

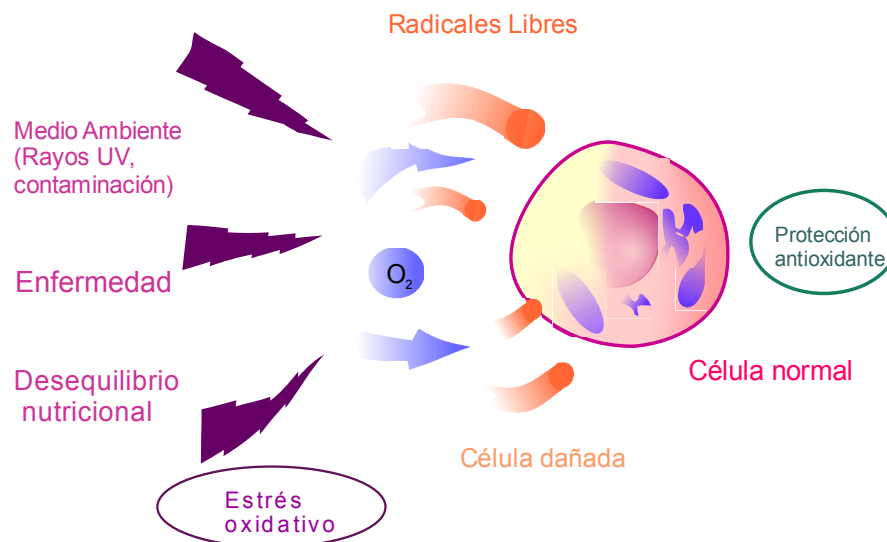


Fig 7.10 Daños ocasionados a la célula por factores externos en la formación de RL.

7.3. Prooxidante y antioxidante, términos no análogos a Reductor y Oxidante.

En química podemos definir a un oxidante y a un reductor, sin embargo no son términos análogos a lo que biológicamente se entiende por prooxidante y antioxidante, es por eso que se deben aclarar estos términos y evitar confusiones. La reducción es definida químicamente como la ganancia de electrones y la oxidación como la pérdida de electrones. Un reductor o agente reductor es una sustancia que dona electrones a otro reactante que se reduce. Un oxidante o agente oxidante es una sustancia que acepta electrones de otra que se oxida. Por lo que una oxidación es imposible sin una reducción en el sistema, y viceversa. Cuando una reacción química es caracterizada por una reducción y una oxidación, se trata de una reacción redox. Las reacciones redox son muy importantes en las oxidaciones biológicas, en la cadena de reacciones químicas se emplea el oxígeno del aire como agente oxidante de los alimentos para obtener la energía suficiente para vivir ^[153].

Reductor y oxidante son términos químicos, en un contexto biológico se emplean con mayor frecuencia antioxidante y prooxidante. En palabras de Halliwell y Gutteridge, un antioxidante es una sustancia que presente en bajas concentraciones comparada con el sustrato oxidable, previene significativamente e inhibe la oxidación de un sustrato ocasionada por un prooxidante. Un antioxidante puede reducir efectivamente a un prooxidante, por la formación de productos con o sin baja toxicidad. Un prooxidante es sinónimo de especie reactiva, se define como una sustancia tóxica causante de daño oxidativo en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, resultando diversas patologías y/o enfermedades. Químicamente, un prooxidante es como un oxidante y un antioxidante puede eficientemente reducir a un prooxidante y obtener productos de nula o baja toxicidad ^[84, 153].

El desbalance entre antioxidante y prooxidante (Fig.7.11) es causa del proceso de deterioro de alimentos y de algunas enfermedades en las que está implicada la formación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Por esta razón el efecto protector de los antioxidantes ha cobrado importancia en los campos biológico, médico, alimenticio y agroquímico. Es importante aclarar que un antioxidante en una oxidación biológica actúa como un reductor, es decir, todos los antioxidantes son reductores, aunque no necesariamente todos los reductores son antioxidantes. En términos generales los antioxidantes se sacrifican para detener la cadena de reacciones, o bien inhibe a las especies reactivas formadas en las primeras etapas dentro del mecanismo preventivo. Las especies reactivas de oxígeno se han relacionado con el desarrollo de antioxidantes, o con el llamado estado de estrés oxidativo ^[16,80]. Si se rompe el balance prooxidantes-antioxidantes a favor del primero, potencialmente dará lugar a un daño. El estrés oxidativo es definido como el daño bimolecular causado por el ataque de especies reactivas a la constitución de organismos vivos.

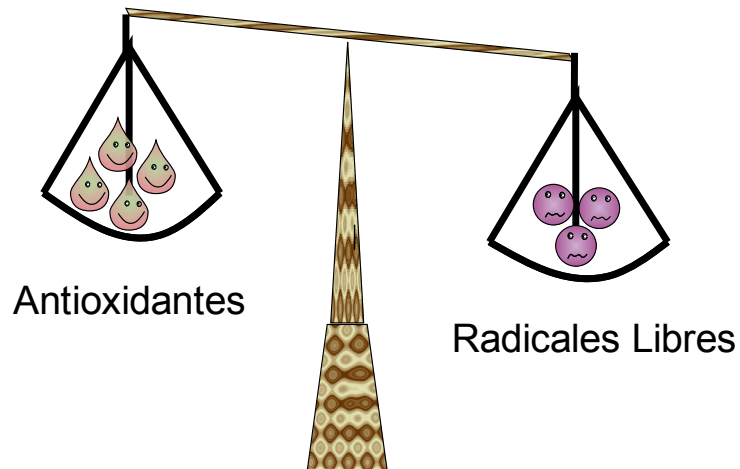


Fig. 7.11. El estrés oxidativo producto del desbalance entre Radicales Libres y Antioxidantes.

7.4. Clasificación de los antioxidantes

A consecuencia de la intensa exposición a factores que propician el estrés oxidativo, continuamente se buscan compuestos con propiedades antioxidantes. De manera general y compartiendo la idea de que cada investigación tiene requerimientos diferentes, los antioxidantes se han clasificado de la siguiente forma: primarios-secundarios, endógenos-exógenos, origen y mecanismo de acción, se describen a continuación brevemente ^[66].

7.4.1. Antioxidantes endógenos – exógenos (Intrínsecos y extrínsecos).

Los antioxidantes sintetizados por el cuerpo son llamados antioxidantes intrínsecos y dependen del contenido nutricional en la dieta (superóxido dismutasa, glutación peroxidasa). Los cofactores minerales forman antioxidantes intrínsecos (selenio, cobre, zinc). Los antioxidantes extrínsecos se obtienen de la dieta ya que el cuerpo no los puede sintetizar. Los 5 principales grupos de antioxidantes extrínsecos son vitaminas antioxidantes, cofactores minerales, carotenoides, flavonoides y antioxidantes únicos (ácido alfa-lipoico).

7.4.2. Antioxidante primarios- secundarios (inhiben o retardan la oxidación).

Los antioxidante pueden inhibir o retardar la oxidación de dos formas: por la captación de radicales libres, antioxidantes primarios: y los que no están relacionados con la captación de radicales libres, antioxidantes secundarios. Los primeros incluyen compuestos fenólicos, reaccionan en la

etapa de inducción en la cadena de reacción. En contraparte los secundarios, reaccionan por medio de ciertos mecanismos en los que se incluye su unión a metales pesados, captación de oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de radiación ultravioleta o desactivación de oxígeno singulete.

7.4.3. Antioxidantes de acuerdo a su origen.

Naturales: aquellas sustancias presentes en plantas o en el organismo que presentan actividad antioxidante, por ejemplo: glutatión, superóxido dismutasa, tocoferoles, carotenoides, ácido ascórbico, flavonoides, vainillina, algunos aminoácidos, entre otros.

Sintéticos: La estrategia de defensa Antioxidante empleada ampliamente en sistemas biológicos, ya que su función es similar a la de los antioxidantes biológicos, pero con mayor utilidad en la industria química alimenticia y en medicina, por ejemplo, butil hidroxil tolueno, butil hidroxil anisol.

Sinergistas: Se engloban tanto a las antioxidantes naturales como a los sintéticos, lo cual proporciona una protección más completa que la que se puede alcanzar por un efecto aditivo de cada uno por separado, su desventaja es que su mecanismo de acción no ha sido detallado. Colaboran con los compuestos fenólicos presentes en las grasas, potenciando su acción, de modo que por sí solos no tendrían tal acción antioxidante. El papel del sinergista consiste en regenerar el antioxidante oxidado, integrando un sistema redox y catalizando su paso al estado reducido original, por ejemplo: ácido ortofosfórico, ácidos cítrico y tartárico.

7.4.4. Antioxidantes de acuerdo al mecanismo de ataque a radicales libres.

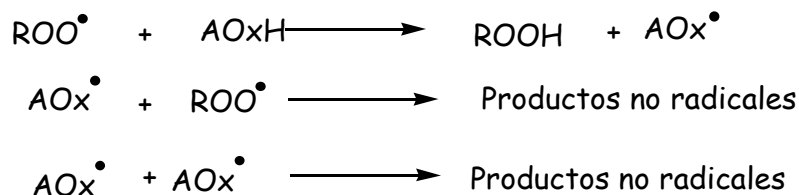
Donadores de protones: Este tipo de antioxidantes reaccionan con los radicales libres que se generan en la oxidación, al donarles un átomo de hidrógeno estos los estabiliza, y da lugar a los radicales de los antioxidantes que son menos reactivos y más estables que no promueven la oxidación. Ejemplos, antocianinas, BHA,

Secuestradores de radicales: Los antioxidantes evitan la participación de metales de transición en la generación de radicales libres (reacción de Fenton), por que elimina los protones del medio de reacción necesarios para activar a los metales pesados. Ejemplo, la melatonina, α -tocoferol.

7.5. Mecanismos antioxidantes.

Las células de manera natural cuentan con mecanismos antioxidantes, se activan en el momento en que la célula entra a un estado de estrés oxidativo. Estos mecanismos actúan de acuerdo con la etapa de estrés en la que la célula se encuentre. Además, un antioxidante particular de prueba presentaría diversas actividades, dependiendo de la especie usada para iniciar la reacción de la oxidación. Los mecanismos de defensa antioxidante no son 100 % efectivos, se ha demostrado que organismos expuestos a un ambiente de oxígeno, tienen un daño oxidativo en el ADN, proteínas y lípidos, lo que contribuye al desarrollo de cáncer a temprana edad. Esto sucede por que el 21 % de oxígeno es tóxico, probablemente por que las especies reactivas de oxígeno tiene roles biológicos importantes, por lo que se han desarrollado defensas antioxidantes que minimicen este daño. Cada mecanismo hace frente al daño oxidativo causado.

Los antioxidantes interfieren con la propagación o la iniciación de la cadena, cuando reaccionan con un radical peroxilo (ROO^\bullet), los productos de reacción son especies no-radicales de baja reactividad ^[9, 127]:



Las principales funciones de los antioxidantes son: Prevención, Intercepción y Reparación, a continuación describen brevemente ^[16].

7.5.1. Prevención.

Un mecanismo de prevención en el inicio de la cadena de reacción, puede incluir enlaces con iones metálicos como Fe (II) o Cu (II), por lo que la quelación representa un buen control en la peroxidación lipídica y en la fragmentación del ADN. Biológicamente la ferritina y la transferrina son importantes en el control del potencial de reacción en la generación del radical. Dentro de los mecanismos de prevención en los seres vivos encontramos a los colorantes, por ejemplo la melanina para los rayos ultravioleta o los carotenoides para los estados excitados, como el oxígeno singulete. Si actividad de los antioxidantes no es 100 % eficaz se pasa a una segunda etapa, la intercepción ^[189].

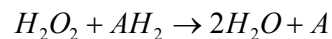
7.5.2. Intercepción.

En el mecanismo de intercepción, se incluye a antioxidante no-enzimáticos, consiste en la desactivación del radical por la formación de no radicales o productos no reactivos, esto se logra al intercambiar el radical a una especie menos reactiva. En este caso los radicales hidroxilo son extremadamente reactivos y con un tiempo de vida relativamente pequeño, no pueden ser interceptados con eficiencia.

7.5.2.1. Enzimáticos.

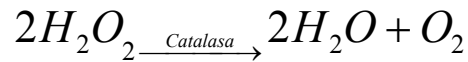
Para los antioxidantes enzimáticos: las células eucariontes contienen un importante armamento antioxidante enzimático de intercepción, entre las que destacan tres importantes: la superóxido dismutasa (SOD), las catalasas y glutatión (GSH), su función es eliminar a las especies reactivas. Estas hemoproteínas catalíticas son, el producto evolutivo de la necesidad a la asimilación del oxígeno por parte de los organismos eucariontes. Otras enzimas involucradas en el consumo de oxígeno son las piridín y flavo deshidrogenasas, así como las hemoenzimas del transporte electrónico en los citocromos ^[88, 189].

La acumulación de peróxido de hidrógeno es fuente de radicales libres, las hidroperoxidasas lo eliminan (así como a los lipoperóxidos) mediante la reducción irreversible. Este grupo general de enzimas se subdivide en 2 subgrupos: las peroxidasas y la catalasa. Las peroxidasas requieren de un donante de electrones, que dependiendo del tipo de reacción puede ser la vitamina C, alguna quinona o el citocromo C (todos en estado reducido). La reacción general que se verifica es la siguiente ^[16, 80, 189, 193].

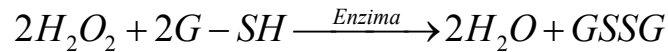


En la cual AH_2 es el agente reductor, antioxidante. Consideradas originalmente como enzimas vegetales, las peroxidasas se encuentran en la leche (lactoperoxidasa), plaquetas, leucocitos (mieloperoxidasa), en el hígado y en otros tejidos.

La catalasa, con estructura tetra hemínica, participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno formado como producto de la actividad de enzimas oxidasas (por ejemplo, la xantina oxidasa). Esta importante enzima se encuentra en sangre, médula ósea, mucosas, riñón e hígado. En su mecanismo de acción, la propia molécula de agua actúa como donante de electrones y formar oxígeno:

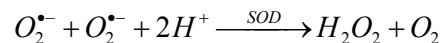


La glutatión, dependiente de selenio para su función, utiliza glutatión reducido como donante de electrones:



La enzima está presente, fundamentalmente en eritrocitos y otras especies de la sangre, protegiendo a sus membranas y a la hemoglobina de la acción de los peróxidos. Esta enzima es también dependiente de la acción de otra, la glutatión reductasa, la cual le garantiza el estado reducido del glutatión.

La enzima superóxido dismutasa está altamente distribuida en todas las células aerobias y su concentración aumenta con la exposición de la célula a gradientes superiores de presión de oxígeno. Estructuralmente, la enzima es una metaloproteína y se presenta en 2 isoformas. La isoenzima citosólica está formada por 2 subunidades, cada una contiene un equivalente de cobre (Cu^{2+}) y de zinc (Zn^{2+}); la isoforma mitocondrial contiene manganeso (Mn^{2+}), lo cual la hace semejante a la isoenzima presente en algunas especies procariontes. La actividad catalítica neutraliza la capacidad reactiva del radical superóxido al reducirlo a peróxido de hidrógeno y oxígeno:



La cadena antioxidante debe continuar con la reducción definitiva a agua, por parte de peroxidases o catalasas a partir del peróxido de hidrógeno aquí producido. Estas enzimas establecen una "vigilancia" bioquímica para el anión superóxido que generalmente se forma como intermediario en las reacciones de oxigenación de sustratos, de esta manera se protegen los tejidos de la acción potencial de este radical libre.

7.5.2.2. No-enzimáticos.

El problema básico es la captación de especies perjudiciales, una vez formadas desde la especie de mayor actividad, éste es un proceso de neutralización. Para los radicales el final de la desactivación es la formación de productos no radicales. Algunos ejemplos de compuestos captadores de radicales libres son: vitamina E, vitamina C, β -caroteno, ferritina, ferroxidasa, selenio, glutatión reducido (GSH), manganeso, ubiquinona, zinc, ácido úrico, flavonoides, coenzima Q, melatonina, bilirrubina, taurina, cisteína, entre otros. Los flavonoides que son extraídos de

determinados alimentos interactúan de manera directa con la especie reactiva para producir complejos estables o de menor reactividad, mientras que en otras ejerce la función de co-substrato en la acción catalítica de algunas enzimas ^[88, 189].

7.5.3. Reparación

La protección a los efectos oxidantes también ocurre por la reparación del daño una vez que sucedió, entra en acción cuando la prevención y la intercepción no han sido suficientes, lo que ocasiona que los productos dañinos sean continuamente formados y acumulados, esto provoca averías en la membrana y en el ADN, en este paso del mecanismo antioxidante repara, restituye o rellena el ADN.

Las principales funciones del mecanismo de reparación se subdividen en dos grupos, los directos y los indirectos:

Directo. Se reducen los grupos (S-S) de los aminoácidos azufrados en las proteínas ocasionada por enzimas específicas como la disulfuro reductasa y la sulfóxido reductasa.

Indirecto. En una reparación indirecta se dan dos etapas, en primer lugar se reconoce el daño molecular, siendo éste eliminado o degradado, y en segundo lugar se sintetiza la parte eliminada. Esto ocurre tanto en las proteínas oxidadas y en peróxidos lipídicos de cadenas hidrocarbonadas, así como en las oxidaciones del ADN y ARN.

El papel de antioxidantes ingeridos en los alimentos es ayudar a evitar la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno en nuestro cuerpo. Las moléculas de antioxidante son “sacrificadas” al reaccionar con los radicales libres para proteger las biomoléculas contra el estrés oxidativo, es decir, el antioxidante ha cumplido con su función. Los antioxidantes en un sistema alimenticio generalmente son sustancias que pueden inhibir la autooxidación del ácido graso. Los antioxidantes principales son quelantes de metal (e.g., EDTA, preventivos) y aquellos antioxidantes que rompen la cadena de reacción (e.g., BHT, sacrificatorios), actuando como donantes del átomo de hidrógeno.

7.6. Medida de la capacidad antioxidante.

Existen mecanismos intrínsecos opuestos a la lesión oxidativa; al conjunto de estos mecanismos se le denomina “capacidad antioxidante del organismo”. La capacidad antioxidante de un compuesto debe cumplir con algunos requisitos como: una alta solubilidad en el medio, una correcta orientación para interactuar con los radicales libres, ser un buen antioxidante en un sistema

emulsificado (alimento), proteger a los lípidos oxidables, además de buen reductor y funcionar con alta reactividad y efectividad a diferentes pH. En los alimentos dicha capacidad depende de la naturaleza y concentración de los antioxidantes naturales que lo componen (efecto sinérgico).

En una creciente demanda de antioxidantes, la búsqueda de compuestos con actividad antioxidante ha proliferado en las últimas décadas, y con ello el uso de diferentes metodologías para la evaluación de la capacidad antioxidante de dichos compuestos. Aunque en su mayoría estos ensayos son indirectos, proporcionan una idea de la “capacidad antioxidante” de los compuestos a estudiar. Lo importante no es conocer la capacidad antioxidante de un compuesto puro, esto no serviría de mucho cuando se cuenta con matrices muy complejas, muestras biológicas y alimentos, campo de acción en el que se incluye a estos compuestos químicos con posible actividad antioxidante ^[106].

Se han empleado diversos términos que pretenden englobar si un compuesto tiene propiedades antioxidante, por lo que el uso apropiado de la medida de la capacidad antioxidante requiere una comprensión y una descripción claras de que se está midiendo realmente como sigue:

Aunque los términos capacidad antioxidante y actividad antioxidante son de uso frecuente, alternativamente sus significados son absolutamente distintos. La actividad antioxidante corresponde al índice de reacción un compuesto contra un radical libre dado. Y la capacidad antioxidante es la medida de un radical libre que ha sido eliminado en una solución de prueba, independientemente de la actividad antioxidante de cualquier compuesto presente en la mezcla. En muestras biológicas como el plasma, el número de compuestos heterogéneos que exhiben actividad antioxidante es diverso y por lo tanto puede ser discutido que el estado antioxidante es representado mejor por su capacidad antioxidante total solamente. Otra diferencia a destacar entre los términos capacidad antioxidante y actividad antioxidante, es que cuando se estudia la actividad antioxidante de un compuesto, se especifican las condiciones de reacción, como temperatura, presión, medio de reacción, coreactantes, puntos de referencia y se hace alusión a ensayos individuales, en cambio al estudiar la capacidad antioxidantes nos referimos a los resultados obtenidos en diferentes ensayos, que sirven de comparación y complemento de estudio del compuesto analizado, Por esta razón, es común emplear el término capacidad antioxidante, por que en la mayoría de los estudios realizados consideran el uso de más de un ensayo para dicho fin. Lo anterior nos pone en un punto importante de la investigación pues se cuenta con innumerables compuestos de diferente naturaleza, y las mediciones no se han estandarizado como es debido, ya que dependiendo de los objetivos de cada una de las investigaciones emplearán algún ensayo, un conjunto de ellos y sus respectivas modificaciones. Por ejemplo, existen ensayos de inhibición, donde se involucra un pro-oxidante, un radical libre y un sustrato oxidable, los pro-oxidantes inducen la oxidación del sustrato, la cual es inhibida por el antioxidante. Esta inhibición se mide y se relaciona con la capacidad antioxidante del compuesto, la cual toma importancia cuando se mide en sistemas biológicos, es aquí donde se

encuentran la mayoría de los pro-oxidantes o especies reactivas por ejemplo: O_2 , H_2O_2 , ROO^\bullet , y el $^\bullet OH$.

Si consideramos una reacción redox como modelo en el sistema antioxidante-prooxidantes, los antioxidantes deben cumplir con alguno de los siguientes mecanismos de acción: (i) inhibición y capacidad de secuestro de especies reactivas de oxígeno/especies reactivas de nitrógeno, (ii) capacidad reductora, (iii) capacidad quelante de metales, (iv) actividad antioxidante de las enzimas, (v) inhibición de enzimas oxidativas. Generalmente, los métodos *in Vitro* para la determinación de la capacidad antioxidante se explican por dos diferentes aproximaciones, en un esquema competitivo y en un no competitiva (Fig.7.12) ^[138].

En un sistema competitivo, las especies en estudio son un compuesto que representa una biomolécula, la cual es susceptible de ser atacada en vivo, y el compuesto antioxidante compite por la especie reactiva (radical o no radical). En este tipo de estudios la capacidad antioxidante de un compuesto problema es dependiente de: (i) la reacción entre la biomolécula y la especie reactiva, (ii) la reacción entre la especie reactiva y el antioxidante, (iii) la proporción entre la concentración del antioxidante y la biomolécula. La cuantificación de la capacidad antioxidante se justifica como la facilidad que tiene el compuesto a ser medido analíticamente al finalizar la reacción de competencia. En la mayor parte de los análisis competitivos, la biomolécula es agregada en su forma oxidada. Sin embargo, la biomolécula también puede ser agregada después de la reacción, esto permite la cuantificación de las moléculas reactivas restantes de la especie reactiva o de la biomolécula ^[138].

Los ensayos competitivos dependen de:

Los ensayos que se rigen por un esquema competitivo consideran los siguientes requerimientos: (i) la biomolécula sea reactiva con los oxidantes en baja concentración; (ii) un cambio espectroscópico dramático entre la biomolécula y el compuesto prueba oxidado, (iii) no debe existir alguna reacción en cadena adicional a la oxidación de la biomolécula y (iv) el antioxidante no debe reaccionar con la biomolécula. En los ensayos competitivos la concentración de la biomolécula es muy pequeña comparada con la concentración del antioxidante, contradictorio a la definición de antioxidante presentada anteriormente, por lo que los ensayos cuyo mecanismo es la transferencia de átomos de hidrógeno no son empleados comúnmente en determinaciones rutinarias.

En un esquema no competitivo, los compuestos antioxidantes reaccionan con una especie reactiva sin la presencia de otra molécula competente. El análisis puede realizarse al hacer interaccionar a la especie reactiva con el antioxidante y tener una muestra con la cual se pueda monitorear, o bien la especie reactiva puede ser medida después de la adición de algún reactivo ^[138].



Fig 7.12. Esquema de ensayos competitivos y no competitivos, en ambos lo ideal es generar especies reducidas de baja o nula reactividad.

Las investigaciones en la que es importante determinar la capacidad antioxidante de una sustancia, ha dado pie a la estandarización de algunos criterios útiles en el momento de elegir un ensayo que permita lograr su objetivo: (1) reacción química en un determinado potencial aplicado, (2) uso de moléculas de importancia biológica, (3) técnica (metodología) simple, (4) con un punto final definido y un mecanismo químico, (5) desarrollo en la instrumentación, (6) una buena reproducibilidad y repetibilidad, (7) ideal para ensayos de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos y (8) adaptable al análisis.

A partir de estos criterios, el análisis de la capacidad antioxidante se ha dividido en dos importantes categorías dependiendo de la especie oxidante presente: (i) análisis de la capacidad del barrido de las especies reactivas de oxígeno/especies reactivas de nitrógeno; (ii) análisis de la capacidad del barrido contra radicales estables, no biológicos y la evaluación de la capacidad de reducción total.

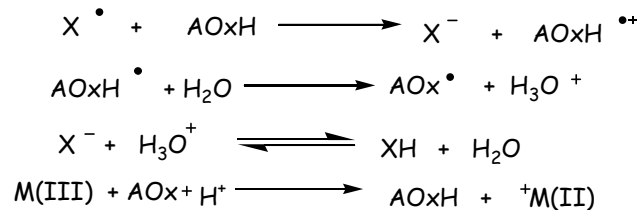
A partir del esquema (Fig 7.12), los ensayos para la evaluación de la capacidad antioxidante se dividen en los basados en la transferencia de electrones y en los ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno.

7.6.1. Ensayos basados en la transferencia de electrones.

En los ensayos cuyo esquema es el de transferencia de electrones dos compuestos reaccionan, un oxidante abstrae un electrón del antioxidante ocasionando un cambio en la coloración de la reacción. La intensidad en el cambio de color es proporcional a la concentración del

antioxidante. La reacción y el punto final es alcanzado cuando el cambio de color se ha detenido [12, 119, 164].

En las reacciones de transferencia de electrones, el antioxidante transfiere un electrón para reducir un compuesto esto incluye metales, carbonilos y radicales. Reacciones de este tipo serían:



Donde X^{\bullet} es el radical libre y $AOxH$ el antioxidante.

Este tipo de ensayos implica el análisis de la cantidad total de fenoles con el uso del reactivo de Folin-Ciocalteu, en esta categoría también se encuentran el análisis de la capacidad antioxidante equivalente de trolox, además del análisis antioxidante por la reducción del ión férrico, análisis de la dicloridrato de N,N-dimetil-*p*-fenilenodiamina y la capacidad reductora de Cu (II) [13, 16, 55, 138].

Estos métodos implican dos componentes en la mezcla de reacción, los antioxidantes y el oxidante. La reacción de transferencia de electrón del antioxidante al oxidante es la siguiente:



El oxidante abstrae un electrón del antioxidante causando los cambios del color, se alcanza el punto final de la reacción cuando no hay variación en el color, este cambio es proporcional a la concentración antioxidante. Lo anterior se expresa como un cambio de la absorbancia (ΔA) que se grafica contra la concentración antioxidante para dar una gráfica lineal, donde la pendiente de la recta refleja la capacidad de reducción del antioxidante (Fig 7.13). Estos análisis se asemejan a la titulación redox en análisis químico clásico, porque no hay una reacción competitiva implicada y no hay un radical de oxígeno, por lo que el análisis es cuestionable por que se asume que la capacidad antioxidante es igual a la capacidad de reducir.

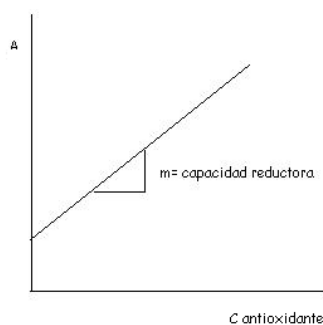
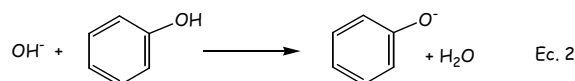


Fig 7.13 Variación de la absorbancia en función de la concentración de antioxidante.

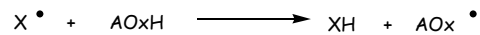
Dentro de los ensayos para medir la capacidad antioxidante que actúan por medio del mecanismo de transferencia de electrones, se encuentran los que se realizan en medio ácido, como el análisis antioxidante por la reducción del ión férrico, así como el de la capacidad reductora de Cu (II) y el ensayo de captura de radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, el neutral capacidad antioxidante equivalente de trolox o el básico ensayo con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Los valores de pH tienen un efecto importante sobre la capacidad de reducción de antioxidantes. En condiciones ácidas, la capacidad de reducción se suprime debido a la protonación en compuestos antioxidantes (Ec. 1), mientras que en condiciones básicas, la disociación del protón de compuestos fenólicos (Ec. 2) realzaría la capacidad de reducción de una muestra.



7.6.2. Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno.

En este tipo de ensayos los radicales libres son generados de manera artificial con una molécula promotora y se mide el grado de inhibición de los radicales en presencia de un antioxidante. En estos ensayos es evidente que la transferencia del átomo de hidrógeno es un paso dominante en la cadena de reacción vía radicales. El método basado en la transferencia de átomos de hidrógeno es relevante para medir la capacidad antioxidante en el punto de ruptura de la reacción en cadena. La capacidad de captura del radical por el antioxidante, se relaciona directamente con la capacidad de un compuesto de donar al átomo de hidrógeno y no se correlaciona a los potenciales redox solamente ^[8,12, 174, 184].

Las reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno son:



Donde X' es el radical libre y AOxH es el antioxidante

El nuevo radical formado es mucho más estable que el inicial. Los ensayos que siguen reacción de transferencia del átomo de hidrógeno incluyen análisis como: blanqueo de la molécula de Crocin, parámetro de análisis antioxidante de la intercepción total del radical peroxilo, capacidad total de secuestro de radicales de oxígeno y la capacidad de absorbanza del radical del oxígeno. Se han desarrollado otros métodos no incluidos dentro de estos dos grupos, por ejemplo: el análisis de la quimioluminiscencia y el análisis de la electroquimiluminiscencia ^[66, 88, 138, 188].

7.6.3. Diferencia entre los mecanismos de acción de los antioxidantes, transferencia de átomos de hidrógeno o transferencia de electrones.

Los análisis determinan la disminución de la capacidad antioxidante total en dos grupos importantes: Los análisis basados en una sola reacción de transferencia de electrones, supervisada a través de un cambio en color, cuando el oxidante se reduce, y los análisis que se basan en una reacción de la transferencia del átomo de hidrógeno en donde el antioxidante y el substrato compiten por los radicales libres. Los ensayos basados en la transferencia de electrones, miden la capacidad de reducción de un antioxidante, y los análisis basados en la transferencia de átomos de hidrógeno cuantifican la capacidad del compuesto para donar el átomo de hidrógeno es decir, la capacidad antirradical del compuesto a estudiar ^[138, 141].

Los mecanismos de transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrógeno pueden ser difíciles de distinguir. La reacción evidente en el mecanismo transferencia de átomos de hidrógeno es la transferencia del protón conjunta a la de un electrón. Por otra parte aunque la capacidad de reducción de una muestra no se relaciona directamente con la capacidad de reacción del antioxidante con el radical, es un parámetro importante en el estudio de los antioxidantes.

Las reacciones de transferencia de electrones dependen mucho más del disolvente que aquellas en las que existe una transferencia de átomos de hidrógeno; pero se ha visto que el disolvente puede ejercer una influencia clara en el ensayo de la capacidad de absorbanza del radical del oxígeno y en el ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico, a pesar de ser métodos transferencia de átomos de hidrógeno. Estas reacciones también son dependientes del pH. Algunos elementos traza y contaminantes (sobre todo metales) pueden interferir con estos métodos, resultando en una alta variabilidad y una baja reproducibilidad y consistencia de los

resultados. Las reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno vienen determinadas por la entalpía de disociación, de manera que un compuesto que la tuviera baja, facilitaría la abstracción del átomo de hidrógeno. Así mismo, ciertos aspectos estructurales como la presencia de un grupo hidroxilo en posición orto o la posible formación de enlaces intermoleculares entre distintos sustituyentes, pueden contribuir a reducir la entalpía de disociación, facilitando la formación de un radical estable. Por el contrario, las reacciones de transferencia de electrones dependen del potencial de ionización.

7.7. ¿Qué compuestos químicos podemos utilizar como antioxidantes?

En la industria farmacéutica y alimentaria los antioxidantes de mayor uso son el butilhidroxianisol, y el butilhidroxitolueno, su origen es sintético, sin embargo, se han encontrado efectos secundarios en humanos como el aumento del colesterol, hepatomegalia e inducción de cáncer hepático, entre otras. Se han modificado algunos antioxidantes sintéticos (BHA, BHT) y la estructura de algunos antioxidantes naturales, como el tocoferol, el ascorbato y carotenoides que disminuyen el efecto dañino del compuesto procedente, además se incrementó la búsqueda de sustancias que mimeticen la función de las enzimas antioxidantes, entre las que podemos encontrar al salicilato de diisopropil cobre (II) y otros complejos con cobre que muestran actividad parecida a la de la superóxido dismutasa o los organoselenio que tienen actividad semejante al glutatión^[113].

La importancia de los antioxidantes, ha hecho necesaria la búsqueda de moléculas alternativas de origen natural, con gran actividad sin efectos citotóxicos ni genotóxicos. Los productos vegetales se han convertido en una alternativa notable, ya que poseen una variedad de compuestos químicos como mono y polifenoles, antocianinas, flavonoides, carotenoides y ácido ascórbico, entre otros, que pueden ser inocuos para la salud y que actúan como agentes antioxidantes a bajas concentraciones^[86,92]. Por ejemplo la vitamina C, constituye el antioxidante hidrosoluble más abundante en sangre, mientras que la vitamina E, es el antioxidante lipofílico mayoritario. Algunos metales como el selenio, el más tóxico de los minerales incluidos en nuestra dieta, actúa junto con la vitamina E como antioxidante. Sus fuentes son la carne, pescado, cereales integrales y productos lácteos.

La mayoría de estos compuestos orgánicos que estructuralmente presentan un grupo -OH unido a un anillo aromático, se conocen como compuestos fenólicos y aquellos en que se repite este radical son conocidos como polifenoles^[171] (Fig. 7.14). Estos potentes antioxidantes, presentes en verduras y frutas, ejercen acciones secundarias como otorgar coloración y participan en el proceso de polinización. En esta familia se encuentran los flavonoides, ácidos fenólicos y taninos. Entre las fuentes de polifenoles podemos citar legumbres verdes, ajo, té verde, aceite y frutos del olivo, semillas de café, uvas, moras, cítricos, frutos secos y bebidas como el té, vino, cerveza, cacao, café,

etc. Los niveles de estos compuestos varían considerablemente dentro de la misma especie, e incluso entre sus variedades, a consecuencia de los factores genéticos y ambientales que condicionan la germinación, el crecimiento y calidad de los cultivos. Existen más de 800 estructuras fenólicas conocidas provenientes del metabolismo de las plantas, principalmente a partir de dos vías, la ruta del ácido shikímico y la del ácido acético. Algunos ejemplos son: Flavonoides, carotenoide, xantonas, en su mayoría metabolitos secundarios de plantas, que se obtienen para su estudio debido al interés que causan al funcionar en muchas ocasiones como defensa a los depredadores de plantas. Con base en ello los extractos de diferentes plantas han sido objeto de estudios antioxidantes [1, 7, 9, 26,30, 249].

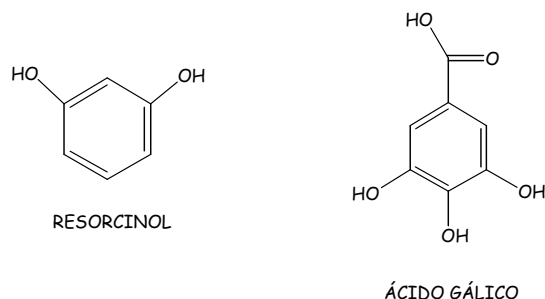


Fig 7.14. Estructura química que comparten la mayoría de los antioxidantes.

7.7.1. Compuestos químicos con actividad antioxidante, que no son polifenoles.

Los carotenoides, son una importante clase de fitonutrientes con muchos beneficios para la salud. Los carotenoides proporcionan una actividad antioxidante a las membranas celulares, y está comprobado que ayudan a proteger la piel contra los efectos negativos de la luz ultravioleta. Los principales son: β -caroteno, α -caroteno, licopeno, luteína. Como todos estos carotenoides están presentes en dietas, en suero han demostrado ser beneficiosos, es importante seleccionar fuentes con múltiples carotenoides de alimentos y suplementos. Se estima que una molécula de β -caroteno extingue hasta 1 000 moléculas de oxígeno singulete y es capaz de captar radicales peroxilo a través de la adición de este radical al sistemas conjugados, de tal manera que el radical se estabiliza por resonancia, hay que recordar que el β -caroteno es una molécula que cuenta con dobles enlaces conjugados [115].

Uno de los principales factores que afectan a la actividad de los antioxidantes en la captura de radicales libres, se relaciona con su comportamiento frente al agua y a los lípidos. Por ejemplo, los antioxidantes hidrofílicos son a menudo menos eficaces en emulsiones de aceite-agua que los antioxidantes liposolubles, mientras que los antioxidantes liposolubles son menos eficaces en los sistemas cuyo componente principal es hidrofílico. La diferencia en la eficacia de los antioxidantes en aceites y emulsiones se debe a su ubicación física en los dos sistemas. Los antioxidantes polares son

más eficaces en la mayor parte de aceites, ya que pueden acumularse en la interfase aire-aceite. En cambio, los antioxidantes no polares son más eficaces en las emulsiones, ya que se mantienen en las gotitas de aceite y pueden acumularse en la interfase aceite-agua. Los hidroperóxidos se producen en la superficie de interacción aceite/agua. Los agentes prooxidantes, como metales de transición, se producen en la fase acuosa, en una emulsión los antioxidantes polares se separan de la fase acuosa. La eficacia de los diferentes antioxidantes depende de las condiciones en las que se pretende que actúen. Los más polares (terbutil hidroquinona o galato de propilo) se comportan particularmente bien en la protección de aceites almacenados, dado que tienden a situarse en la superficie de contacto con el aire, que es donde precisamente se produce la oxidación. En cambio, en materiales con abundante agua sucede lo contrario, son preferibles los menos polares (tocoferoles, BHT) que no se pierden en la fase acuosa. Por lo tanto los antioxidante liposolubles son eficaces en el entorno lipídico del cuerpo, como las membranas celulares (vitamina E, carotenoides), y antioxidantes hidrosolubles en otras áreas del cuerpo (vitamina C). La vitamina C, es quizás el antioxidante hidrosoluble más efectivo, es capaz de atrapar y reducir a los radicales nitritos. Además de ser un buen aceptor de radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, hipoclorito, radical hidroxilo, radical peroxilo y oxígeno singulete^[173]. El ácido α -lipoico es un antioxidante único porque tiene la capacidad de actuar como antioxidante liposoluble y como antioxidante hidrosoluble.

7.7.2. Compuestos Fenólicos.

Los compuestos fenólicos son un grupo complejo de sustancias que han atraído considerablemente la atención, proporcionan color y sabor característicos a los alimentos, además de contar con numerosos beneficios para la salud. La actividad antiradical de los compuestos fenólicos se basa principalmente en las propiedades óxido reducción de los grupos hidroxilo y la relación estructural de los diferentes grupos funcionales ^[1, 7, 9, 26,30]. Los fenoles pueden donar átomos de hidrógeno de los grupos de hidróxido del fenol a los radicales de peroxilo una vez terminada las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica, se producen radicales estabilizados fenoxilo. La capacidad antioxidante de fenoles depende de los efectos electrónico y estérico del anillo, es decir de los sustituyentes, y de la fuerza de interacción del hidrógeno con el fenol y el disolvente.

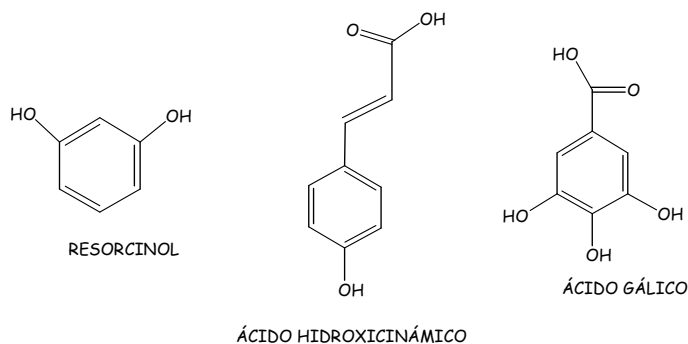
En la década de los 90's se propusieron efectos favorables de los compuestos polifenólicos, debida a su acción sobre sistemas enzimáticos, la modulación de procesos de inmunidad celular, inflamación, así como hepatoprotectores, antivirales, entre otros, también actividad antioxidante, antihipertensiva y antibiótica. Lo anterior se refleja en su uso en tratamientos preventivos de enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas, así como en la prevención y tratamiento del cáncer, en general, en todas aquellas enfermedades donde el estrés oxidativo tenga un papel importante. Los mecanismos de acción de los antioxidante son: inhibición de la generación de las enzimas productoras de especies reactivas de oxígeno como la xantina oxidasa, quelación de los

elementos traza involucrados en la fabricación de especies reactivas de oxígeno o bien en la captura directa de especies reactivas de oxígeno y la alta regulación de los sistemas antioxidantes endógenos. Los polifenoles estabilizan las especies reactivas de oxígeno al atraparlas formando el radical *aroxilo* (FI-O \cdot), que reacciona con un segundo radical y adquieren una estructura quinona estable. A partir de algunos estudios se ha reportado que los compuestos fenólicos previenen la peroxidación de lípidos vía donación de un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo que se encuentra en el anillo bencénico. Sin embargo, la conexión entre la estructura de estos compuestos y su actividad antioxidante es motivo de estudio en la comunidad científica ^[143, 165, 188, 205, 212].

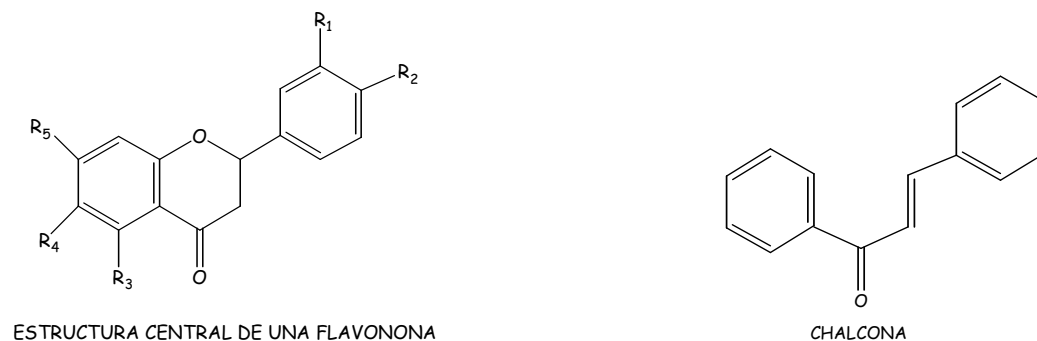
Entre estos compuestos con capacidad antioxidante podemos encontrar a los polifenoles, de manera general se han clasificado en flavonoides, las xantonas y los vaniloides, sin embargo, los compuestos fenólicos implican una gran diversidad de compuestos, clasificados a continuación:

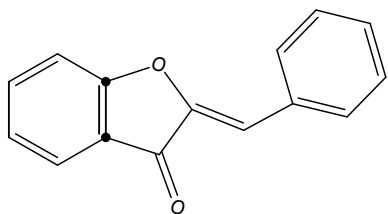
7.7.2.1. Clasificación de los compuestos fenólicos ^[26, 50,76, 80, 143, 165, 212]

A) Compuestos Fenólicos Simples:

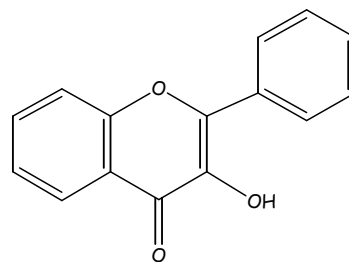


B) Flavonoides: flavanonas, chalconas, auronas, flavonoles, antocianinas, flavonoles y Flavonas.

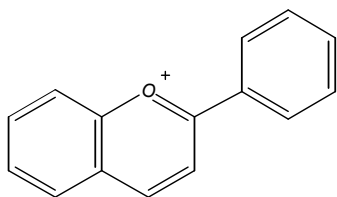




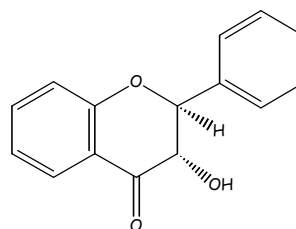
AURONAS



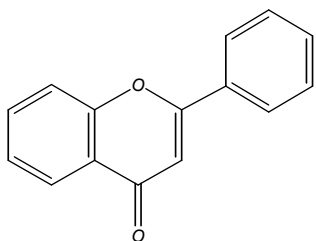
FLAVONOLES



ANTOCIANIDINAS

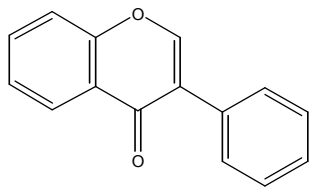


FLAVONONOLES

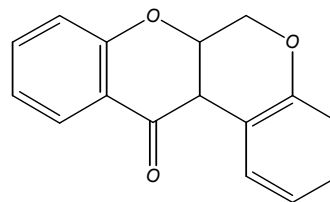


FLAVONAS

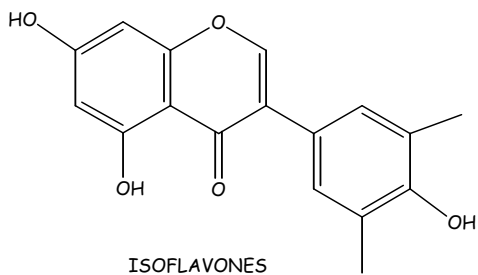
C) Isoflavonoides: isoflavonas, rotenoides, isoflavanonas, isoflavanos e isoflavenos.



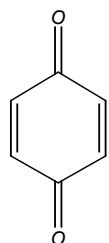
ESTRUCTURA CENTRAL DE UN ISOFLAVONOIDE



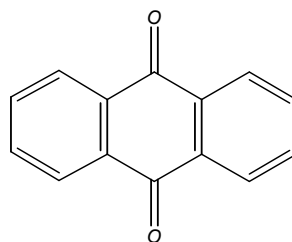
ROTENOIDES



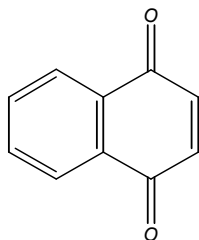
D) Quinonas: benzoquinona, antraquinona, naftoquinona, bis-antraquinona.



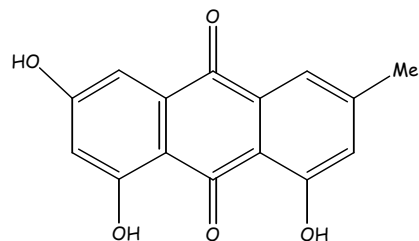
p- BENZOQUINONA



ANTRAQUINONA

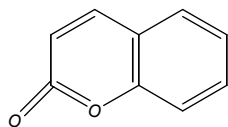


δ -NAFTOQUINONA

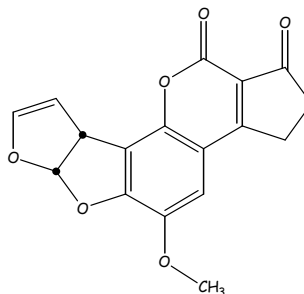


bis-ANTRAQUINONA

E) α -Pironas: cumarinas, isocumarinas, aflatoxinas.

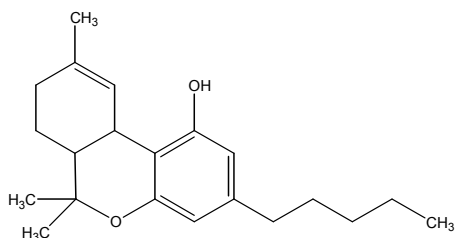


CUMARINA

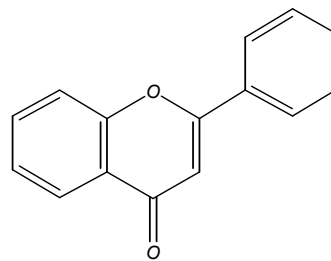


AFLATOXINA

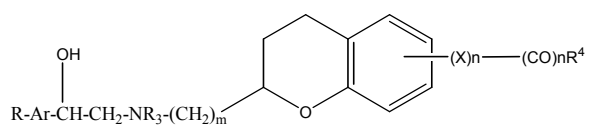
F) γ -Pironas:, cannabinoides, cromanos y cromonas



CANABINNOIDE

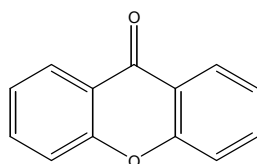


2-FENIL- γ -CROMONA



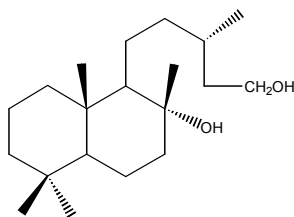
CROMANO

G) Xantonas.



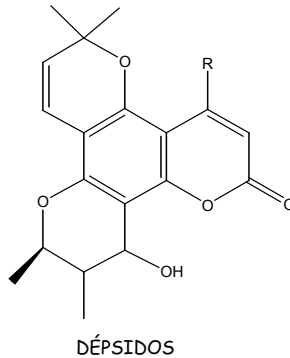
CENTRO DE XANTONA

H) Lignoides.

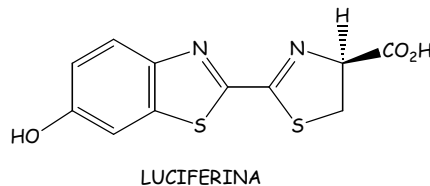


LIGNOIDE

I) Dépsidos.



J) Policétido aromático.

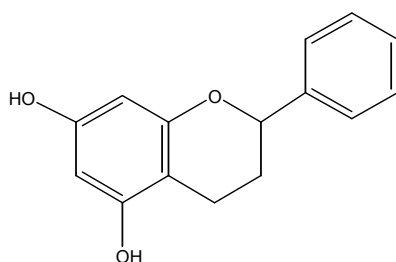


7.7.2.2. Polifenoles: Flavonoides, Xantonas, Vaniloides.

Dentro del grupo de los polifenoles, los compuestos de mayor importancia, centro de atención por su capacidad antioxidante, poseen la estructura química ideal para reaccionar con los radicales libres, se ha demostrado que cuentan con una mayor capacidad antioxidante *in Vitro* en comparación con el tocoferol y el ascorbato. Las propiedades antioxidantes de estos compuestos son consecuencia de la alta reactividad con el hidrógeno o bien por que son buenos donadores de electrones, estos radicales derivados de polifenoles son estabilizados al deslocalizar un par electrónico. Los compuestos de naturaleza fenólica, al ser eficaces antioxidantes, han sido de importancia en sistemas biológicos que han sido expuestos a estrés oxidativo, en especial en membranas biológicas por que inhiben la peroxidación lipídica ^[100, 132, 135]. Dentro de estos compuestos se encuentran los flavonoides, xantonas, vaniloides. Compuestos químicos de las plantas que se caracterizan por la presencia de más de un grupo OH, se consideran antioxidantes fuertes con beneficios potenciales para la salud.

7.7.2.3. Flavonoide.

Se han caracterizado más de 5 000 flavonoides de formación natural. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Sus propiedades anti-radicales libres, se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilos y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica, e inhiben también los efectos degenerativos provocados por el peróxido de hidrógeno. Los efectos benéficos de los alimentos derivados de las plantas son con frecuencia atribuidos a los flavonoides ^[193].



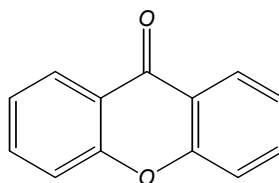
ESTRUCTURA BÁSICA DE FLAVONOIDES

Aunque diversos estudios indican que algunos flavonoides en algunas ocasiones actúan como prooxidantes, esto sólo ocurre cuando se producen a dosis altas, constatándose en la mayoría de las investigaciones la existencia de efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos, y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías. Los flavonoides pueden comportarse como antioxidante y prooxidante, e influyen en ello factores como las condiciones del ensayo, la concentración efectiva que se alcance en el sitio donde la especie reactiva de oxígeno es formada, la estabilidad del radical del flavonoides que se forma al donar un átomo de hidrógeno al radical atacante, la lipofiliidad para ser captados por la membrana y el pH del medio ^[76143,165, 243].

7.7.2.4. Xantonas

Las Xantonas son compuestos orgánicos de fórmula $C_{13}H_8O_2$, cuyo núcleo central forma parte de una gran variedad de compuestos orgánicos de origen natural, como el *mangostin*, a los cuales en conjunto se les conoce colectivamente como xantonas. Se ha identificado a más de 200 xantonas al ser extraídas del pericarpio de la fruta del mangostán (*garcinia mangostana*), que se puede encontrar en la región sureste de Asia. Las xantonas son biológicamente activas y taxonómicamente restringidas, es decir, cuentan con múltiples capacidades bioactivas como agentes antioxidantes y antiinflamatorios, pero se encuentran restringidas geográficamente al sureste asiático ^[109,110]. La fruta

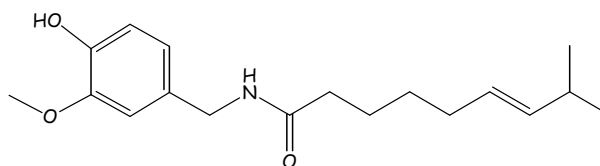
del mangostán tiene alrededor de 43 de estos fitonutrientes concentrados en la cáscara. En la industria, los derivados sintéticos de la xantonas son adicionados durante la polimerización del poliéster para obtener un plástico más resistente a la degradación ocasionada por la radicación ultravioleta. El de mayor uso es el derivado tetrahidroxixano ^[57,211].



CENTRO DE XANTONA

7.7.2.5. Vaniloides

Los vaniloides se caracterizan por la presencia del grupo funcional llamado vanillil (también conocido como vanilloilo). En estos compuestos se incluye a la vainillina, el ácido vanílico, la capsaicina y ácido vainillin mandélico. Un número de vaniloides, especialmente capsaicina, están enlazadas al receptor (TRPV1), un canal iónico que responde naturalmente a los estímulos nocivos tales como temperaturas altas y pH ácido. Esta acción es responsable de la sensación de ardor experimentada después de comer las pimientos picantes ^[84, 125, 169].



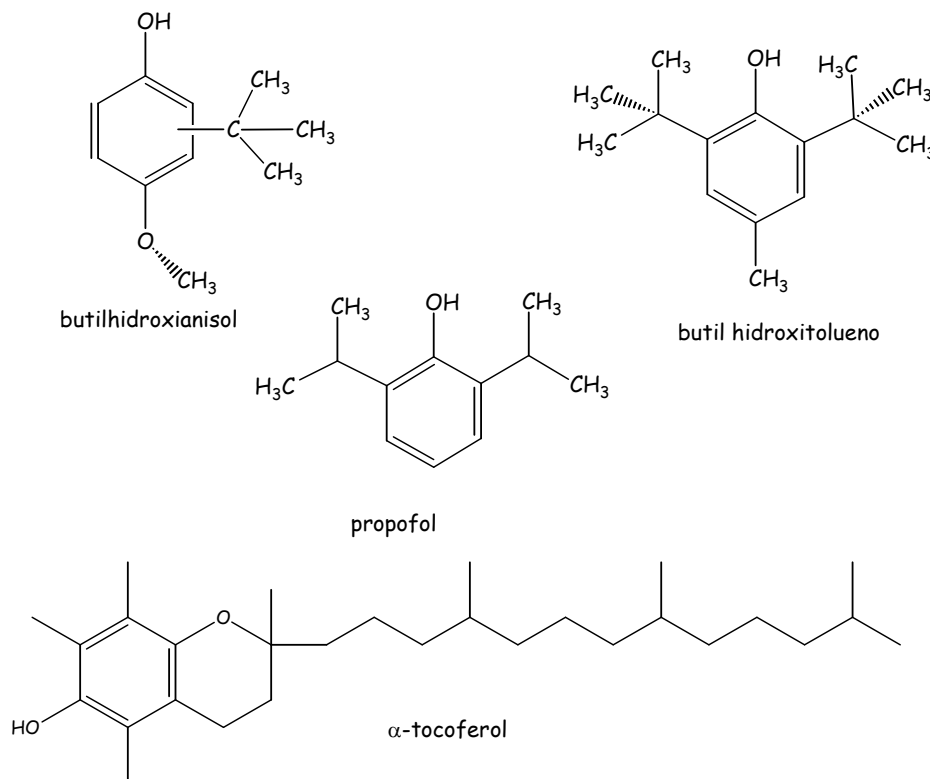
CAPSAICINA

Otros ejemplos de compuestos con capacidad Antioxidante

El butilhidroxianisol y el butil hidroxitolueno, antioxidantes sintéticos de mayor uso en la industria de alimentos y farmacéutica. Por su extenso uso y los efectos secundarios que tienen en la salud se han buscado otras alternativas antioxidantes en compuestos de origen natural que no presenten efectos citotóxicos ni genotóxicos. En esta búsqueda se han encontrado diversos compuestos, en su mayoría de origen natural o bien moléculas sintéticas, por ejemplo, el propofol, la morfina, ácido cafeico, melatonina, etc., algunas de ellas se describirán a continuación ^[72, 106].

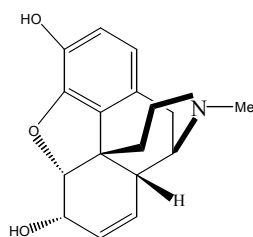
7.7.2.6. Propofol

El propofol es un compuesto usado en medicina para sedación, inducción, hipnosis, mantenimiento, efecto anticonvulsivante, disminución de tasa metabólica cerebral, disminución de presión intracerebral y se ha encontrado que tiene propiedades antioxidante *in vivo*. Su estudio como compuesto con posible capacidad antioxidante, se debe a que éste tiene una estructura química semejante a la de los compuestos más empleados butilhidroxianisol, butil hidroxitolueno y α -tocoferol, son anillos aromáticos con un grupo hidroxilo como sustituyente, que se ha mencionado es el causante de la capacidad antioxidante de un compuesto. Debido a la presencia del grupo hidroxilo en el anillo aromático, el propofol es inhibidor de gran parte de la síntesis neuronal del óxido nítrico, además reacciona con el peroxinitrito y elimina, e inhibe la peroxidación *in vitro* de lípidos inducida por diversos radicales libres que se generan en el sistema, (hidróxido, el ferril, y radicales oxo-ferril). Además el propofol tiene efecto antioxidante en microsomas hepáticos, y actúa como protector de algunas especies reactivas de oxígeno. Estudios han revelado que al comparar la capacidad antioxidante del propofol con el α -tocoferoles en relación a la inhibición de la peroxidación lipídica causada por el estrés oxidativo en microsomas hepáticos de ratas, se obtienen mejores resultados que los obtenidos con sus análogos tocoferoles ^[77,78, 79, 153].



7.7.2.7. Morfina

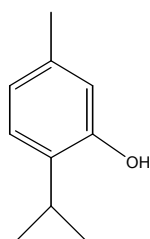
Dentro de la medicina se ha estudiado a la morfina como compuesto con posible actividad antioxidante. Por su potente efecto analgésico, en casos como el control del dolor severo, analgesia, anestesia, tratamiento del dolor asociado con isquemia miocárdica y/o disnea asociada con el fallo ventricular izquierdo agudo y edema pulmonar, además, el efecto de la morfina (10^{-6} M) como oxidante y/o antioxidante en células del sistema inmuno fagocitario fue estudiado *in vitro*. Causa diversos cambios en la producción de formas activas de oxígeno y en la capacidad antioxidante de las enzimas como la superóxido dismutasa y glutatión reductasa en neutrófilos, monocitos y linfocitos en sangre periférica humana [78].



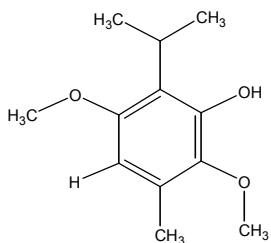
MORFINA

7.7.2.8. Isoespintanol

La información sobre el mecanismo y la cinética de oxidación de diferentes sistemas lipídicos inhibidos por el timol y carvacrol, reporta mayor efectividad en el primero, debido a la mayor estabilidad del radical timoil, causada por un efecto electrónico del grupo isopropil en posición orto al O-H. Fenoles, tales como timol, carvacrol, eucalipto y los hidrocarburos monocíclicos, tales como terpinoleno, R-terpineno y γ -terpineno, pertenecen a los antioxidantes naturales más activos encontrados en los aceites esenciales [75, 167]. Sin embargo, debido a la baja solubilidad en agua y al requisito de altas concentraciones para alcanzar un efecto terapéutico, la eficacia de estos compuestos en el tratamiento es limitada, sin embargo cuentan con un análogo el Isoespintanol. El isoespintanol, (2-Isopropil-3,6-dimetoxi-5-metilfenol) es un monofenol, un derivado biosintético del timol que actúa como antioxidante natural aislado de los extractos hexánicos de *Oxandra cf xylopioides* (Annonaceae), que se comporta como un buen reductor y con una alta capacidad para atrapar radicales libres en diferentes medios; además posee baja cito y genotoxicidad a 1 000 ppm, siendo un buen candidato para ser utilizado en medios alimenticios [199, 200].



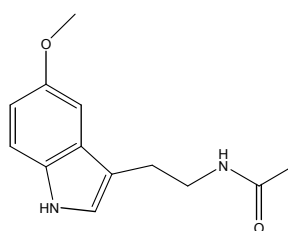
TIMOL



ISOESPINTANOL

7.7.2.9. Melatonina

La característica estructural de la melatonina, que actúa como un potente neutralizador de radicales libres, incluye el grupo metilo en posición 5 del grupo indol y el grupo acetilo, la estructura de la melatonina es marcadamente diferente a la de otros antioxidantes, es una molécula muy estable, la estructura es estabilizada por el anillo indol. La reacción de la melatonina con radicales está siempre acompañada por una pérdida de fluorescencia y la abertura del anillo indol. Se ha demostrado que la reacción oxidativa del anillo pirrólico no enzimática es mediada por radicales del sistema aromático heterocíclico, mecanismo por el cual la melatonina es metabolizada en contacto con intermediarios altamente reactivos del oxígeno, por lo que se ha puesto de manifiesto su alta capacidad neutralizadora frente a radicales libres $\cdot\text{OH}$. Los radicales $\cdot\text{OH}$ se producen *in vitro* con la exposición a luz ultravioleta (UV) (254 nm) de una solución que contiene peróxido de hidrógeno. La melatonina al ser comparada con GHS y con el manitol la coloca entre los mejores agentes neutralizadores de radicales $\cdot\text{OH}$ conocidos ^[45, 51, 190].

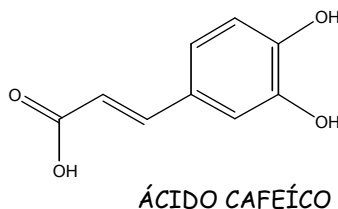


MELATONINA

7.7.2.10. Ácido cafeico

La capacidad antioxidante del ácido cafeico se ha evaluado con diversos ensayos, por ejemplo la actividad de la inhibición de la peroxidación de lípidos, radiólisis de pulso y por sus características electroquímicas. El mecanismo de oxidación del ácido cafeico ha sido estudiado con voltamperometría cíclica con un electrodo de carbono. Sigue un mecanismo donde dona dos electrones visto en una onda reversible en medios ácidos, mientras que demuestra un

comportamiento irreversible, es decir, hay una disminución en el pico de reducción, en medios poco ácidos, sugiriendo que la oxidación de CAF sigue una reacción química irreversible [82, 213].



Otro ejemplo es la pimienta, su capacidad antioxidante es parcialmente atribuida a la presencia de glucósidos como el camferol de los flavonoides, ramnetin y quercetina, así como otras cinco diversas amidas fenólicas. Además existen una variedad de diversos compuestos volátiles tales como los terpenoides del timol, por ejemplo el carvacrol, el eucalipto, la carvona y la tuyona, compuestos importantes por su capacidad antioxidante, su uso es limitado por el sabor característico de dichos compuestos. La investigación sobre la capacidad antioxidante en varios sistemas modelo es importante antes de su uso como antioxidantes en alimentos.

Se ha introducido recientemente en diferentes áreas de la industria alimenticia la técnica de espectroscopía de spin (EPR, electron parameter resonan) electrónico, la cual puede proporcionar información referente a los procesos elementales en la oxidación del lípido y la naturaleza de los intermedios de la reacción [132].

7.7.3. Mecanismos antioxidante de los polifenoles

El papel de un compuesto fenólico es interrumpir la segunda etapa en la cadena de propagación dentro de la oxidación de los lípidos, esto ocurre como consecuencia de dos mecanismos: transferencia de un átomo de hidrógeno o por transferencia de un electrón. En el mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno, el antioxidante, atrapa un radical por una donación rápida de átomos de hidrógeno. Los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes primarios al donar un átomo de hidrógeno a los radicales alcohóxicos (ecuación 1) o a los radicales del peróxido (ecuación 2) en reacciones irreversibles. Las reacciones llevan a la generación de un radical libre antioxidante (AOx[•]) con una energía más baja, comparado con la energía de los radicales RO[•] y ROO[•] [8, 75, 174, 249].



La estabilidad relativamente alta del radical que se genera a partir del Antioxidante reduce su capacidad de abstraer un hidrógeno de una molécula del lípido, rompe con la reacción en cadena. La eficacia de compuestos fenólicos como desactivantes (antioxidante) de radicales libres se debe a la alta estabilidad del radical fenoxi resultado de la deslocalización del electrón desapareado en el anillo aromático. Los fenoles no son activos como antioxidantes, a menos que la sustitución en la posición *orto* o *para* aumente la densidad electrónica en el grupo hidroxilo y baje la energía del enlace oxígeno-hidrógeno y aumente la reactividad hacia los radicales libres del lípido. La sustitución en compuestos fenólicos en la posición *meta* tiene un efecto algo limitado y los compuestos como el resorcinol con un grupo de hidróxido en la posición *meta* son así pobres limpiadores de los radicales libres comparados a los compuestos similares con una sustitución en la posición *orto* o *para*. Un análisis estructural de las resinas fenólicas probadas sugiere que la sustitución múltiple y la conjugación del OH son determinantes importantes de la actividad antiradical y del comportamiento electroquímico. Su reactividad como agente electrón-donante de hidrogeno predice su potencial para la acción como limpiadores radicales libre (que se relaciona con su potencial de la reducción), el radical derivado oxidante es importante por su capacidad de estabilizar y de deslocalizar el electrón desapareado. Además, la propensión para la quelación particularmente del Fe (II) y del Cu (II), apoyan el papel de los polifenoles como antioxidantes preventivos en términos de la inhibición de la formación de radicales libres catalizada por un metal de transición ^[76, 166,169].

En el segundo mecanismo el compuesto fenólico puede donar un electrón al radical peroxilo o a cualquier otra especie oxidante, Fe³⁺, que forman un catión radical del antioxidante (ArO^{•+}) ^[6, 212, 26]. Los compuestos fenólicos componen en gran proporción a los conocidos como antioxidantes naturales. Por ejemplo se han aislado y estudiado compuestos como el ácido carnosico, el carnosol, el rosmaridifenol y la rosmariquinona, los cuales se han identificado como antioxidantes. A los flavonoides solos o en conjunto con otros compuestos fenólicos (efecto sinergista) se les han atribuido propiedades antioxidantes ^[30].

7.7.4. Especies reactivas de oxígeno y los antioxidantes.

Los daños por estrés oxidativo son atribuidos a altas concentraciones de las especies reactivas de oxígeno, sin embargo todos los animales necesitamos de oxígeno para la producción eficiente de energía en la mitocondria. Esta necesidad es opacada por el hecho de que el oxígeno en altas concentraciones es un gas mutagénico, por esta razón los seres aerobios han desarrollado sus propias defensas antioxidantes. Los efectos dañinos del oxígeno dependen del tipo de organismo, el consumo de vitamina A, E y C, metales de transición, antioxidantes y lípidos poliinsaturados. Se ha propuesto que el daño ocasionado por el oxígeno se atribuye a la formación de las diferentes especies reactivas, no todas tienen el mismo patrón de reacción (es decir, transferencia del electrón) hacia los antioxidantes. Por ejemplo ROO[•] abstrae un átomo de hidrógeno de los antioxidantes,

mientras que el radical $\cdot\text{OH}$ puede experimentar la abstracción o la adición del átomo de hidrógeno a un compuesto no saturado (Ej. las bases nitrogenadas del ADN o a un residuo aromático de los aminoácidos) ^[210, 225, 226].

Al referirnos a los antioxidante y a las especies reactivas se deben aclarar términos y funciones de los mismos, pues al hablar de radicales libres podemos pensar que todos causan daños a la salud, y cuando se menciona a las antioxidantes estaríamos hablando del rescatador de la célula, sin embargo algunos radicales libres son necesarios para cumplir alguna función en la célula y no todos los antioxidantes cumplen con su función adecuadamente. La vida es un balance entre radicales libres y antioxidantes, los antioxidante mantienen en niveles adecuados a los radicales libres, permitiendo que estos cumplan con sus funciones biológicas sin ocasionar un daño considerable. Probablemente siempre se produce alguna lesión oxidativa debido al flujo destructivo de especies reactivas de oxígeno. Estos dos mecanismos opuestos están habitualmente equilibrados. Sin embargo, bajo condiciones de estrés y a lo largo del proceso normal de envejecimiento, el número de especies reactivas de oxígeno puede llegar a exceder la capacidad de defensa antioxidante del organismo, o bien puede modificarla. Cuando esto ocurre, el resultado es la lesión oxidativa. Por lo que no todos los radicales libres son malos ni todos los antioxidantes son buenos

7.8. Determinación de la capacidad secuestradora. Ensayos importantes para la evaluación de la capacidad antioxidante.

En muchos de los casos la medición de la capacidad antioxidante de una sustancia es una acción sinérgica de los diferentes compuestos de la reacción, esto nos lleva a pensar que la medición de la capacidad antioxidante no es un asunto sencillo, la principal desventaja radica en no poder comparar resultados entre los diferentes grupos de investigación, sin embargo, se han hecho importantes adelantos en la generación de ensayos que midan la capacidad antioxidante *in Vitro*. Se describirán, en primera instancia, aquellos ensayos en los que se involucran especies reactivas de oxígeno como especie oxidante, ya que simulan condiciones celulares. A continuación se describirán los ensayos en los que se hace uso de radicales que no son generados en un sistema biológico ^[88].

Se tiene conocimiento de ello al medir su capacidad como secuestrador de radicales. En detalle no sólo encontramos la definición como capacidad antioxidante, sino que habrá quienes la definan como eficiencia, poder, parámetro, potencial, potencia, actividad, todos estos términos tienen sentido sí y sólo sí especificamos cuáles son las condiciones de la reacción con la que evaluaremos al antioxidante, por ejemplo presión, temperatura, media reacción, co-reactantes y puntos de referencia. Existen diferentes ensayos para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos, también existen ensayos que evalúan la capacidad secuestradora de las sustancia frente a especies reactivas de oxígeno, en específico para $\text{O}_2^{\cdot-}$, peróxido de hidrógeno, $\cdot\text{OH}$, son los compuestos

frecuentemente usados, porque pueden existir *in vivo*. Sin embargo, el radical peroxil (ROO^\bullet) soluble en agua es el generador por descomposición térmica de los azoiniciadores sobre todo clorhidrato de 2,29-azobis (2-amidinopropano) (ABAP) y 2,2'- diazobis (2-amidinopropano) (AAPH) también ha sido ampliamente utilizado [8,12, 31,174, 184, 186].

Para iniciar el estudio de los diferentes ensayos, se describirán primero los que implican directamente una especie reactiva de oxígeno.

7.8.1. Ensayos que implican directamente una especie reactiva de oxígeno.

7.8.1.11. Radical peroxil ROO^\bullet .

Los métodos para la determinación de la capacidad secuestradora de un antioxidante frente a un radical peroxil se basa en reacciones de transferencia de átomos de hidrogeno. En este caso se trata de ensayos competitivos, en los que están involucrados tres componentes:

- (i) azo-compuestos termolábiles (R-N=N-R), proporcionan los radicales (R^\bullet) que reacciona rápidamente con el oxígeno para producir un flujo constante de radicales ROO^\bullet (ii) un blanco oxidable; (iii) compuestos con posible actividad antioxidante.

Sin embargo la producción de los radicales ROO^\bullet es determinada por la temperatura del medio de reacción. En este tipo de ensayos (competitivos) el antioxidante compite por la especie oxidable por el radical ROO^\bullet , el Antioxidante es consumido en la reacción por los radicales ROO^\bullet y la oxidación del blanco es más lenta comparada con el control. En el inicio de estos ensayos los cambios espectroscópicos son mínimos ya que la reacción se encuentra en la etapa de inducción o bien en la llamada fase Lag [53, 201].

7.8.1.1. Anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$).

Experimentalmente para la generación de este radical se emplean los sistemas xantina oxidasa/hipoxantina o xantina a un pH de 7.4, o bien en la forma no enzimática con la reacción de metasulfonato de fenacina en presencia de NADH. En ambos sistemas la generación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede reducir el azul de nitro tetrazolio (NBT, siglas en ingles) se supervisa por espectrofotometría a 560 nm. En este caso el antioxidante compite con el NBT por el $\text{O}_2^{\bullet-}$ inhibiendo la reacción de oxidación. En solución acuosa las propiedades básicas y nucleofílicas del $\text{O}_2^{\bullet-}$ son fuertemente reducidas así como su capacidad oxidante, por lo que se convierte en un agente reductor. El porcentaje de inhibición de la formación del radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ se calcula a partir de [11, 76, 90].

$$\%inhibición = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) * 100$$

Donde A_0 es la absorbancia de un control, en la mayoría de los casos ácido ascórbico y A_1 es la absorbancia de la muestra, antioxidante.

7.8.1.2. Peróxido de hidrógeno.

La especie $O_2^{\cdot -}$ a pH fisiológico se protona inmediatamente y produce peróxido de hidrógeno. El radical se genera *in vivo* en condiciones fisiológicas en los peroxisomas por algunas enzimas oxidativas, entre las que se incluyen las glucosa oxidasa y ácido D-amino oxidasa, también se forma por la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ catalizado por la superóxido dismutasa. Los ensayos para medir la capacidad de secuestro del peróxido de hidrógeno, se basan la medición de la absorbancia de radiación ultravioleta, al disminuir la concentración de peróxido de hidrógeno por la reacción con el compuesto antioxidante disminuye la absorbancia reportada a 230 nm. En este tipo de ensayos, algunas muestras pueden absorber a esta longitud de onda, se hace indispensable la medida de un blanco, esto puede comprometer la precisión y la exactitud del método, por el cambio en el medio de reacción, así que el blanco no es del todo válido. Una de las desventajas de este ensayo es que es difícil distinguir entre los pequeños cambios cuando hay una absorción de fondo mucho más grande. La capacidad de secuestro para esta especie reactiva de oxígeno se calcula con la siguiente ecuación ^[44, 170, 177]:

$$\%secuestroH_2O_2 = \left[\left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \right] * 100$$

Donde A_0 es la absorbancia del control y A_1 es la absorbancia de la muestra.

En otro ensayo para el peróxido de hidrógeno se emplea la peroxidasa del rábano, en reacción con peróxido de hidrógeno para oxidar a la molécula de escopoletina, cuyo producto de oxidación es un compuesto no fluorescente en presencia de compuestos antioxidante, la oxidación del escopoletina es inhibida, esta reacción se supervisa por análisis fluorimétrico. (a) Los antioxidantes inhiben la oxidación al reaccionar directamente con peróxido de hidrógeno, (b) al interactuar con los intermedios formados de la enzima y de peróxido de hidrógeno, o (c) inhibiendo la peroxidasa del rábano al reaccionar con peróxido de hidrógeno ^[170, 177]. Por lo tanto, es difícil explicar el significado químico real de los datos. Otro análisis fluorimétrico de amplia difusión emplea el ácido homovainillico, cuyo dímero fluorescente es un bifenil más estable que el escopoletina. La presencia de sustancias con capacidad del barrido del peróxido de hidrógeno previene la oxidación del ácido

homovanílico, sin embargo, los acercamientos basados en peroxidasa no permiten determinar si el antioxidante está reaccionando directamente con peróxido de hidrógeno, o si reaccionan con los intermediarios formados de la enzima y del peróxido de hidrógeno (es posible que el radical del superóxido se produzca durante actividad enzimática). Por otra parte, los antioxidantes tales como ácido ascórbico, dihidrato de quercetina, y algunos tioles pueden ser un sustrato para la enzima peroxidasa, lo introduce errores en la determinación de la capacidad del barrido. El inconveniente de este ensayo es la interferencia con el sistema de peroxidasa, por lo que podemos citar otro ejemplo, es la reacción directa de peróxido de hidrógeno y titanio (IV), donde forma un complejo titanio peróxido de hidrógeno (Ti-H₂O₂) disuelto en medio ácido, monitoreado espectrofotométricamente a 410 nm ^[148].

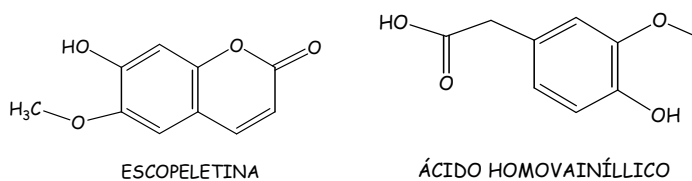


Fig. 1.15. Estructura de la escopetina y el ácido homovainílico, moléculas oxidables útiles en los ensayos de secuestro del peróxido de hidrógeno.

7.8.1.3. Radical hidroxilo $\cdot\text{OH}$.

Debido a la alta reactividad de los radicales de hidróxido, casi cualquier molécula en sistemas biológicos puede ser mirada como secuestradora del $\cdot\text{OH}$. Así que esta tarea no se realiza por ninguna molécula o enzima específica. La estimación directa de $\cdot\text{OH}$ puede ser inaplicable para la evaluación de la acción antioxidante de un compuesto o de una matriz porque las concentraciones del posible antioxidante deben ser muy altas para poder competir con moléculas *in vivo* o en la matriz del alimento para el radical $\cdot\text{OH}$ generado. Por lo que resulta más relevante y útil cuantificar la capacidad de antioxidantes para bloquear la formación de sus precursores ($\text{O}_2^{\cdot-}$, peróxido de hidrógeno, HClO) y/o el secuestro de los iones libres del metal relacionados con la formación de $\cdot\text{OH}$. Los compuestos que actúan de esta manera se comportarían como antioxidantes preventivos ^[98].

Debido a su alta reactividad, los radicales $\cdot\text{OH}$, una vez formados *in vivo* o *in vitro* tienen vida corta, del orden de nanosegundos y por lo tanto no pueden ser medidos directamente. Sin embargo, usando 5,5-dimetil-pirrol-N-óxido (DMPO), agente «cazador» de spin, éste forma un complejo con los radicales $\cdot\text{OH}$ (DMPO-OH) de vida media larga en el intervalo de las horas, de esta forma puede ser cuantificado. El complejo DMPO-OH se identifica y separa mediante el uso de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un mecanismo de detección electroquímica y se confirma su presencia por resonancia electromagnética (EPR) ^[105].

Las metodologías *in vitro* para determinar $\cdot\text{OH}$ se basan en la reacción $\text{Fe}^{3+} + \text{EDTA} + \text{H}_2\text{O}_2$ en un sistema de ácido ascórbico para generar un flujo constante de $\cdot\text{OH}$ radicales. Estos radicales atacan la deoxiribosa (usada como blanco), reacciona sobre calor con ácido tiobarbitúrico (ATB) a pH bajo para dar un cromógeno rosado. Si un compuesto antioxidante se agrega a la mezcla de reacción, éste competirá con el ácido tiobarbitúrico por los radicales $\cdot\text{OH}$, inhibiendo la degradación de la especie blanco (ejemplo, deoxiribosa) ^[76, 88].

7.8.1.4. Oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$).

El oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) es un estado excitado del oxígeno molecular que no tiene electrones desapareados, es oxidante de gran alcance, reacciona directamente con una amplia gama de biomoléculas. Debido a que se encuentra en un nivel de alta energía decae al estado basal (O_2). Como consecuencia de esta transición emite fosforescencia característica a 1270 nm. La capacidad secuestradora para el ($^1\text{O}_2$) de diversos compuestos se miden con los índices de decaimiento de la intensidad de luz, sin embargo, la intensidad de la luminescencia basada en la emisión de ($^1\text{O}_2$) es a menudo escasa para proporcionar información cuantitativa reproducible, incluso en medio acuoso. Se ha desarrollado un método de mayor sensibilidad que se basó en la supervisión de la fluorescencia del ($^1\text{O}_2$) con tetratertbutilftalocianina, este método no se aplica extensamente sino que es útil para la medida de los constantes de reacción para ($^1\text{O}_2$) que se “apaga”, requiriendo el equipo comúnmente disponible y también aplicable a los sistemas, dónde es difícil detectar la luminescencia de 1270 nm ^[88, 119, 138].

7.8.2. Ensayos para conocer la actividad antioxidante de un compuesto.

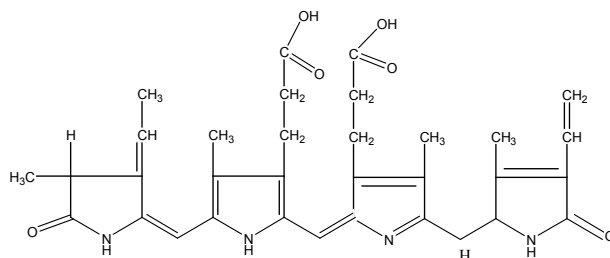
Los ensayos para medir la capacidad antioxidante se pueden clasificar en dos ramas de acuerdo a la partícula que se transfiere en la reacción, en primer caso tenemos los ensayos en los que se transfiere un átomo de hidrógeno, se basan en el esquema de ensayos competitivos, el antioxidante y el sustrato, compiten por los radicales térmicamente generados a partir de un radical peroxilo y la descomposición de un compuestos azo, en esta clasificación se encuentran los ensayos capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno, parámetro de análisis e interceptación total de radicales peroxilo, blanqueamiento de la molécula de crocin, blanqueamiento de β -caroteno, linoleico, Método del ácido tiobarbitúrico, capacidad de absorción de radicales libres de hidroxilo, capacidad total de barrido de radical oxígeno ^[103]. Por otro lado, los ensayos en los que se transfiere un electrón, se mide la capacidad antioxidante por la reducción de un oxidante que cambia de color cuando al ganar un electrón los ensayos que actúan con este mecanismo son: Folin-Ciocalteu, capacidad antioxidante en equivalentes de trolox, Capacidad del plasma para reducir el ion férrico, capacidad

antioxidante por reducción del ión cobre (II), Ensayo de captura del radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil, Ensayo de la captura del radical N,N-dimetil-*p*-fenilenediamina, voltamperometría ^[174].

Los ensayos para evaluar la capacidad antioxidante emplean propiedades químicas de los compuestos, que son monitoreadas por espectrometría ultravioleta-visible, Resonancia paramagnética electrónica, fluorescencia, quimioluminiscencia, cromatografía líquida de alta resolución, así como por algunas técnicas electroquímicas. A continuación se describen de forma muy breve los ensayos que siguen un mecanismo basado en la transferencia de átomos de hidrogeno:

7.8.2.5. Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC).

Capacidad radical de la absorción del oxígeno, determina de forma directa la capacidad antioxidante frente a una fuente de radicales. En un principio se planteó para el radical ROO[•], sin embargo, puede ser adaptado para la medición de otras especies reactivas de oxígeno. En términos generales, este ensayo implica ROO[•], como oxidante y proporcionará la información útil en capacidad de romper la cadena radical. El mecanismo de la reacción se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno del antioxidante al radical libre ^[55, 188]. La capacidad radical de la absorción del oxígeno se fundamenta en el decremento de intensidad en la β-ficoeritrina (Fig 7.16) a lo largo del tiempo en el que está expuesto a un flujo continuo de radicales peroxilo (ROO[•]), que se genera por la descomposición térmica de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) (Fig. 7.17) o por la reacción de Cu²⁺ con peróxido de hidrógeno, en un medio acuoso a pH controlado ^[8, 12, 63, 88, 159]. Un mol de 2,2'-azobis(2-amidinopropano), pierde un mol de nitrógeno, es así como se generan dos moles del radical 2,2'-azobis(2-amidinopropano) en flujo constante. En una solución saturada de aire, el radical 2,2'-azobis(2-amidinopropano) reacciona rápidamente con el oxígeno para dar un radical peroxilo más estable, ROO[•]. La pérdida de fluorescencia de la β-ficoeritrina es el indicador de la extensión de la oxidación con el radical peroxilo, en presencia de un antioxidante el radical ROO[•] capta un átomo de hidrógeno del antioxidante, el resultado es la inhibición en la disminución de la fluorescencia de la β-ficoeritrina por acción del ROO[•].



β- ficoeritrina, fluorescente

Fig. 7.16 Molécula blanco, en la determinación de la capacidad antioxidante por ensayo de capacidad de absorción de radicales oxígeno.

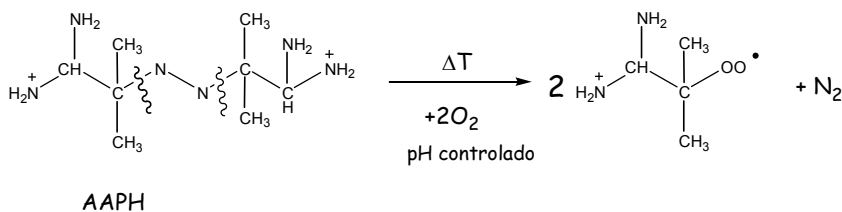


Fig.7.17 Pro-oxidante generador de ROO^\bullet es el compuesto 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH), para los ensayos ORAC, TRAP, linoleico.

El ensayo de la capacidad de absorción de radicales oxígeno es monitoreado por un periodo menor o igual a 30 minutos. La cuantificación se basa en el área bajo la curva (ABC) (Fig.7.18), que representa la oxidación de la muestra en función del tiempo, en comparación con el área bajo la curva del blanco, donde el antioxidante no está presente ($ABC_{muestra} - ABC_{blanco}$), los resultados se expresan como milímetro de equivalentes de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox). Cuando se tiene una muestra con antioxidantes el decaimiento de la fluorescencia es inhibida, por lo tanto el cambio en la intensidad de la fluorescencia es un índice del grado del daño inducido por el azo-radical. En presencia de un antioxidante, el daño acusado por el radical se retarda, lo que se refleja en la protección contra el cambio de intensidad de fluorescencia con un aumento en el ABC. Es el único método que registra la acción de la especie radical de inicio a fin, y usa el área bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia para realizar la cuantificación de la capacidad antioxidante. De esta manera se considera tanto el porcentaje de inhibición como la extensión de tiempo de ésta en un solo valor. El ensayo de capacidad de absorción de radicales oxígeno ha sido modificado para medir los antioxidantes lipofílicos usando un derivado de la ciclodextrina como reforzador de la solubilidad en agua [88, 158, 159].

Los valores para el ensayo de capacidad de absorción de radicales oxígeno se calculan por diferencia del área bajo la curva (ABC) del decaimiento en la fluorescencia entre la molécula empleada como blanco y la muestra a estudiar, con la siguiente fórmula:

$$ORAC(\mu\text{molequivalentes de TROLOX} / g) = \left[\frac{(A_s - A_b)}{(A_t - A_b)} \right] * K * a * h$$

A_s = Área bajo la curva de la muestra fluorescente

A_t = Área bajo la curva de ácido 6-hidroxi-2, 5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox)

A_b = Área bajo la curva control

K = factor de dilución

a = concentración ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico $\mu\text{mol} / l$

h = relación entre la concentración de la muestra y el control.

La ventaja del acercamiento de ABC es que puede ser aplicada para los antioxidantes que exhiben fases de retraso distintas y a muestras que no tengan ninguna fase de retraso.

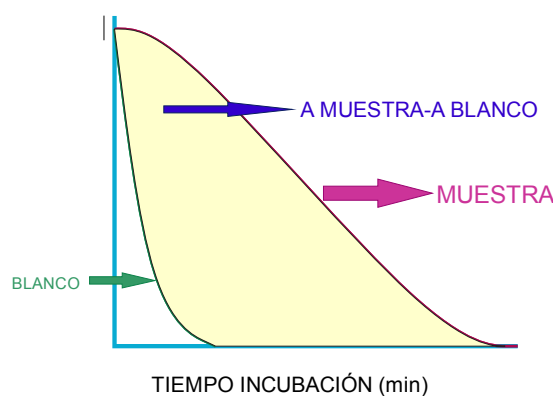


Fig. 7.18 ORAC su cuantificación se basa en el área bajo la curva (ABC).

El análisis de la capacidad de absorción de radicales oxígeno ha sido utilizado por diversos laboratorios y ha proporcionado información significativa con respecto a la capacidad antioxidante de varias muestras biológicas de compuestos puros tales como melatonina, dopamina y flavonoides, o de matrices complejas tales como té, frutas, vegetales y tejidos animal. A diferencia de otros modelos en los cuales se usan agentes oxidantes como pro-oxidantes, el ensayo de la capacidad de absorción de radicales oxígeno, puede realizarse con otras especies de oxígeno, lo que lo presenta como un ensayo versátil, ya que mide todo tipo de antioxidantes y con la posibilidad de detectar el efecto antioxidante a nivel biológico ^[8,13, 119].

7.8.2.6. Parámetro de análisis de la intercepción total del radical peroxilo (TRAP).

En el ensayo del parámetro de análisis de la intercepción total del radical peroxilo se incluyó un parámetro de intercepción total del radical desarrollado por Wayner (1985), y es el más empleado en la medida de la capacidad antioxidante en muestras biológicas. En este análisis, el blanco es plasma humano, el oxígeno que se consume en la oxidación es la molécula de prueba (diclorofluoresceína, Fig. 7.19) usada para seguir la acción de antioxidantes ^[56]. La medida se basa en el “tiempo de retraso” que corresponde al plazo entre el principio del análisis y el principio de la oxidación de moléculas del blanco. La reacción de peroxidación es inducida por la descomposición térmica de un azo-compuesto.

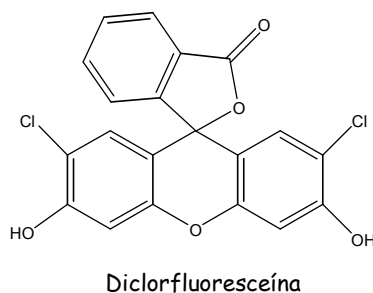


Fig.7.19 Molécula blanco, en la determinación de la capacidad antioxidante por ensayo parámetro de análisis de la intercepción total del radical peroxilo y del ensayo que mide la capacidad de absorción de radicales libres hidroxilos.

Es un ensayo que involucra un oxidante y un pro-oxidante el (ROO^{\bullet}) generado por el compuesto 2,2'-azobis 2-amidinopropano, además de materiales peroxidables contenidos en muestras biológicas. Al agregar 2,2'-azobis-2-amidinopropano, la oxidación de los compuestos es monitoreada por la medida del oxígeno consumido durante la reacción. En el período de inducción esta oxidación es inhibida por los antioxidantes en la muestra. El parámetro que es monitoreado es el consumo de oxígeno, por lo que el problema que presenta este ensayo es el uso de un electrodo de oxígeno que no se estabiliza en el periodo de tiempo requerido. Este ensayo se ha modificado en diferentes puntos, por ejemplo la adición de ácido linoleico a la muestra antes de que la oxidación fuera iniciada por los radicales del peroxil, otra variante en el ensayo es la introducción de una proteína en lugar de un lípido como sustrato, cuya señal fluorescente facilitaba su monitoreo. Su cuantificación se basa en la duración de la fase lag, donde la oxidación es inhibida por el antioxidante, esta fase se compara con la obtenida para el control el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil cromano-2-carboxílico ^[9, 155].

Las diferencias entre el capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno y ensayo que determina el parámetro de análisis de la intercepción total del radical consisten principalmente en el sustrato, los blancos a emplear, cada una de las condiciones de reacción, así como los métodos de

cuantificación. La cuantificación se basa en la duración de la fase de lag en la cual, la oxidación es inhibida por los antioxidante, comparada a la fase de retraso de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico. La capacidad antioxidante expresada como equivalentes del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico ($X_{\text{Antioxidante}}$) es calculado por la ecuación siguiente:

$$X_{AOx} = \left(\frac{C_{TROLOX}}{T_{TROLOX}} \right) * T_{AOx}$$

Donde C_{TROLOX} es la concentración de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, mientras que T_{TROLOX} y T_{AOx} son el tiempo de retraso de la curva cinética de la oxidación del blanco en presencia de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico o en presencia de antioxidante/muestra, respectivamente; X_{AOx} [66, 88].

7.8.2.7. Capacidad total de barrido del radical oxígeno (TOSC)

El ensayo de capacidad total de barrido del radical oxígeno es un método novedoso para la medición rápida de la capacidad antioxidante protectora de disoluciones puras con posible actividad antioxidante. Se fundamenta en la generación del radical ROO^{\bullet} por la homólisis térmica de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (Fig. 7.16), este radical provoca la oxidación de ácido α -ceto- γ -metiltiobutírico (KMBA) a etileno. La formación de etileno en la reacción se cuantifica por cromatografía de gases. La producción de etileno se reduce en presencia de antioxidantes debido a la captación de radicales peroxilo, por estos compuestos e inhiben la oxidación ácido α -ceto- γ -metiltiobutírico (Fig. 7.20). El importe de la disminución de la producción de etileno en comparación a una reacción de control sin antioxidante proporciona una medida relativa de la capacidad antioxidante [155].

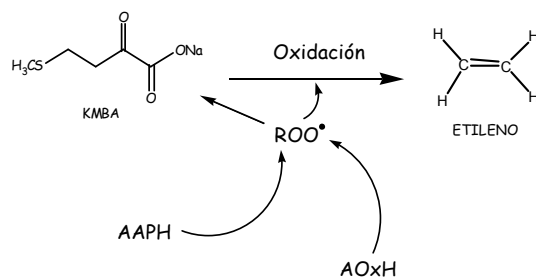


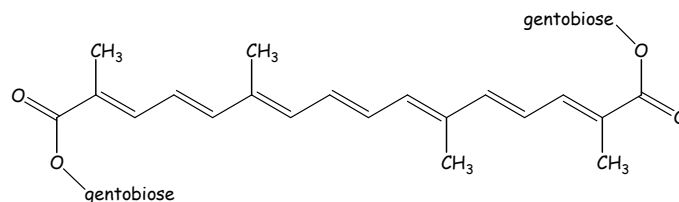
Fig. 7.20. Proceso de oxidación del ácido α -ceto- γ -metiltiobutírico a etileno

La cuantificación de la capacidad antioxidante en el ensayo de capacidad total de barrido del radical oxígeno aplica los mismos principios empleados en la capacidad de absorción de radicales

oxígeno. En este caso el área bajo la curva (ABC) representa la inhibición de la formación de etileno en función del tiempo. Sin embargo, no existe una relación lineal entre ABC y la concentración del antioxidante o con un factor de dilución de la muestra. Por lo tanto, se calculan las concentraciones a partir de la curva cinética correspondiente a los valores de capacidad total de barrido del radical oxígeno de 20, 50 y el 80 % del avance de la reacción y DT50 es la primera derivada de la curva en un Capacidad total de barrido del radical oxígeno al 50 %. El tiempo de reacción largo (>100 min), la vida media de corta duración de las soluciones del análisis incrementa la necesidad de inyecciones manuales múltiples de la misma muestra en cromatografía de gases para supervisar la formación de etileno, lo que hace a este análisis difícil ejecutar como análisis de rutina^[13].

7.8.2.8. Ensayo de blanqueamiento de Crocin.

Se basa en la oxidación del carotenoide Crocin (Fig. 7.21), por los radicales peroxilos generados por el 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (Fig 7.16). El crocin es una mezcla de pigmentos naturales, se extrae del azafrán, cuya proporción es variable, lo que limita su uso cuantitativo en la industria, absorbe a una longitud de onda corta (450 nm), la desventaja es que muchos pigmentos como los carotenoides interfieren. Este ensayo mide la capacidad de inhibición de un antioxidante, en la inhibición de blanqueo del Crocin o la decoloración de β -caroteno, que es un derivado carotenoide, debido a su reacción con los radicales libres formados del proceso de oxidación del ácido linoleico o metil linoleato, usados como sustratos oxidables. Los radicales destruyen la conjugación del β -caroteno disminuyendo su capacidad de absorción a 455 nm y se determina capacidad antioxidante en competencia con un compuesto patrón^[153].



Crocin, disuelto en H₂O, λ_{\max} = 443 nm.

Fig 7.21 Molécula blanco caroteno de Crocin

En el ensayo de blanqueamiento de Crocin, la abstracción de los átomos de hidrógeno y/o la adición del radical a la estructura del polieno de crocin, explican la interrupción en el blanqueo conjugado en el sistema. La disminución en el blanqueo se registra como la reducción en la absorbancia por la presencia o la ausencia de limpiadores radicales. Se ha encontrado que el índice absoluto de blanqueo del crocin depende en gran medida de la clase de radical que ataca la estructura del polieno. En estos últimos, la formación radical del peroxil fue alcanzada usando azo-

iniciadores (hidrofílicos o lipofílicos). El análisis de blanqueo del crocin es limitado en el análisis de muestras en alimentos, la inhibición del blanqueo es muy pequeña, por lo que no es muy sensible a los cambios de la concentración del antioxidante. Ésta podría ser la razón por la cual la vitamina C tiene un valor de capacidad antioxidante inusualmente grande. Además este ensayo mide tres propiedades antioxidantes de cada muestra. Dos de estas propiedades se pueden explicar basados en el mecanismo general de la oxidación de ácidos grasos ^[4].

El ensayo de blanqueamiento de la molécula de Crocin es un análisis que permite la evaluación del balance entre pro-oxidantes y antioxidantes (BPA), mide el equilibrio simultáneamente, usando 3,3',5,5' -Tetrametilbenzidina (TMB), en dos diferentes clases de reacciones; una reacción enzimática en la cual el cromógeno 3,3',5,5' -Tetrametilbenzidina se oxida o colorea el catión por los peróxidos, y un producto químico de la reacción en la cual el catión de 3,3',5,5' -Tetrametilbenzidina se reduce a un compuesto descolorido por los antioxidantes. La cuantificación de la capacidad antioxidante se basa en el cociente de las velocidades de blanqueo del crocin en la ausencia (V_0) y en la presencia (V) de antioxidantes y está dada por la relación ^[165]:

$$V_0/V = 1 + (k_{Aox}/k_C) * ([C]/[Antioxidante])$$

Donde [antioxidante] y [Crocín] son las concentraciones de antioxidante y de crocin, respectivamente, el k_{Aox} y el k_C son los constantes de la reacción cinética de los radicales peroxil con el antioxidante y el crocin, respectivamente. Después de medir el valor de V_0/V en el cociente $[Antioxidante]/[C]$, $k_{Antioxidante}/k_C$ es dado por el valor de la pendiente obtenido en la ecuación, que indica la capacidad de secuestro del radical peroxilo.

7.8.2.9. Método del ácido tiobarbitúrico (ATB).

Un método alternativo es la determinación del contenido de malondialdehído (MDA) en suspensión celular, después de someter las células a oxidación con peróxido de hidrógeno. En este ensayo, el ácido tiobarbitúrico (ATB) ($C_4H_4N_2O_2S$) reacciona con malondialdehído ($C_3H_4O_2$), un producto secundario de la peroxidación de lípidos, para generar un compuesto color rojo, cuya concentración se determina espectroscópicamente a 530 nm (Fig. 7.22) ^[227]. Se estudia la acción de diferentes antioxidantes sobre la modificación de las lipoproteínas de baja densidad (LBD) inducida por el ión cúprico, se determina el contenido de los productos de oxidación, como el malondialdehído, que presentan reactividad con el ácido 2-tiobarbitúrico, obtenidos de la LBD con el Cu (II), en ausencia y presencia de antioxidantes ^[9, 159, 188].

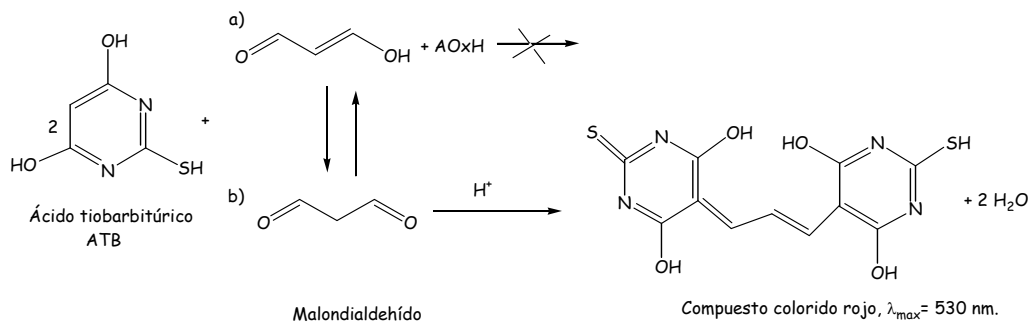


Fig. 7.22 Reacción ATB y malondialdehído para obtener un producto colorido que puede cuantificarse

La cuantificación de este ensayo se basa en el porcentaje del índice de antioxidante (el AI %):

$$AI\% = \left(1 - \frac{A_T}{A_C}\right) * 100$$

Donde A_C es el valor de absorbancia del control totalmente oxidado y A_T es la absorbancia de la muestra.

7.8.2.10. Linoleico

Este método induce artificialmente la oxidación del ácido linoleico (Fig. 7.23) o lipoproteína de baja densidad mediante la adición de Cu (II) o un azo iniciador (generalmente APPH, Fig.7.16). El progreso de la oxidación se sigue a 234 nm (longitud de onda a la cual la absorbancia de los peróxidos de dieno derivados de la oxidación del ac. linoleico es máxima). La reacción se puede llevar a cabo en micelas o en disolventes orgánicos. En el primero de los casos la preparación de la muestra resulta mucho más compleja y además el progreso de la reacción no puede ser seguido directamente a través de un espectrofotómetro ultravioleta [8, 115, 119,124].

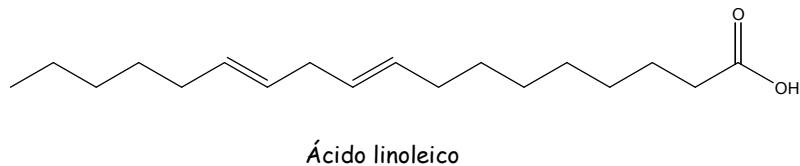


Fig.7.23 Molécula blanco en la determinación de la capacidad antioxidante por ensayo ácido linoleico

La ventaja de este método es el uso del ácido linoleico como sustrato, acerca el ensayo a condiciones biológicas reales. Sin embargo las desventajas que presenta este método es que existen numerosos compuestos orgánicos que absorben a 234 nm (catecol y la hidroquinona reaccionan con radicales peroxilo para dar compuestos (*o*-quinona y *p*-quinona) con absorbancia a esa longitud de onda. En presencia de agua el ácido linoleico forma micelas, que complican el ensayo, ya que la distribución de los compuestos se repartirá en dos fases. El porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica se calcula con la ecuación siguiente:

$$\%inhibición = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) * 100$$

Donde A_0 es la absorbancia del control, en la mayoría de los casos ácido ascórbico y A_1 es la absorbancia de la muestra.

7.8.2.11. Análisis de blanqueamiento de la molécula de caroteno.

Se basa en la capacidad de diversos extractos de disminuir la decoloración oxidativa del β -caroteno (Fig. 7.24) en una emulsión ácida de betacaroteno/linoleico. El ácido linoleico se oxida fácilmente en presencia de agua oxigenada y los radicales generados atacan el betacaroteno provocando su oxidación con la correspondiente pérdida de absorbancia a 470 nm. Este ensayo está indicado para compuestos liposolubles. El patrón utilizado suelen ser ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil cromano-2-carboxílico o ác. Gálico ^[115, 119,124].

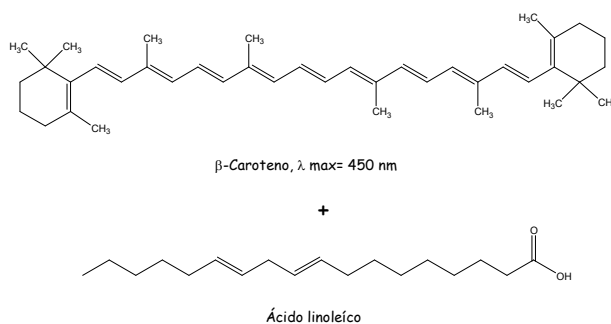


Fig 7.24 Molécula blanco, en la determinación de la capacidad antioxidante por Análisis de blanqueamiento de la molécula de caroteno.

En el sistema modelo de oxidación β -caroteno - ácido linoleico, el radical sin ácido linoleico ($ROO\cdot$) ataca a las moléculas no saturadas del β -caroteno que en ausencia de un antioxidante blanquean rápidamente el color naranja del β -caroteno esto se sigue espectrofotométricamente a 450

nm. En este análisis, la capacidad antioxidante se determina al medir la inhibición de los compuestos orgánicos volátiles y la formación conjugada de hidroperóxido del dieno en la oxidación del ácido linoleico.

El porcentaje de inhibición es calculado ^[148]:

$$\%inhibición = \left[\frac{(A_{A(120)} - A_{C(120)})}{(A_{C(0)} - A_{c(120)})} \right] * 100$$

Donde $A_{A(120)}$ es la absorbancia del antioxidante a $t=120$ min, $A_{C(120)}$ es la absorbancia del control a $t=120$ min y $A_{C(0)}$ es la absorbancia del control a $t= 0$ min.

7.8.2.12. Capacidad de absorción de radicales hidroxilo (HORAC).

El ensayo capacidad de absorción de radicales hidroxilo se basa en la oxidación de la fluoresceína (Fig. 7.16) por radicales hidroxilo, vía mecanismo de transferencia de átomos de hidrogeno. Los radicales libres se generan a partir de peróxido de hidrógeno. Los radicales hidroxilos generados “disminuyen” la fluorescencia de la fluoresceína en cierto tiempo. La función de los antioxidante es bloquear la oxidación de la fluoresceína ocasionada por $\cdot\text{OH}$, una vez que el antioxidante se ha agotado, los radicales (peróxido de hidrógeno) reaccionan con la muestra por lo que “disminuyen” la fluorescencia de la fluoresceína. De este conjunto de reacciones se obtiene una curva, de decaimiento de fluorescencia, el área bajo la curva (ABC), se utiliza para cuantificar la capacidad antioxidante total frente al radical $\cdot\text{OH}$ en una muestra y se compara con una curva estándar obtenida usando varias concentraciones de ác. Gálico. El análisis fluorescente de capacidad de absorción de radicales hidroxilo proporciona una medida directa de la capacidad antioxidante contra radicales $\cdot\text{OH}$ hidrofílicos en la ruptura de la reacción en cadena. Para su cuantificación se sigue un modelo semejante al de capacidad de absorción de radicales oxígeno, la diferencia entre uno y otro es el radical de estudio ^[138, 174, 188].

A continuación se describen los ensayos que siguen un mecanismo de transferencia de electrones.

7.8.2.13. Capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (TEAC).

El análisis de capacidad antioxidante en equivalentes de trolox se basa en la inhibición del radical catiónico ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) Fig. 7.25, provocada por la presencia de una especie antioxidante, esto se observa por la disminución en la absorbancia, monitoreada en las siguientes longitudes de onda 660, 734 y 820 nm. El análisis original ha

presentado la información útil con respecto a las capacidades antioxidantes de compuestos fotoquímicos [12, 55, 184, 186]. La determinación se realiza a una longitud de onda de 734 nm en la cual disminuye la interferencia de otros componentes absorbentes y se reduce la turbiedad. En términos de cuantificación, el valor de la absorbancia es proporcional a la concentración de $ABTS^{\bullet+}$ restante. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil cromano-2-carboxílico, es decir, la concentración de la solución de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil cromano-2-carboxílico (μM) con una capacidad antioxidante equivalente a esa encontrada para 1.0 mM de la sustancia bajo investigación [88, 174].

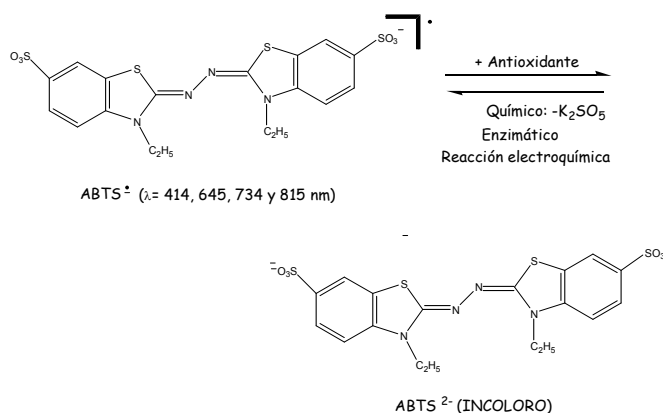
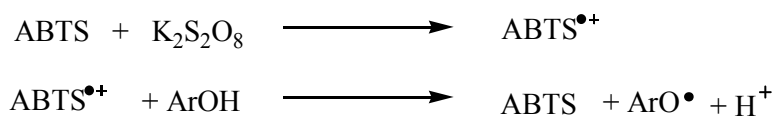


Fig 7.25 Ensayo TEAC se basa en la inhibición del radical catiónico ABTS.

El análisis original de la capacidad antioxidante en equivalentes de trolox, desarrollado por Miller (1993) y otros, se basa en la activación del metamioglobina, actuando como peroxidasa, con peróxido de hidrógeno para generar el radical del ferrilmioglobina que entonces reacciona con ácido 2-2'-azino-bis(3-etilbenztianozolina-6-sulfónico) para formar el $ABTS^{\bullet+}$ catión radical. Este radical no necesariamente es un pro-oxidante por que es absolutamente estable [55, 124]. La muestra a probar se agrega previamente a la formación del $ABTS^{\bullet+}$, los compuestos reducen a los radicales $ABTS^{\bullet+}$ formados y la fase Lag de la curva cinética, que corresponde al tiempo de retardo en la formación radical (esquema competitivo). El catión se genera por la reacción química con dióxido del manganeso o con persulfato de potasio; por reacción enzimática con la peroxidasa del metamioglobina, la peroxidasa del rábano, o bien por generación electroquímica. El $ABTS^{\bullet+}$ el radical es soluble en agua y solventes orgánicos, que permite la determinación de la capacidad antioxidante de muestras hidrofílicas y lipofílicas, además de que este ensayo, a diferencia de otros, puede realizarse sobre una amplia gama de pH's [31, 112].

En este ensayo se analiza la línea recta resultado de trazar la diferencia en la lectura de la absorbancia en función de diferentes concentraciones de antioxidantes. Para cada concentración de antioxidantes el cambio en el porcentaje de la absorbancia del ABTS^{•+} es el mismo, de tal modo que cada 1 μM de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil cromano-2-carboxílico fue visto como un TEAC. Los valores de TEAC para antioxidantes puros no demuestran una clara correlación entre los valores de TEAC y el número de electrones que un antioxidante pueda donar, por ejemplo: el glutatión pueda donar normalmente un electrón (al glutatión oxidado) mientras que los otros son reductores de dos electrones. Debido a su simplicidad operacional, el análisis de TEAC se ha utilizado en muchas investigaciones como herramienta para la estudiar capacidad antioxidante [21, 30, 55].

El orden de adición de reactivo y de muestra es criticada como trampa importante, porque antioxidantes (quercetina, para el caso) puede reaccionar con peróxido de hidrógeno y/o con las especies oxidantes derivadas que inhiben la formación radical del ABTS^{•+} y conllevan a la sobrestimación de la capacidad antioxidante, para evitar la sobre evaluación es recomendable que la muestra a probar se adicione después de la formación de cantidad determinada del catión radical ABTS^{•+}, la concentración restante del radical remanente de la reacción con la muestra antioxidantes es la que se cuantifica. En conclusión, el análisis de la post-adición o la estrategia de la decoloración se propusieron para prevenir la interferencia de compuestos antioxidantes con la formación radical [12,31].

Para expresar la capacidad antioxidante de manera comprensible, se sugiere referenciar con ácido ascórbico en vez de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil cromano-2-carboxílico, los resultados se expresan como masa de ácido ascórbico por 100 g o por 100 mL de la muestra de la prueba, señalado como capacidad antioxidante equivalente de vitamina C.

La capacidad de secuestro de los AOX es calculada de acuerdo a la ecuación [21]:

$$\text{ABTS, \% actividad de secuestro} = [(A_0 - A) / A_0] * 100$$

Donde A_0 es la absorbancia de la reacción control y A es la absorbancia en presencia de la muestra a 60 min de la reacción.

7.8.2.14. Ensayo de captura del radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH).

En este ensayo se emplea un cromóforo púrpura el radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazil, que es reducido en presencia de compuestos antioxidante, a una hidracina de color amarillo claro (Fig 7.26). Es un radical orgánico estable y comercial tiene un máximo de absorción a 515 nm [13, 55, 88, 126].

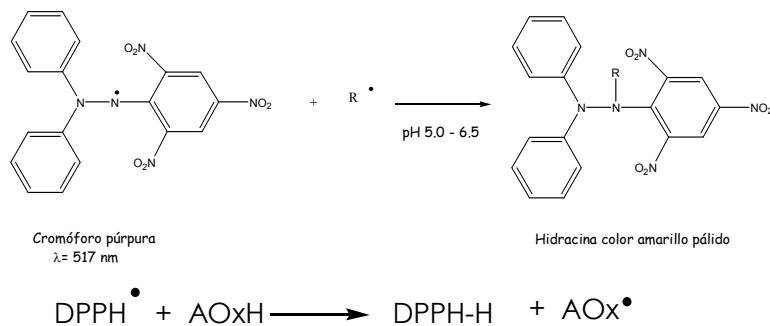


Fig. 7.26 Ensayo 1,1-difenil-2-picril-hidrazil. Se basa en la inhibición del radical DPPH[•] estable.

El mecanismo se basa en una reacción de la transferencia de un electrón (e⁻), mientras que la abstracción del átomo de hidrógeno es un camino de reacción secundario, porque ocurre lentamente en disolventes práticos fuertes como metanol y etanol. Como ocurren en otro análisis basados en la transferencia de electrones, la capacidad de secuestro para el radical DPPH[•] es influenciado fuertemente por el disolvente y el pH de la reacción [13, 191]. El ensayo de DPPH[•], se ha clasificado en los ensayos que siguen un mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno, sin embargo algunos investigadores han argumentado que no es del todo cierto, por lo que proponen que la reacción transcurre por la transferencia de electrones. Ellos encontraron que el paso determinante de la reacción consiste en un proceso rápido en la transferencia de electrones de los aniones de los fenóxidos al DPPH[•]. La abstracción del átomo de hidrógeno del ArOH neutral por DPPH se convierte en una trayectoria secundaria de la reacción, porque ocurre muy lentamente en solventes que aceptan hidrógeno, tales como metanol y etanol.

La capacidad antioxidante se evalúa generalmente en medios orgánicos supervisando la disminución de la absorbancia entre 515-528 nm por 30 min o hasta que se mantenga estable, otra forma de monitorear es por resonancia electrónica de spin [59], recientemente la determinación de la capacidad antioxidante basada en la reducción amperométrica del radical DPPH[•] en un electrodo de carbón vítreo propuesto por Milardovic y colaboradores. La corriente resultante en el electrodo de carbón vítreo se midió a un potencial fijo y es proporcional a la concentración de DPPH[•], después de la reacción con los antioxidantes. Se han desarrollado otros ensayos electroquímicos donde se emplean métodos biamperométricos, en los que se usa el par redox DPPH/DPPH[•] y dos electrodos de disco de carbón vítreos idénticos, en este sistema se observan resultados comparables con los obtenidos con las metodologías anteriores, propuestas para el radical DPPH[•].

De hecho Stasko y colaboradores, estudiaron las condiciones convenientes para análisis en agua y determinar los límites en una mezcla de disolventes de agua-etanol. En los que concluyeron que en una proporción 50 % (v/v) las disoluciones agua/etanol son una opción conveniente para los antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, ya que la reacción entre DPPH[•] y el antioxidante procede

efectivamente. Sin embargo, cuando la proporción de agua cambia a un 60 % (v/v) el DPPH' coagula lo que frena la reacción con los antioxidantes entonces la capacidad antioxidante disminuye.

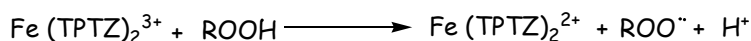
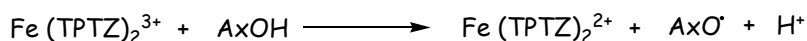
El porcentaje de inhibición del radical DPPH se calcula de acuerdo a la fórmula de Yen and Duh (1994) ^[88, 146]:

$$\%inhibición = \left(\frac{A_{C(0)} - A_{A(t)}}{A_{C(0)}} \right) * 100$$

Donde $A_{C(0)}$ es la absorbancia del control a $t=0$ y $A_{A(t)}$ es la absorbancia del antioxidante a $t=1$ h.

7.8.2.15. Capacidad del plasma para reducir el ion férrico (FRAP).

Este análisis evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo con su capacidad de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . En el ensayo que evalúa la capacidad del plasma para reducir el ion férrico no se hace diferencia entre lo que químicamente se define como reductor y biológicamente como antioxidante, ya que lo emplean en forma indistinta. Se basa en la transferencia de electrones, y en la capacidad reductora de un compuesto en una inhibición indirecta. Este ensayo no implica a un pro-oxidante, pero si a un oxidante, que es la sal de $Fe(III)(TPTZ)_2Cl_3$ (TPTZ) 2,4,6-tripiridyls-triazine) ^[13, 126, 187].



Este ensayo depende de la reducción del complejo tripiridiltriazina $[Fe(TPTZ)_2]^{3+}$ no colorido, a un complejo ferroso $[Fe(TPTZ)_2]^{2+}$ (Fig. 7.27) de color azul intenso por un reductor a pH bajos. En el ensayo de la capacidad del plasma para reducir el ion férrico los valores son calculados midiendo el aumento de la absorbancia en 593 nm y relacionándolos con una disolución estándar de los iones ferrosos o con una disolución estándar del antioxidante (el ácido ascórbico, por ejemplo). La coloración es proporcional a la capacidad reductora de los compuestos de análisis. Una unidad de FRAP se define arbitrariamente como la reducción de 1 mol del complejo tripiridiltriazina $Fe(III)$ al complejo $Fe(II)$ ^[12, 88, 191].

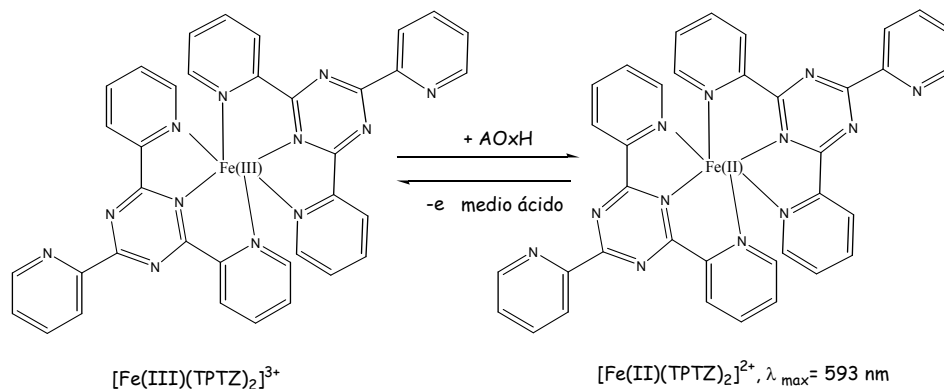


Fig.7.27 Ensayo la capacidad del plasma para reducir el ion férrico se basa en la reducción al complejo ferroso $[Fe(TPTZ)_2]^{2+}$, colorido

Si consideramos que existen compuestos que reducen el peróxido de hidrógeno a $\cdot OH$ y al Fe^{3+} a Fe^{2+} , la capacidad de reducir al Fe^{3+} es el reflejo de lo que ocurre con otras especies reactivas. Si un antioxidante reduce efectivamente a un pro-oxidante, podría no ser capaz de reducir al Fe^{3+} . Algunas limitaciones del ensayo de la capacidad del plasma para reducir el ion férrico en primera instancia es que no mide la capacidad antioxidante de GSH, un importante antioxidante *in vivo*. Otra limitación, es que se trata un compuesto con el potencial redox más bajo que el de los pares $Fe(III)/Fe(II)$, es decir reduce el $Fe(III)$ a $Fe(II)$, contribuyendo en los valores del ensayo FRAP e induciendo falso resultados.

Un punto importante a mencionar es que las especies Fe^{2+} y Fe^{3+} no causan daño oxidativo por sí mismos a lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. Se convierten en especies pro-oxidantes en presencia de peróxido de hidrógeno, vía reacción de Fenton en la que el Fe^{2+} reacciona con el peróxido de hidrógeno para dar como producto, $\cdot OH$. En el caso de los antioxidantes no todos reducen el $Fe(III)$ y son muy pocos los que permiten su medida dentro del tiempo de la observación (aproximadamente 4 minutos). En algunas investigaciones se ha observado que los polifenoles dietéticos reaccionan más lentamente y requieren tiempos de reacción más largos (aprox. 30 minutos) para la cuantificación total y depende de la duración del análisis, esto hace que su reactividad cambie. Los polifenoles con tal comportamiento incluyen ácido cafeico, ácido ferúlico, quercetina, y ácido tánico. A un bajo valor de pH comparado con las condiciones fisiológicas (pH 7.4), la capacidad reductora puede indirectamente reflejar la capacidad antioxidante del compuesto en estudio, aunque los resultados deben ser comparados con los obtenidos por otras técnicas ^[25, 67].

El ensayo de la capacidad del plasma para reducir el ion férrico es un análisis simple, barato y puede ofrecer un indicativo supuesto de la capacidad antioxidante. Si se compara con el ensayo que mide la capacidad antioxidante en equivalentes de trolox no hay mucha diferencia entre ambos, la más notoria es que en el de la capacidad antioxidante en equivalentes de trolox se realiza a pH

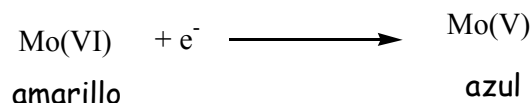
neutral y el análisis de la capacidad del plasma para reducir el ion férrico en condiciones ácidas (pH aprox 3.6). La capacidad antioxidante del plasma se mide como la disposición para reducir el ion férrico presente en el medio FRAP a 37 °C durante 10 minutos se monitorea la absorbancia a 593 nm. El valor de capacidad del plasma para reducir el ion férrico se expresa en $\mu\text{ mol/L}$ y se calcula por la comparación en el cambio de absorbancia de 593 nm de la muestra y el estándar de Fe^{2+} , a $t = 0-4$ min, de acuerdo con la ecuación ^[24, 31, 188]:

$$\text{FRAP} = \frac{0-4 \text{ min } \Delta A_{593\text{nm}} \text{ muestra}}{0-4 \text{ min } \Delta A_{593\text{nm}} \text{ estándar}} * [\text{Fe}^{2+}] \text{ estándar } (\mu \text{ mol /L})$$

7.8.2.16. Folin-Ciocalteu capacidad reductora y contenido fenólico (FC).

El método que se utiliza actualmente es una modificación efectuada por Singleton y Rossi (1965) de un método empleado para la determinación de tirosina, el cual se basaba en la oxidación de los fenoles por un reactivo de molibdeno y wolframio (tungsteno). La mejora introducida por Singleton y Rossi, fué el uso de un hetero poli anión fosfórico de molibdeno y tungsteno que oxida los fenoles con mayor especificidad, $(3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O})$ y $(3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-14\text{WO}_3-4\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O})$. La oxidación de los fenoles, presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría con base en una recta patrón de ácido gálico ^[88, 106].

La naturaleza química exacta del reactivo del Folin-Ciocalteu no se sabe, sino que se acepta que contiene los complejos de fosfomolibdato y fosfotungstato en una mezcla ácida. La química detrás del reactivo Folin-Ciocalteu se confía en la transferencia de electrones en un entorno alcalino de los compuestos fenólicos y de la reducción de la especie de molibdeno, formando los complejos azules que pueden detectarse espectrofotométrico en 750-765 nm. La ventaja del método de Folin-Ciocalteu está relacionada con la aparición de una absorbancia que es consecuencia de la reacción y no a una disminución de la absorbancia como ocurre con otras pruebas. Otra de las ventajas es que esta prueba no requiere de una estandarización de las condiciones del análisis ^[12, 88].



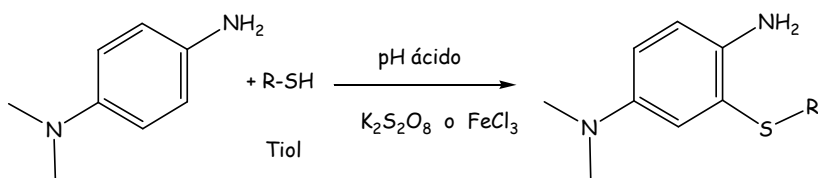
El análisis Folin-Ciocalteu ganó renombre y se conoce comúnmente como el análisis total de los fenoles (o fenólico). El Folin-Ciocalteu mide realmente la capacidad de reducción de una muestra, se trata de un parámetro que generalmente muestra una estrecha correlación con los diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante. Numerosas publicaciones aplicaron el análisis total de los fenoles por Folin-Ciocalteu y un análisis de la capacidad antioxidante por transferencia de

electrones (e.g., FRAP, TEAC, etc.) y existe una correlación lineal excelente entre los “perfiles fenólicos totales” y “la actividad antioxidante”. Este ensayo inicialmente se pensó para el análisis de las proteínas, ya que aprovecha la actividad del reactivo con los residuos de tirosina de la proteína, el cual contiene un grupo fenol. Más tarde se amplió este ensayo al análisis de fenoles totales en vinos, es así como el ensayo encuentra otros usos en la investigación^[204]. La disociación del protón fenólico lleva a un anión del fenolato a reducir al reactivo de Folin-Ciocalteu. Existen además diversas sustancias de naturaleza no fenólica que interfieren en las determinaciones y que pueden dar lugar a concentraciones de compuestos fenólicos aparentemente elevadas, por lo que deben hacerse correcciones para estas sustancias. Entre ellas destacan las proteínas, el ácido ascórbico, el ácido úrico, algunos aminoácidos y nucleótidos, azúcares y algunas sales inorgánicas (e.g. Cu (I), Fe (II), etc.). Entonces el reactivo de Folin-Ciocalteu no es específico para los compuestos fenólicos, porque puede ser reducido por muchos compuestos no-fenólicos y por esa razón no es conveniente para la determinación del “contenido total de fenoles”. Sin embargo, el análisis Folin-Ciocalteu se ha propuesto para la medida de la capacidad de reducción total de muestras, se utiliza como patrón el ácido gálico y los resultados se expresan como equivalentes de dicho ácido. Los complejos azules formados son independientes de la estructura de compuestos fenólicos, por lo tanto se elimina la posibilidad de la coordinación de estos compuestos formados entre el metal y el polifenol^[53]. La utilidad del Folin-Ciocalteu reduce las complicaciones de la medida de la capacidad antioxidante de las muestras en alimentos, ya que el análisis es operacionalmente simple, reproductivo y conveniente para el análisis de la capacidad antioxidante en alimentos, puesto que el reactivo está disponible en el comercio, se puede estandarizar y la absorción del producto en una longitud de onda reduce al mínimo las interferencias de la matriz de la muestra. Una de las desventajas del análisis, es que se realiza en fase acuosa, así que no es aplicable para los compuestos o matrices lipofílicos en estos casos el ensayo Folin-Ciocalteu es modificado. La cuantificación de la capacidad antioxidante es calculada a partir de una curva de calibración del estándar ácido gálico, se obtiene una ecuación del tipo $y = b + mx$, donde y = absorbancia y x = concentración de fenoles, esta última relacionada con la capacidad antioxidante de la muestra.

El ensayo de Folin-Ciocalteu también se ha empleado en estudios *in vivo* para la determinación de los niveles de compuestos fenólicos totales en plasma/suero tras la ingesta de vino y zumos de frutas ricos en compuestos fenólicos. Para su aplicación a plasma o suero se requiere una serie de pasos de extracción e hidrólisis que comprenden el tratamiento con HCl y NaOH en metanol. Para evitar interferencias con las proteínas, estas se precipitan con ácido metafosfórico y posteriormente se realiza una extracción de los compuestos fenólicos ligados a las proteínas plasmáticas con una mezcla de acetona y agua.

7.8.2.17. Ensayo de la captura del radical N,N-dimetil-*p*-fenilenediamina (DMPD) ^[12,13,31]

Este método se basa en la reducción del radical DMPD (N,N-dimetil-*p*-fenilenediamina) a pH ácidos por los antioxidantes de la muestra. La generación de este radical requiere un pH adecuado de ≈ 5.25 y la adición de una disolución de cloruro férrico (Fig. 7.28). La absorbancia del radical se determina a 505 nm y los compuestos antioxidantes una vez adicionados, son capaces de transferir un átomo de hidrógeno provocando su decoloración (proporcional a su concentración) ^[53, 103, 107].



N,N-dimetil-*p*-fenilenediamina,
color púrpura $\lambda_{\text{max}} = 517 \text{ nm}$.

Fig 7.28 Ensayo DMPD se basa en la inhibición del radical catiónico N,N-dimetil-*p*-fenilenediamina.

Un método de decoloración mejorada para medir la actividad antioxidante de muestras de alimentos con el N, N-dimetil-*p*-fenilenediamina (DMPD) se desarrolla por la formación del radical DMPD^{•+}, que se genera a partir de la reacción entre el N,N-dimetil-*p*-fenilenediamina y persulfato de potasio, se reduce en presencia de un antioxidante donador de hidrógeno. Este ensayo tiene una clara ventaja que puede ser empleado en la determinación de la capacidad antioxidante de sustancias hidrofílicas y lipofílicas. El procedimiento experimental es rápido, barato y asegura la sensibilidad junto a la reproducibilidad en la medición de la capacidad antioxidante de los compuestos hidrofílicos y lipofílicos y, por tanto tiene un aspecto prometedor de la detección del gran número de muestras de antioxidantes naturales. La eficacia de la prueba de decoloración N,N-dimetil-*p*-fenilenediamina se comprobó mediante la evaluación de la capacidad antioxidante de muestras de diferentes frutas. La inhibición de la absorbancia en 517.4 nm es lineal entre 0.3 a 13 mM de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil cromano-2-carboxílico ^[18]. La ecuación de la recta:

$$A_{517} (\text{inhibición}) = m (\mu\text{M de Trolox}) + b$$

La medida de la capacidad antioxidante de una gama de muestras hidrofílicas y lipofílicas calculando la inhibición del porcentaje del catión radical de DMPD^{•+} a una longitud de onda de 517.4 nm en la adición de muestras antioxidantes. Los resultados demuestran que la reacción de antioxidantes con DMPD^{•+} se termina a los 100 s. La curva estándar se obtiene al trazar el % de inhibición en función de las concentraciones de antioxidantes.

7.8.2.18. Medición de la capacidad antioxidante por reducción del ión cobre (II)
(CUPRAC) [9, 10, 16, 164].

La medición de la capacidad antioxidante por reducción del ión cobre (II), CUPRAC, es resultado de la combinación de dos métodos en los que se determina la capacidad antioxidante de un sistema biológico que sigue un mecanismo de transferencia de un solo electrón. Se basa en la reducción del Cu (II) a Cu (I) y se ha considerado uno de los mejores ensayos; la detección del ión Cu (I), se mide por la formación de un complejo de Cu (I) bis(neocuproina) o (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina); tal complejo introduce un espectro de absorción típico con máximo en una longitud de onda de 480-490 nm (Fig. 7.29).

A partir de una curva patrón del ensayo de medición de la capacidad antioxidante por reducción del ión cobre (II) se calcula el coeficiente de absorptividad molar ϵ , con este ensayo se estudian mezclas complejas (infusiones herbales), hay que considerar al inicio del análisis una masa (m) determinada, un volumen inicial (V_{cup}) y las diluciones que se realizan (r) en el volumen de la muestra (V_s), el desarrollo del color (después de que adición de reactivo), se da en un volumen final (V_f) donde se mide la absorbancia (A_f), la capacidad antioxidante en equivalentes de trolox de una mezcla compleja (materia seca del mmol TR/g) se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$CAOxH = \left(\frac{A_f}{\epsilon_{TR}} \right) * \left(\frac{V_f}{V_s} \right) * r \left(\frac{V_{cup}}{m} \right)$$

La medición de la capacidad antioxidante por reducción del ión cobre (II) ha demostrado ser un ensayo libre de las desviaciones químicas propias de la ley de Beer en soluciones sintéticas y verdaderas. La capacidad antioxidante total de una mezcla antioxidante sintética es la suma de las capacidades de los componentes individuales de la mezcla, lo que ha conducido a la conclusión de que existe un paralelismo entre las curvas lineales para cada antioxidante en la solución acuosa pura y en mezclas complejas reales como los zumos de fruta y los tés herbarios.

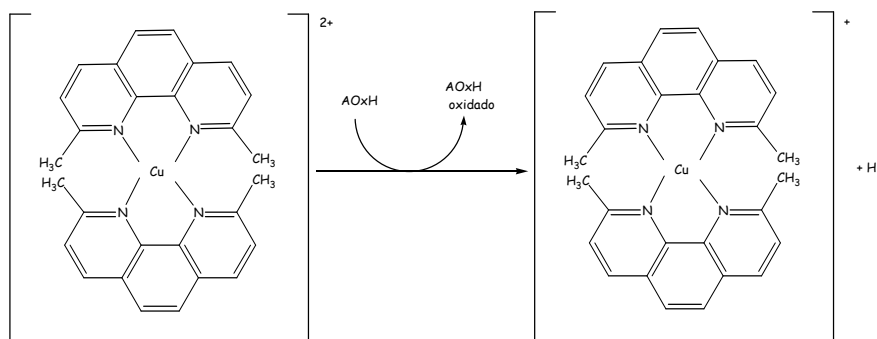


Fig 7.29 Ensayo de la capacidad antioxidante por reducción del ión cobre (II), se basa en la reducción del complejo bis (neocuproina) cobre (II).

7.8.2.19. Resonancia paramagnética electrónica (RPE) ^[56, 241].

Es un ensayo altamente específico y sensible para la detección de especies paramagnéticas. Debido a que el electrón no apareado en el orbital de valencia, los radicales libres son especies paramagnéticas y están en cantidad suficiente, son detectables y cuantificables mediante espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica ^[59, 140]. Sin embargo, muchas especies de radicales libres son muy reactivas, con vida media relativamente corta, y las concentraciones encontradas en los sistemas bioquímicos suelen ser insuficientes para la detección directa mediante espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica. La trampa de espin es una reacción química que proporciona un enfoque para ayudar a superar este problema. Los compuesto que sirven como trampa de spin reaccionan covalentemente con los radicales libres de forma relativamente estable, los aductos son de spin persistente, que poseen espectros de resonancia paramagnética detectable por espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica. Cuando una trampa de espin, por ejemplo: el fenil-N-*tert*-butil nitrona (PBN), se agrega a una reacción bioquímica que genera radicales libres, un grupo creciente de aductos de la trampa de espin de vida media relativamente larga reaccionan con los radicales libres, en este momento son detectables por espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica en espectros generados por la reacción. Cuando la intensidad de la señal de acumulación de aductos alcanza el límite inferior de sensibilidad del espectrómetro, es común que se utilice espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica combinado con técnicas de “spin trap”, proporcionan un conducto sensible para la evaluación y caracterización de la producción de radicales libres. Prueba directa, fácil y evidente de la producción de radicales libres *in vitro* en sistemas biológicos complejos. La intensidad relativa de la formación de radicales libres se puede determinar porque la señal de la espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica se relaciona directamente con la concentración del aductos de spin y la altura de los picos en los espectros son proporcionales al número de moléculas aducto radical en la celda de acumulación ^[56, 140, 250].

La capacidad para detectar y registrar de forma fiable estas señales en un entorno experimental controlado permite establecer el inicio y la duración de la producción de radicales libres mediante la adición de la trampa de espin, en un sistema de toma de muestras determinado y el tiempo de los puntos secuenciales ^[140]. Es importante destacar, que la capacidad de estos parámetros permite la expresión de la intensidad de la generación de radicales libres, como una función del tiempo y el establecimiento de un perfil temporal de la producción de radicales libres en respuesta, *in vitro* e *in vivo*, de las condiciones experimentales de interés. Por ejemplo, para determinar el inicio y la duración aproximada en la formación de radicales libres en tejidos específicos de animales experimentales tras la administración de un agente que induce la producción de radicales libres, la “spin trap” se administra a grupos de animales, después de aplicar el agente que en el metabolismo se sospecha participa en la formación de radicales libres intermedios, los tejidos de interés son extraídos y preparados para el análisis espectral. Esta estrategia experimental

proporciona la oportunidad de identificar los lugares de destino (es decir, pulmón, hígado, intestino), del agente de inducción y para diferenciar la intensidad, el inicio y la duración de la generación de radicales libres para cada tejido. El mismo procedimiento experimental se puede aplicar para evaluar el inicio y duración de la actividad de los radicales libres en estudios *in Vitro*, utilizando preparaciones celulares y subcelulares. Además, la espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica combinada con otras técnicas de trampa de espin, no sólo se emplean para generar información sobre la formación de radicales libres en un sistema biológico, sino también, conocer el inicio y duración de radicales libres en lugares concretos ^[241].

La espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica proporciona una poderosa herramienta para elucidar la regulación de los mecanismos de la generación de determinadas especies de radicales libres e investigar las interacciones bioquímicas de los radicales libres a nivel celular y subcelular, y para evaluar el papel de los radicales libres como mediadores importantes en una miríada de procesos de la enfermedad ^[59].

7.8.3. Métodos electroquímicos: Voltamperometría cíclica, herramienta para la evaluación de la capacidad reductora de compuestos químicos.

Las características electroquímicas de compuestos puros, de alimentos y de muestras biológicas son empleados por su capacidad de reducción asociada a sus propiedades antioxidantes, puesto que el potencial de la oxidación se relaciona conceptualmente con la capacidad antioxidante, es decir, el potencial de la oxidación y la capacidad antioxidante se relacionan de manera inversa, de modo que cuando el potencial de la oxidación es bajo, signifique que los analitos se podrían oxidar fácilmente o bien tienen una mayor capacidad antioxidante ^[38,45].

Entre los métodos electroquímicos, la técnica voltamperometría cíclica (VC) se ha adaptado a la evaluación de la capacidad de reducción total de antioxidantes de bajo peso molecular en el plasma, homogenizado del tejido y extractos de plantas. Típicamente, la capacidad de reducción del compuesto o muestra de prueba se miden a través de un sistema trielectrónico, constituido por el electrodo de trabajo (carbón vítreo), el electrodo de referencia (Ag/AgCl) y el electrodo auxiliar (alambre de platino). Después de la introducción de la muestra se aplica una diferencia de potencial lineal al electrodo de trabajo, a una velocidad constante de aproximadamente 100 mVs^{-1} , hacia el potencial positivo que permite la evaluación de equivalentes de reducción o hacia el potencial negativo se evalúa a las especies oxidadas. La corriente resultante en función del potencial se registra para producir un voltamperograma cíclico. Los trazos de voltamperometría cíclica se registran generalmente de 500 a 150 mV contra el electrodo de referencia a un índice de exploración de 100 o 400 mV. La capacidad reductora de una muestra está compuesta por dos parámetros: el potencial de pico [$E_{p(a)}$] y la corriente anódica (I_a). El potencial de pico es una medida en el medio del aumento de

la corriente en cada onda anódica y se refiere al $E_{1/2}$ como la capacidad de cada compuesto para donar electrones al electrodo de trabajo. La corriente anódica se mide en el eje y de cada oscilación anódica y se relaciona con la concentración total de los reductores. Sin embargo, como una onda anódica en matrices complejas, tales como muestras biológicas y de alimentos, representa a menudo más de un componente, que podría donar electrones alrededor del mismo potencial, fue propuesto el parámetro de área bajo la curva (S), los cambios en este valor de área reflejan mejor el cambio en un solo componente de la muestra dentro de la onda anódica, que el cambio reflejado en la corriente anódica, I_a , es por ello que se utiliza para valoración de la capacidad de reducción total^[54, 83, 184, 244].

La metodología de la voltamperometría cíclica permite la investigación rápida del perfil electroquímico de muestras y es especialmente conveniente para los estudios de la investigación. Además, el perfil de voltamperometría cíclica se puede obtener en medio acuoso, en solventes orgánicos como el acetonitrilo y las mezclas acetonitrilo/metanol, agua/acetonitrilo a condición de que hay componentes redox activos y bastantes electrólito en la disolución para apoyar las reacciones redox en el electrodo.

Estos análisis, basados en las características electroquímicas del compuesto muestra, no necesitan el uso de compuestos pro oxidante, puesto que se basan en comportamiento electroquímico y por lo tanto en sus características fisicoquímicas. La desventaja de estas metodologías se relacionan con el hecho de algunos antioxidantes biológico relevantes (e.g. el glutatión, la cisteína y los compuestos que contiene un grupo tiol-), tienen una respuesta baja cuando los electrodos de carbón vítreo son usados. En este caso, otro tipo de electrodos como el de Au/Hg son necesarios para la medida del glutatión. La limitación práctica es que el electrodo de trabajo tiene que ser limpiado con frecuencia para quitar los residuos de muestra de su superficie y mantener su sensibilidad^[37,40, 41, 42, 63,109].

8. TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

Existen diferentes ensayos que permiten estudiar la capacidad antioxidante de una sustancia, la mayoría está enfocada a determinaciones indirectas basadas en el uso de técnicas espectrofotométricas para dichas mediciones, por ejemplo capacidad del plasma para reducir el ion férrico, capacidad antioxidante en equivalentes de trolox, Parámetro de análisis de la intercepción total del radical peroxilo, capacidad total de barrido del radical oxígeno, ensayo de blanqueamiento de Crocin, Capacidad de absorción de radicales oxígeno ^[141,148, 183, 229], recientemente se ha incrementado el uso de técnicas electroquímicas, donde la capacidad antioxidante se mide de manera directa, es decir, recientes estudios emplean la voltamperometría cíclica para determinar la capacidad antioxidante de diferentes compuestos de bajo peso molecular ^[71, 116, 138, 141]. En primera instancia se hablará de la electroquímica como rama de la química, de reacciones electroquímicas, un sistema electroquímico, para finalizar con voltamperometría cíclica como técnica electroquímica de interés en nuestro estudio.

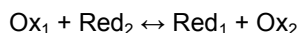
8.1. Electroquímica

La unión de la termodinámica y la cinética química fue decisiva en la génesis de la electroquímica como rama definida de la química, gracias a tres figuras relevantes, Arrhenius, Van't Hoff y Ostwald, con las que la electroquímica prosperó a lo largo de la historia de la ciencia, cuyo proceso evolutivo incluye desde el desarrollo de la química de las celdas de manera clásica hasta llegar a la electroquímica cuántica que indica que el transporte de electrones se produce por efecto de un túnel mecánico cuántico. Hoy en día se conoce a la **electroquímica** como una parte de la química que trata la relación entre las corrientes eléctricas y las reacciones químicas, así como la conversión de la energía química en eléctrica y viceversa. En un sentido más amplio, como el estudio de las reacciones químicas que producen efectos eléctricos y de los fenómenos químicos causados por la acción de las corrientes o potenciales ^[180].

8.1.1. Reacciones oxido reducción.

Una reacción electroquímica es una conversión química de una sustancia en la interfase electrodo/disolución al paso de la corriente eléctrica, fenómeno conocido como electrolisis. Esta transformación ocurre por la pérdida o ganancia de electrones o bien en términos electroquímicos en una reducción u oxidación (redox), con un electrodo como

intermediario que funciona como soporte de electrones y una disolución electrolítica que permite el transporte de las sustancias que se van a electrolizar desde la disolución hasta los electrodos. La disolución se comporta en la electrolisis como un conductor iónico y el electrodo como un conductor electrónico ^[36, 47].



8.1.2. Transferencia de carga en una reacción electroquímica.

Una reacción electroquímica consta de tres etapas fundamentales: a) difusión de la especie a electrolizar desde la disolución hacia el electrodo; b) transferencia de carga (electrones) entre dicha especie y el electrodo; c) difusión del producto de la reacción desde el electrodo hacia la disolución. La materia se puede acercar al electrodo de tres formas: migración, difusión y convección, descritas a continuación (Fig 8.1).

En un régimen estacionario, es decir, cuando la velocidad de transporte de sustancias a la superficie del electrodo alcanza un valor constante e igual a la velocidad de electrolisis. Se establece la hipótesis de que existe una capa de la disolución en las cercanías del electrodo de espesor constante. Las especies electroactivas llegan del seno de la disolución a esta capa por convección y de la capa a la superficie del electrodo por difusión ^[36,47,108,180].

El estado estacionario implica que la distribución de concentraciones no varía con el tiempo, lo cual implica que el consumo de especie electroactiva es nulo.

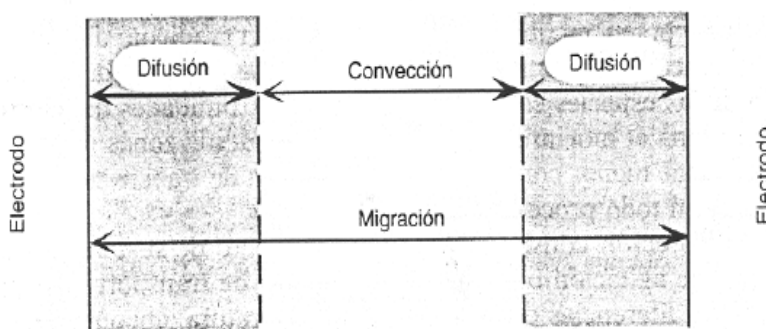


Fig 8.1 La materia se puede acercar al electrodo de tres formas: migración, difusión y convección.

8.1.2.1. Transporte de materia por migración [36,47, 108, 180]

En las cercanías del electrodo, la especie electroactiva es transportada por difusión y por migración (Fig 8.2), de manera que la corriente total (i) será igual a la suma de la intensidad de corriente de difusión y de migración, $i_{dif} + i_{mig}$. Dependiendo de la dirección del campo eléctrico y de la carga de la especie, i_{dif} e i_{mig} . Pueden tener el mismo sentido o sentidos opuestos.

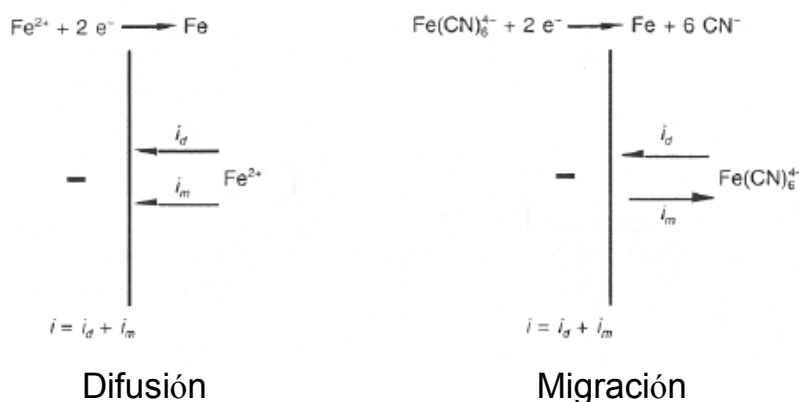


Fig 8.2 La especie electroactiva es transportada por difusión y por migración

La intensidad de corriente de migración cumple con la ecuación:

$$i_m = +/-(n/zA)ti$$

En donde i es la intensidad total, n el número de electrones que interviene en la reacción de electrolisis del ion, Z es la carga del ion y t es su "número de transporte".

La migración es una forma de transporte de materia indeseable en electroanálisis, por lo que se busca que la i_{mig} sea lo más pequeña posible. Esto se consigue añadiendo un exceso (unas 100 veces) de un **electrolito soporte**, constituido por especies iónicas no electroactivas. En estas condiciones, el número de transporte de la especie electroactiva es pequeño. Este electrolito soporte, además, disminuye la resistencia de la celda electroquímica, aumentando la conductividad.

8.1.2.2. Transporte de materia por difusión ^[36,47, 108, 180].

Se considerará un electrodo de área fija sumergido en una disolución carente de perturbaciones (no hay fenómenos de convección) y con un electrolito soporte (no hay fenómenos de migración). Al aplicar una diferencia de potencial la concentración de especie electroactiva sobre la superficie del electrodo se hace cero. Existe un gradiente de concentración en una capa de disolución estrecha. A medida que pasa el tiempo, el espesor de la capa se hace mayor, mientras que el gradiente de concentración se hace menos pronunciado. Se observa, además, que la intensidad disminuye con el tiempo (Fig. 8.3).

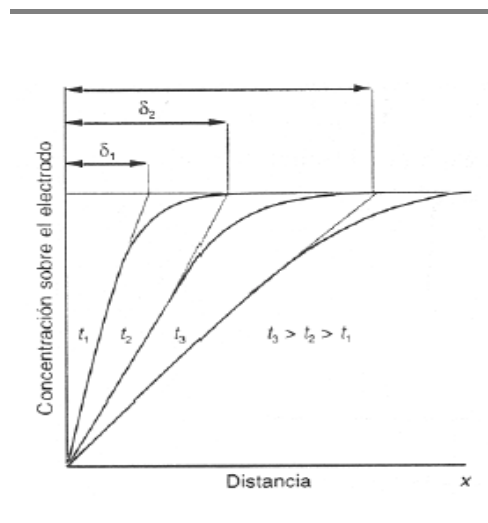


Fig 8.3 Existe un gradiente de concentración, a medida que pasa el tiempo se hace menos pronunciado.

8.1.2.3. Transporte de materia por convección ^[36,47, 108, 180].

El transporte de materia por convección se debe al movimiento global del líquido. La convección puede ser natural, en donde la fuerza motriz son los gradientes de densidad o forzada, cuyo movimiento es causado por un agente externo, generalmente un medio mecánico.

Para comprender la transferencia de carga en una celda electroquímica se basa en la teoría del potencial aplicado, en donde se propone que el producto se forma por medio de un estado intermedio y que la velocidad de descomposición determina la velocidad de la reacción. Cuando la transferencia de carga predomina en la reacción, su velocidad depende principalmente de la corriente de intercambio y el sobrepotencial; este comportamiento está regido por la ecuación de Butler-Volmer:

$$i = i^{\circ} \left\{ \exp \left[(1 - \alpha) \frac{nF}{RT} \eta_{ACT} \right] - \exp \left[-\alpha \frac{nF}{RT} \eta_{ACT} \right] \right\}$$

En esta ecuación se representa la contribución de cada densidad de corriente parcial (anódica y catódica) a la densidad de corriente total. En la ecuación, i° es la densidad de corriente de intercambio y se define como la cantidad de corriente que fluye entre el electrodo y el electrolito. Si una celda posee un valor de i° alto, es necesario hacer pasar una mayor cantidad de electricidad para polarizar el electrodo. La cinética está influenciada por la diferencia de potencial interfacial que es la "fuerza impulsora" de la reacción, $\eta_{ACT} = E - E_{eq}$.

8.2. Celda Electroquímica ^[17, 36,47, 108, 180, 181, 239, 24]

Las reacciones electroquímicas se llevan a cabo en montajes especiales que consisten en celda electrolítica, electrodos, generador de energía eléctrica, conductores y aparatos de control o medida, el electrólito soporte y las sustancias que se van a electrolizar, todo esto constituye un circuito completo (Fig. 8.4).

Una celda electroquímica puede ser una simple disolución acuosa o una mezcla compleja de sales en disolución, pasta o sólido, o bien de forma más sencilla una celda electroquímica, consiste en mínimo dos electrodos y un electrolito soporte, en otras palabras, una celda electroquímica común consiste en varios componentes que influirán en las observaciones, estos componentes son el disolvente, electrolito soporte, buffer, así como el sistema de electrodos.

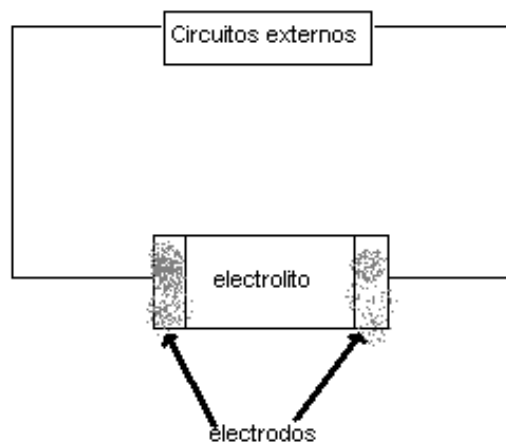


Fig 8.4 Celda Electroquímica: el electrodo representa el conductor electrónico y el electrolito soporte es el conductor iónico.

Componentes principales de la celda electroquímica:

8.2.3. Electrodo ^[17,36,47, 108, 180, 181, 239, 246]

El electrodo es la interfase donde se lleva a cabo la transferencia de carga entre el movimiento de electrones y el movimiento de iones y el electrolito soporte es el medio en el cual la transferencia de carga tiene lugar a consecuencia del movimiento de iones.

Los **electrodos** están conectados entre sí externamente, de forma que el sistema cuenta con un cátodo y un ánodo:

- ❖ **Cátodo:** electrodo en el que se llevan a cabo las reducciones.
- ❖ **Ánodo:** electrodo en el que se llevan a cabo las oxidaciones.

Los electrodos pueden ser inatacables (inertes) o atacables (sufren transformaciones durante el proceso redox).

8.2.3.1. Tipos de Electrodos.

Los métodos electroanalíticos se basan en las curvas intensidad-potencial ($I-E$), que se obtienen midiendo la dependencia de la intensidad de corriente eléctrica que circula a través de la celda electroquímica, en función de la diferencia de potencial medida entre los electrodos. Si no hubiera efectos de sobrepotencial, debería obtenerse una relación lineal entre intensidad y potencial, No obstante, se encuentran con frecuencia desviaciones de este comportamiento lineal, lo cual es debido al efecto de la polarización, que puede ocurrir en ambos electrodos o sólo en uno de ellos. La polarización en uno sólo de los electrodos se puede estudiar acoplado éste a un electrodo que no sea fácilmente polarizable. Desde el punto de vista de este efecto de polarización, se puede distinguir entre dos tipos de electrodos: el electrodo idealmente polarizable y electrodo idealmente no polarizable.

Electrodo idealmente polarizable (EIP). En este tipo de electrodos no hay transferencia de carga a través de la interfase independientemente del potencial aplicado, es decir, la intensidad de corriente permanece constante e independiente del potencial en un intervalo considerable (Fig 8.5. EIP). Como no existe transferencia de carga, un EIP se comporta como un condensador.

Electrodo idealmente no polarizable (EINP). Aquel cuyo potencial no cambia, independientemente de la intensidad que fluye, es decir, una pequeña variación en el potencial del electrodo produce una gran variación en la intensidad de corriente eléctrica que circula a través de él. (Fig. 8.5. EINP).

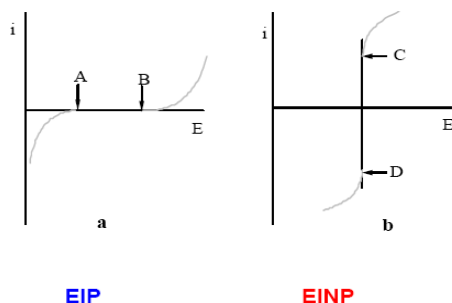


Fig 8.5 Tipos de electrodos: "electrodo idealmente polarizable" (EIP) y "electrodo idealmente no polarizable" (EINP)

Los electrodos de acuerdo con la función que realizan dentro de la celda, se dividen en: electrodo de referencia cuyo potencial es constante, cualquiera que sea la composición de la disolución, electrodos indicadores, el valor de potencial alcanzado proporciona información sobre la concentración o naturaleza de las sustancias susceptibles de cambiar electrones, y su misión es servir como vehículo para el intercambio de electrones y electrodo auxiliar, su función es disminuir la caída óhmica.

El circuito más sencillo para medidas electroquímicas tiene dos electrodos. Cuando a través de la celda pasa una corriente eléctrica, la diferencia de potencial entre los electrodos (ánodo y cátodo) es:

$$V = EA - EC + iR$$

iR se denomina caída óhmica y suele despreciarse, aunque en ocasiones alcanza valores apreciables.

Para corregir la caída óhmica, se realiza un montaje con tres electrodos. En este caso, la diferencia de potencial entre el electrodo indicador y el electrodo referencia se mide con un voltímetro de gran impedancia, por lo que la i que circula entre el electrodo indicador y el electrodo de referencia es 0. En mediciones electro analíticas se emplean celdas con un sistema de tres electrodos, debido a que existen mediciones en las que no hay equilibrio, esto sucede cuando la corriente se extrae de la celda.

En un sistema de tres electrodos, éstos son físicamente diferentes pero se conservan en las mediciones al equilibrio más que si se empleara un sistema de sólo dos electrodos.

8.2.3.2. Sistema de tres electrodos.

El primero de los tres electrodos con una función asociada es el electrodo indicador, también conocido como electrodo de trabajo, aquí se lleva a cabo el fenómeno electroquímico de interés y por lo tanto es aquí donde se realizan las mediciones electroquímicas (Fig. 8.6). Este electrodo podría o no, estar constituido de material inerte. El segundo electrodo en el sistema es el electrodo de referencia, conocido también como electrodo no polarizado o bien electrodo no polarizable. Este electrodo es de potencial constante, por lo que puede ser tomado como una referencia estándar comparado con el potencial de los otros electrodos dentro de la celda. Por constante se podría comprender que el cambio de potencial respecto a la carga, tiempo u otras variables no son necesariamente cero, sin embargo son lo suficientemente pequeñas que las mediciones no se ven afectadas. Este tipo de electrodos normalmente no son construidos de material inerte. Dentro de la celda, existe un tercer electrodo llamado contra electrodo o electrodo auxiliar. Este es el electrodo que sirve como filtro de electrones tanto que la corriente puede pasar a través de la celda. En general, ni la intensidad de corriente ni el potencial son medidos o conocidos. Está construido de material inerte.

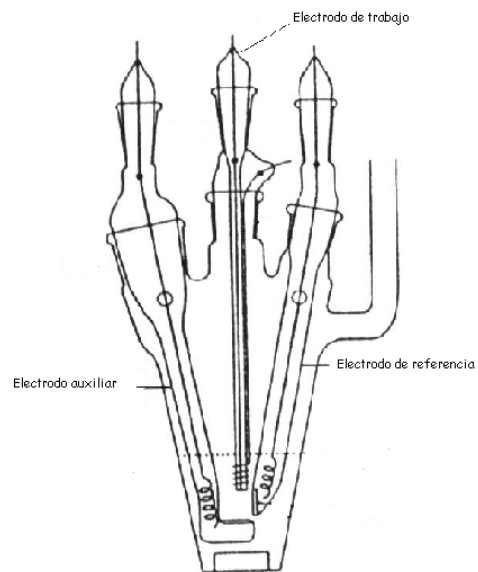


Fig. 8.6 Sistema de tres electrodos: trabajo, referencia y auxiliar

8.2.3.3. Ventajas y desventajas de un sistema de tres electrodos.

La ventaja que presenta un sistema de tres electrodos, es la gran conveniencia que representa la instrumentación en celdas geométricas o celdas externas. La desventaja de dicho sistema radica en que las funciones de los electrodos de referencia y el contra electrodo son básicamente incompatibles, en el potencial en el que el electrodo de referencia es estable resultando un efecto adverso, por lo que el paso de la corriente requiere de un contra electrodo. Sólo si la magnitud de la intensidad de corriente en la celda es conocida y pequeña, este efecto adverso, conocido como polarización del electrodo de referencia es insignificante.

8.2.4. Disolvente ^[17, 36,47, 108, 180, 181, 239, 246].

El principal disolvente es el agua, sin embargo en las reacciones electroquímicas se presentan algunas ventajas y desventajas, debidas a la facilidad del agua para inter convertirse en diferentes especies por sus características electroquímicas.

La mayoría de los trabajos electroquímicos utiliza como disolvente agua, debido a que su naturaleza y alta pureza, permiten hacer mediciones comparables. El agua tiene algunas desventajas: La primera es que algunos compuestos orgánicos de cadenas largas son totalmente insolubles o bien parcialmente solubles en agua. Una segunda desventaja del agua en sistemas electroquímicos es que contamos con un disolvente prótico, por lo que en la celda estará presente el ión H^+ , consecuentemente la transformación electroquímica se verá afectada por el pH en el que se encuentre. En una reducción orgánica, en la cual están involucrados H^+ , la reacción puede darse de forma diferente a cuando el disolvente es aprótico. Ante las desventajas que presenta el agua como disolvente en las reacciones electroquímicas se emplean mezclas de disolventes, en especial para aumentar la solubilidad de los compuestos orgánicos. Por ejemplo, en el caso de tener un compuesto poco soluble en agua, es posible emplear una mezcla de disolventes, en la cual los dos líquidos deben ser miscibles, en su mayoría dichas mezclas son compuestos orgánicos y agua. Los compuestos orgánicos utilizados son dioxano, metanol, etanol, la proporción en la que se encuentren en la mezcla dependerá de la solubilidad requerida para el compuesto a estudiar.

En un medio en la cual se han mezclado dos disolventes, se presentan algunas desventajas en cuanto al estudio electroquímico. La elección de un electrodo de referencia adecuado depende de cada medio, un segundo caso es considerar la naturaleza del agua, es decir, el agua es un disolvente prótico por lo que la mezcla de disolventes dependerá del pH, que debe ser controlado con una disolución amortiguadora, consecuentemente se debe adecuar la escala de pH. Los disolventes más utilizados son 0.1 M KCl, LiCl, NH_4Cl o

$(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$, estos medios no son tamponados, los sistemas reguladores utilizados son 0.5 M ácido acético, 0.5 M de acetato de sodio, otros son medios de citrato, malonato o fosfatos, que tienen la desventaja de formación de complejos con algunos iones metálicos. Ante las desventajas que representa trabajar con una mezcla de disolventes, se puede recurrir a un disolvente prótico no acuoso, por ejemplo los alcoholes, ácidos orgánicos e inorgánicos; los más comunes son metanol, etanol, ácido acético glacial, amoniaco y algunas aminas. El uso de disolventes próticos no acuosos presentan como impedimento, que cada disolvente tendrá una escala diferente de pH o escala de E, en el caso de disolventes no-próticos, sales de compuestos orgánicos con acetonitrilo, la desventaja es la búsqueda de un electrodo de referencia no acuoso, además se debe considerar la estabilidad de los compuestos y finalmente en los medios no próticos. La resistencia de la celda es muy alta, esta entre los 20-100 KOhms, esta alta resistencia ocasiona que se sustituya un sistema de dos electrodos por uno de tres, donde el producto iR aparentemente no varía entre el electrodo de referencia y el indicador. La alta resistencia se reduce si se emplea una gran cantidad de electrolito soporte o cuando la concentración requerida excede a la solubilidad.

8.2.5. Electrolito Soporte ^[17, 36,47, 108, 180, 181, 239, 246]

Un electrolito soporte es una disolución de una sal inerte en el disolvente elegido, generalmente en un exceso de un 10 a 100 % sobre la concentración de las especies estudiadas. Las principales funciones del electrolito soporte son:

- ❖ Cerrar el circuito de la celda electroquímica y así mantener la resistencia en un valor bajo, debido a que la concentración del electrolito soporte es mayor que la de las especies estudiadas.
- ❖ Resguardar la estructura de la interfase para que no sufra cambios a lo largo de la reacción, es decir, mantiene constante la fuerza iónica.
- ❖ Suprime los efectos de la corriente de migración, que ocurren por el movimiento de los iones, consecuencia de un campo eléctrico provocado por un diferencial de potencial entre el electrodo indicador y el electrodo auxiliar en la celda.
- ❖ La corriente de migración es reducida por la presencia de un exceso de iones no activos electroquímicamente, dentro del potencial en el que se trabaja.

Es necesario un sistema amortiguador, para mantener constante el pH en un solvente prótico, se convierte en una necesidad si los protones estuviesen implicados en la reacción del electrodo, por lo que el pH de la interfase del electrodo indicador con la disolución debe mantenerse invariable.

8.2.6. Atmósfera de trabajo ^[17, 36,47, 108, 180, 181, 239, 246]

Uno de los elementos importantes dentro de la celda electroquímica es la atmósfera en la que se realicen las mediciones, algunas mediciones electroquímicas pueden ser realizadas en presencia de oxígeno.

El oxígeno es electroactivo y su solubilidad en el agua es lo suficientemente grande como para que la reducción del oxígeno interfiera en muchas de las técnicas electroanalíticas en medio acuoso, o en alguna mezcla de disolventes o aún cuando se trata de un medio no acuoso. El principal obstáculo es la reoxidación de la especie electroreducida en presencia de oxígeno, por lo que muchos de los estudios electroquímicos se realizan en atmósferas de gas inerte, normalmente es nitrógeno, aunque también puede ser utilizado argón o una mezcla de gases raros. Se prefiere nitrógeno sobre argón, ya que este último es menos comercial que el primero. El nitrógeno debe ser de alta pureza para evitar la presencia de oxígeno, por burbujeo. La desoxigenación en ocasiones se lleva a cabo por el método Koper a una disolución acuosa de sulfato de cromo (II) o bien a una disolución acuosa de sulfato ácido vanadil se hace pasar gas nitrógeno.

Finalmente se hablará de algunos fenómenos de interés que ocurren dentro de una celda electroquímica.

En la celda electroquímica ocurre una reacción óxido reducción cuando se le aplica una diferencia de potencial, de la forma en que se aplique este potencial dará origen a una respuesta característica de la técnica electroquímica empleada. Este estudio se inclina por la voltamperometría cíclica.

8.3. Voltamperometría ^[17, 36, 47, 61, 62, 108, 137, 180, 181, 233, 239, 246]

La voltamperometría es una clase de mediciones electroanalíticas en la cual el parámetro controlado es el potencial del electrodo indicador (de trabajo) y varía con el tiempo, el parámetro medido es el flujo de corriente continuo en el electrodo indicador.

Las técnicas voltamperométricas se dividen en dos grandes grupos: aquellas más simples o clásicas, donde el potencial es aplicado de forma lineal. En esta categoría se encuentran las técnicas voltamperométricas en régimen de difusión pura, como la voltamperometría de barrido lineal y cíclica, por otra parte se encuentran las voltamperometrías con un régimen de convección forzada, electrodos de disco rotatorio y de disco anillo.

8.3.7. Técnicas voltamperométricas en régimen de difusión pura ^[17, 36,47, 108, 180, 239, 246].

Algunas de las técnicas electroanalíticas más utilizadas se basan en el concepto de variar de manera continua el potencial que se aplica en la interfase electrodo-disolución y medir la corriente resultante.

La voltamperometría en disolución no agitada, el modo predominante de transporte de masas se limita a la difusión.

- A) Voltamperometría de barrido lineal: En esta técnica el potencial aplicado se varía linealmente con el tiempo desde un potencial inicial, E_i , hasta un potencial final, E_f , a una velocidad constante, v ($V s^{-1}$). Figura 8.7.

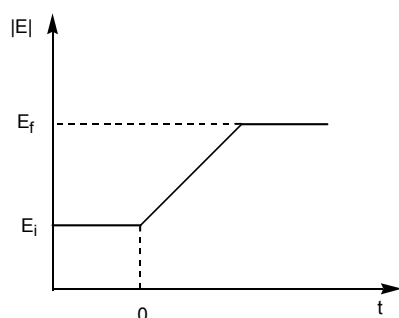


Fig. 8.7. Barrido lineal de potencial se inicia en E_i , y termina en E_f .

Como se puede observar en la figura, el barrido comienza en un valor de potencial E_i al cual no hay electrólisis, es decir, donde solo se detecta la corriente residual, realizándose un barrido positivo o negativo para obtener la respuesta deseada, ya sea una oxidación o reducción de la especie electroactiva. Los parámetros importantes desde el punto de vista electroanalítico en la voltamperometría de barrido lineal son la corriente de pico, i_p , y el potencial de pico, E_p .

En el caso de una reacción totalmente irreversible la corriente de pico viene dada por la ecuación:

$$E_p = E^{0'} - \frac{RT}{\alpha n_a F} \left[0.780 + \ln\left(\frac{D^{1/2}}{k^0}\right) + \ln\left(\frac{\alpha n_a F v}{RT}\right)^{1/2} \right]$$

El valor de E_p se desplaza $1.15RT/\alpha n_a F$ por cada década de aumento en v . Es importante señalar que E_p está afectado por un sobrepotencial de activación con respecto a $E^{0'}$ factor relacionado con la constante de velocidad heterogénea intrínseca k^0 .

Generalmente los sistemas irreversibles dan voltamperogramas más anchos y achatados que los reversibles, por lo que a partir de la expresión:

$$i_p = 0.227nFAC^*k^0 \exp\left[-\left(\frac{\alpha n_a F}{RT}\right)(E_p - E^{0'})\right]$$

Y relacionando $\ln i_p$ frente a $E_p - E^{0'}$ para diferentes velocidades de barrido de potencial, se obtendrá una línea recta de pendiente $-\left(\frac{\alpha n_a F}{RT}\right)$ y ordenada en el origen k^0 .

Un aspecto importante en toda técnica voltamperométrica es la corriente de fondo, que está compuesta por una corriente residual debida a impurezas electroactivas del disolvente, electrolito soporte, etc. y por la corriente de carga.

La corriente de pico debe medirse siempre de forma que no incluya esta corriente de fondo, para la cual suele extrapolarse la línea base de corriente que precede a la corriente farádica y medir i_p por diferencia, o bien puede realizarse un barrido por separado, a la misma velocidad, de la disolución del electrolito soporte y tomar i_p como la diferencia entre la corriente de pico medida desde el cero de intensidad y la corriente de fondo al mismo potencial.

La corriente de carga puede compensarse utilizando una técnica diferencial en la cual los barridos son simultáneos sobre dos electrodos iguales, uno sumergido en la muestra y el otro en una disolución de electrolito soporte. La corriente de fondo del barrido en el electrolito soporte es sustraída electrónicamente del voltamperograma de la muestra. La voltamperometría de barrido lineal es una técnica muy eficiente para investigar la existencia de reacciones químicas homogéneas acopladas a las reacciones electródicas. Las conclusiones que se pueden obtener basadas en las medidas de corriente son más seguras como diagnóstico de los mecanismos electrónicos que las basadas en las medidas de potencial, ya que ciertos factores experimentales, como la caída óhmica iR , los potenciales de unión o el estado de la superficie del electrodo, pueden desplazar los potenciales significativamente.

La adsorción de la especie electroactiva sobre la superficie del electrodo puede detectarse mediante esta técnica, se considera que la función de corriente generalmente aumenta en estos casos rápidamente al aumentar la velocidad de barrido, sin embargo, la relación i_p/v permanece prácticamente constante. Por otro lado, cuando el potencial es aplicado de forma continua con una inversión en el potencial final, se da origen a la voltamperometría de barrido triangular, la cual es probablemente la técnica electroanalítica más eficiente y versátil para el estudio mecanístico de las reacciones electródicas. Es una extensión de la voltamperometría de barrido lineal, realizándose una inversión en el sentido del barrido de potencial. De esta forma se aplica al electrodo indicador una señal de excitación triangular (Figura 8.8), es decir, el potencial se barre linealmente desde un valor inicial E_i hasta alcanzar

un valor E_{λ} potencial de inversión, al cual se invierte la dirección del barrido hasta alcanzar un potencial final E_f .

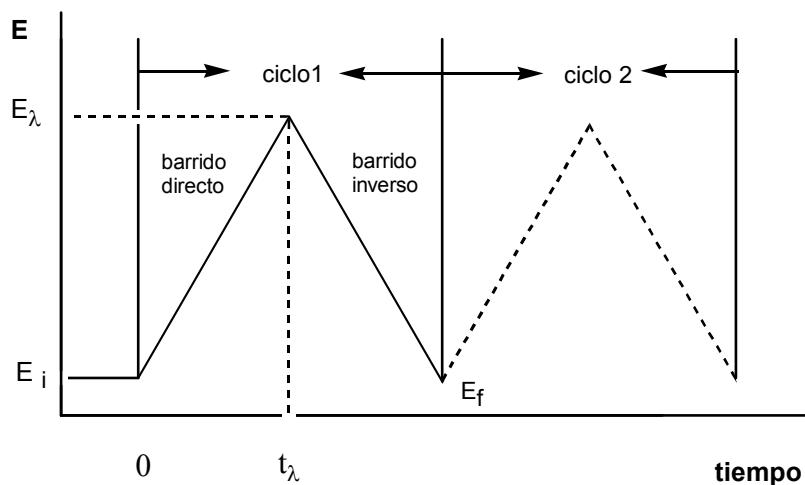


Fig 8.8. Señal de excitación potencial tiempo triangular utilizada en voltamperometría cíclica.

El barrido de potencial frecuentemente se termina al final del primer ciclo (E_f), pueden continuarse realizando ciclos sucesivos, lo que justifica que se le llame “voltamperometría cíclica”

Para obtener un voltamperograma cíclico, se mide la corriente que pasa por el electrodo indicador en una disolución sin agitar durante el barrido de potencial. Para un sistema reversible, si el potencial de inversión está como mínimo $\frac{35}{n}$ mV más allá del potencial del pico obtenido en el barrido directo, la forma de la curva en el barrido inverso es básicamente análoga al de la curva directamente registrada en la dirección opuesta en el eje de intensidad. La voltamperometría cíclica es capaz de generar rápidamente una nueva especie durante el barrido directo y a continuación probar su existencia en el barrido inverso.

El voltamperograma registrado representa la corriente medida con el electrodo indicador en función del potencial. Figura 8.9.

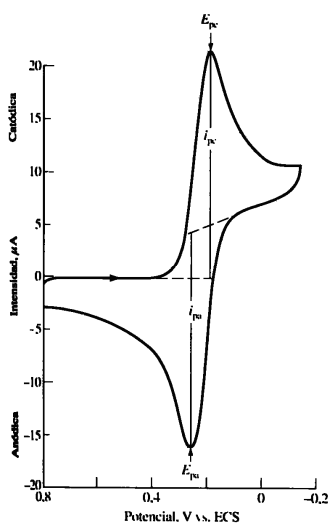


Fig. 8.9. Ejemplo de señales obtenidas por Voltamperometría cíclica de $K_3Fe(CN)_6$ en KNO_3 1M en un electrodo de Pt.

Los parámetros de interés en voltamperometría cíclica son las corrientes de pico, i_{pa} e i_{pc} o, mejor aún su relación, i_{pa}/i_{pc} , y la separación entre los potenciales de pico, $E_{pa}-E_{pc}$, (Figura 8.9). La medida de las intensidades de pico implica la extrapolación de una línea base que se suele tomar como la corriente existente antes que el pico comience a desarrollarse en cada uno de los barridos. El establecimiento de una línea base correcta, no es fácil debido a que esta línea base no es la misma que la corriente residual obtenida en un experimento idéntico sólo con el electrolito soporte.

El producto de una reacción electroquímica, en un sistema reversible puede ser identificado por voltamperometría cíclica midiendo la diferencia entre E_{pa} y E_{pc} , en este caso, a $25^\circ C$,

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{59}{n} mV$$

Donde n es el número de electrones transferido y E_{pa} y E_{pc} son los potenciales de pico anódico y catódico respectivamente, medidos en mV. Una separación de $\frac{59}{n}$ mV para ΔE_p es independiente de la velocidad de barrido de potencial para un par nernstiano, si bien es ligeramente dependiente del potencial de inversión E_s , aunque siempre es próximo a $\frac{59}{n}$ mV.

El potencial intermedio entre los dos potenciales de pico es el valor del potencial formal del par redox, respecto al electrodo de referencia:

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2}$$

La ecuación de $E^{0'}$ no es aplicable para sistemas irreversibles y cuasirreversibles y la separación entre los potenciales de pico es mayor de $\frac{59}{n}$ mV y depende de la velocidad de barrido. Para los sistemas totalmente irreversibles puede no observarse ningún pico en el barrido inverso. Por lo que se ha demostrado que para una velocidad de barrido dada, ΔE_p aumenta a medida que la constante de velocidad heterogénea k^0 del sistema disminuye.

Alternamente para un sistema con una constante de velocidad dada, la separación entre los picos es más grande al aumentar la velocidad de barrido. Asimismo, la caída óhmica iR no compensada causa que los picos se separen al aumentar el potencial, por lo que se debe estar seguro de que dicha caída es suficientemente pequeña como para que las caídas de potencial causadas por su efecto sean despreciables comparadas con los ΔE_p atribuibles a efectos cinéticos. La no reversibilidad también afecta la relación entre las corrientes de pico, es decir, cuanto más irreversible sea un sistema más pequeño será el valor de i_p en el barrido inverso, a menudo esto se debe tanto a una k^0 menor como al hecho de que una parte significativa del producto de la reacción electródica haya difundido desde la superficie del electrodo durante el tiempo necesario para alcanzar el pico en el barrido inverso. Por lo que no es recomendable deducir información cuantitativa de la relación entre las corrientes de pico para sistemas irreversibles.

8.3.8. Métodos electroquímicos para la medida de la capacidad antioxidante.

Una fuente de antioxidante naturales es de suprema importancia para apoyar la protección antioxidante del cuerpo humano. Este hecho dibuja la atención de científicos a los ácidos y a los flavonoides fenólicos en el contexto de su uso en la industria alimentaria y médico industria ^[38,45, 218, 229]. La búsqueda de antioxidantes naturales, eficientes y no tóxicos y el desarrollo de algunos sintéticos, exigen el desarrollo de nuevos métodos y la mejora de los ya existentes para el análisis de la capacidad antioxidante de un compuesto puro, o de una matriz compleja. Las características antioxidantes se estudian comúnmente por espectrofotometría ultravioleta-visible, espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica, fluorescencia, quimioluminiscencia, cromatografía, y electroquímica. Los métodos electroquímicos centran su atención en la relación que existe entre la estructura, el potencial de

la oxidación y la capacidad antioxidante de los compuestos individuales. Sin embargo, estas investigaciones se han realizado para pocos compuestos. Se han realizado muchos estudios que confirman la conveniencia de usar técnicas voltamperométricas para estimar la capacidad antioxidante. Los análisis voltamperométricos de mayor uso son: voltamperometría cíclica (VC), voltamperometría de la onda cuadrada (VOC), y la voltamperometría diferenciada del pulso (VDP). Los antioxidantes se oxidan a potenciales bajos que dan lugar a corrientes farádicas proporcionales a la concentración del antioxidante. Aunque los análisis voltamperométricos no son tan comunes como los fotométricos. Los métodos que implican radicales libres tienen como objetivo probar las características antioxidante de muestras biológicas, los alimentos, los extractos y las sustancias puras, pero ninguna proporcionan la información cuantitativa relativa a la oxidación, factor importante que describe a los antioxidantes. Los compuestos que son antioxidante en virtud de su capacidad de actuar como los reductores en la disolución, son fácilmente oxidados en los electrodos inertes. La voltamperometría cíclica se ha aplicado para caracterizar una amplia gama de antioxidantes, los que incluyen ácidos y flavonoides fenólicos, antioxidantes sintéticos, en sistemas biológicos una onda de potencial anódico baja en aproximadamente 400 milivoltios (Ag/AgCl), se ha atribuido al ascorbato y al urato [54, 83, 184, 244].

Los primeros investigadores en hacer estudios sobre antioxidantes que utilizan técnicas electroquímicas son Chevion (1997,2000) [40, 41, 42] y Kohen (2002) [119], los cuales se enfocan en la evaluación de la capacidad antioxidante de moléculas de bajo peso molecular, fluidos biológicos o homogenizado de tejidos [37, 38]. A estos trabajos siguieron, otros cuya finalidad es la medición de la capacidad antioxidante de manera directa, los cuales proponen como apoyo fundamental a sus investigaciones técnicas electroquímicas. Las características electroquímicas como el potencial de oxidación de compuestos puros, alimentos y muestras biológicas se asocian con la capacidad antioxidante, esta relación permite la evaluación de dicho compuesto [152,218]. De los métodos electroquímicos, encontramos a la voltamperometría cíclica (VC) como la de mayor uso, pues se ha adaptado a la evaluación de la capacidad de reducción total de antioxidantes de bajo peso molecular en matrices complejas [63]. Regularmente los trazos de voltamperometría cíclica se registran de -0.5 a $+1.5$ V, contra un electrodo de referencia en una velocidad de 100 o de 400 mVs^{-1} . Los barridos se pueden realizar hacia potenciales positivos, donde se evalúan a los equivalentes de reducción o hacia potenciales negativos, donde se evalúan los equivalentes de oxidación. Particularmente los secuestradores de radicales se oxidan en potenciales relativamente bajos de oxidación que corresponde al grupo fenol, su potencial de oxidación se encuentra alrededor de 0.45 V a 1 V, a potenciales mayores los compuestos experimentarían reacciones tales como dimerización, hidroxilación o polimerización [45,182]. Progresivamente, las técnicas electroquímicas se han probado y convertido en una herramienta alternativa para la evaluación de diversos extractos de alimentos debido a su rapidez, simplicidad y bajo costo. La voltamperometría cíclica (VC) se utiliza con frecuencia para la caracterización de sistemas electroactivos. Sin embargo, cuando

son sustancias orgánicas, se presentan los fenómenos de la adsorción en la superficie del electrodo, limitando el uso de esta técnica a medidas cuantitativas ^[67, 152]. Para superar esta restricción y aumentar la información cuantitativa de las capacidades antioxidantes de los extractos se emplean variantes de la técnica, por ejemplo la voltamperometría diferencial de pulsos. En esta técnica la corriente se mide antes y después del potencial del pulso permitiendo la discriminación de efectos como la absorción sobre el electrodo constante en cierto intervalo de potencial. La capacidad de reducción de una muestra se analiza a partir de tres parámetros obtenidos de los trazos de obtenidos por voltamperometría cíclica: (i) el potencial de la oxidación de media onda, $E_{1/2}$, que refleja la capacidad de reducción específica; (ii) la intensidad de corriente anódica (I_a); y (iii) el área bajo de la curva anódica (S). I_a y S se relacionan con la concentración de la especie reducida, presente en la muestra ^[73, 94].

Una onda anódica en matrices complejas, muestras biológicas y alimentos, presenta a menudo más de un solo componente, que podría donar electrones alrededor del mismo potencial, se ha propuesto el parámetro de área bajo de la curva anódica para la evaluación de la capacidad de reducción total, ya que los cambios en el valor de área bajo de la curva anódica refleja mejor una variación en un solo componente dentro de una onda anódica que el cambio correspondiente en intensidad de corriente anódica. El perfil de la voltamperometría cíclica se puede obtener en medio acuoso, así como en disolventes orgánicos como el acetonitrilo y algunas mezclas de disolventes, por ejemplo: agua/ acetonitrilo, acetonitrilo/ metanol a condición de que haya componentes óxido reductores activos y suficiente electrólito soporte en la disolución para apoyar las reacciones óxido reducción en el electrodo ^[66, 67, 152]. Esta modificación permite la cuantificación de componentes lípido-solubles, que no son tan fáciles de cuantificar con otras metodologías. El análisis de muestras basado en las características electroquímicas de cada compuesto no requiere el uso de precursores de especies radicales porque la descripción de su comportamiento electroquímico se relaciona con las características fisicoquímicas del sistema. Por otra parte, las muestras turbias e intensamente coloreadas pueden ser resueltas sin la preparación anterior de ella. Así, los métodos electroquímicos se utilizan como prueba rápida de la capacidad antioxidante de muchos compuestos, incluyendo los polifenoles. Los potenciales de la oxidación han sido empleados con éxito para la comparación de las actividades antioxidantes de los siguientes compuestos: ácidos fenólicos, flavonoides, tocoferoles, etc ^[27, 30, 141].

La voltamperometría cíclica es empleada en la determinación de las características antioxidantes de los polifenoles contenidos en el vino. Un método simple fue desarrollado para estimar la actividad antioxidante de los flavonoides que implicaba la correlación cuantitativa entre la inhibición de la peroxidación del lípido y el potencial de media onda ($E_{1/2}$). La determinación de dos índices el potencial de media onda y la capacidad de quelatar a los cationes de hierro, es suficiente para la evaluación del potencial antioxidante de flavonoides ^[40].

^{41, 42]}. Un factor significativo es el pH, a partir de él se determina la capacidad antioxidante de polifenoles de plantas, bebidas, medicinas y suplementos alimenticios, en estos productos el pH varía en una amplia gama de 3.0 a 7, al entrar en el cuerpo también influyen los cambios de pH en el metabolismo de estos compuestos. La influencia del pH en el comportamiento antioxidante se considera, en la mayoría de los estudios de importancia en el análisis electroquímico de estos compuestos. El pH tiene una dependencia en el potencial máximo anódico (E_{ap}) de polifenoles. Para todos los valores de pH, las formas cíclicas del voltamperograma cambian de forma poco significativa. El primer pico distinto se observa en la polarización anódica, en el aumento de valores de pH, el voltaje máximo del ánodo disminuye. Esta disminución se debe al decaimiento en el grado de protonación del antioxidante y al cambio de carga en la molécula a valores negativos. A un pH más alto, los compuestos se oxidan fácilmente y aumenta su actividad antioxidante. Esto sucede porque a valores de pH altos se facilita la desprotonación de los grupos de hidróxilo. La oxidación electroquímica quita un electrón de la molécula, lo que facilita la mayor carga negativa y entonces la reacción puede ocurrir a potenciales más bajos (Fig. 8.10). Es decir, la desprotonación favorece un aumento en la eficacia antiradical de los polifenoles, y de la donación del electrón en el paso decisivo del mecanismo que mide la capacidad antioxidante del compuesto desprotonado. Otros estudios electroquímicos ^[27, 30, 131, 178] fueron realizados en valores de pH cerca del pH fisiológico, el cual evita la conversión reversible de los polifenoles. Estudios anteriores demostraron que a pH mayores de 8.0, los voltamperogramas cíclicos de algunos ácidos y flavonas fenólicos eran terminantemente irreversibles, y su potencial de la oxidación anódico no podría ser determinado confiablemente. Algunos autores sugirieron la dimerización y la polimerización de los ácidos fenólicos por su oxidación en el electrodo ^[27, 30, 131, 178].

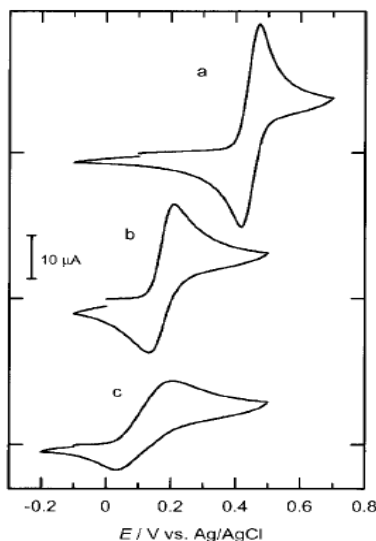


Fig. 8.10 Voltamperograma cíclico en una solución 1.0 mM de ácido cafeico en un electrodo de trabajo de carbono vítreo en disolución acuosa de 50 mM de KCl y 0.1 M de disolución amortiguadora a tres diferentes valores de pH: (a) 3.0, (b) 6.9 y (c) 8.4. A una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1}

Al parecer, la actividad antioxidante de nuevos compuestos de naturaleza medicinal o alimenticia no puede ser predicha sin la comprensión de ciertas regularidades ^[66,191]. Los estudios que se han realizado con la pretensión de encontrar un parámetro clave que permita la predicción de la actividad antirradical de un compuesto han sido poco fructíferos. Este parámetro debe correlacionar la estructura química y la capacidad antioxidante. En los métodos electroquímicos la atención se centra en esta correlación estructura-potencial de la oxidación, y con ello la capacidad antioxidante de cada compuesto, por ejemplo: el potencial medido de la oxidación está estrechamente vinculado a las estructuras de los compuestos investigados ^[38,93, 185].

Se ha establecido al potencial de media onda como parámetro conveniente para representar la capacidad antioxidante de los flavonoides, consecuencia de la oxidación electroquímica y de la donación del átomo de hidrógeno que implican la fractura del enlace fenólico entre el oxígeno y el hidrógeno, al producir un radical fenoxido (ArO^\bullet) y H^\bullet ^[178, 182]. En todos los ensayos empleados en la evaluación de la capacidad antioxidante se realizan de manera controlada en una disolución homogénea con un oxidante artificial o precursor radical agregado para iniciar la reacción, mientras que en un sistema real por ejemplo: un alimento, la reacción ocurre sin el iniciador radical u oxidante agregado, se inicia por efectos de la luz, iones metálicos, o calor durante la transformación o almacenaje de los alimentos. A menudo en una mezcla heterogénea (como en emulsiones del alimento), la distribución del antioxidante en la fase es crítica para su eficacia ^[112].

Los compuestos fenólicos que en su estructura cuentan con grupos orto o para se encuentran típicamente a potenciales de oxidación más bajos que compuestos con posiciones meta o fenoles aislados, en el caso del ácido ascórbico tiene un potencial de oxidación incluso más bajo. El análisis electroquímico en el estudio de las características antioxidantes de polifenoles permite la observación de la etapa inicial de la capacidad antioxidante, que implica la transferencia de un electrón. En esta etapa se pueden obtener el potencial de oxidación de un analito, el número de electrones transferidos y velocidad de la reacción en el electrodo. Así, los métodos electroquímicos se pueden utilizar para una prueba rápida de la capacidad antioxidante de muchos compuestos, incluyendo los polifenoles ^[27, 30, 31]. Los potenciales de oxidación se utilizan con éxito para la comparación de las capacidades antioxidante de compuestos como: ácidos, flavonoides, tocoferoles, etc. fenólicos por ejemplo: la voltamperometría cíclica se ha aplicado para determinar las características antioxidantes de los polifenoles del vino. En un principio se buscó desarrollar un método simple para estimar la capacidad antioxidante que implicará la correlación cuantitativa entre la inhibición de la peroxidación del lípido y el potencial de media onda ($E_{1/2}$). Van Acker y colaboradores determinaron que se necesita de dos índices, $E_{1/2}$ y la capacidad de quelatar cationes de hierro, suficientes para la evaluación del potencial de flavonoides como antioxidante. La estructura fenólica influye en la capacidad antioxidante, compuestos con grupos que donan dos o más

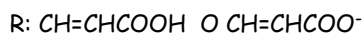
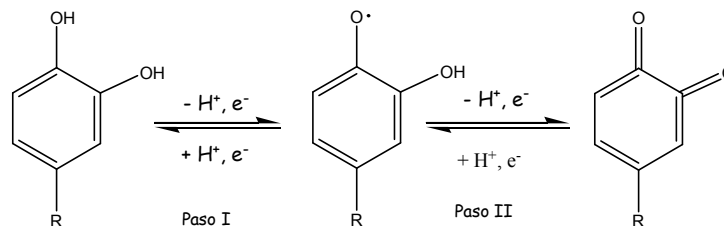
electrones a bajos potenciales anódicos, es decir con capacidad antioxidante mayor que los fenoles monosustituídos, los grupos OH tienen efectos más fuertes que el sustituyente $-OCH_3$. Los estudios electroquímicos dan especial ventaja a las características antioxidantes de polifenoles, ya que permiten la reproducción de la etapa inicial del mecanismo antioxidante que implica transferencia de electrones ^[50, 143, 178]. Y con mayor eficacia de la capacidad antioxidante si la estructura molecular cuenta con un carbonilo, o bien si se trata de un ambiente aceitoso, por ejemplo: los antioxidantes polares son más eficaces en lípidos puros y los no polares en un sustrato polar, esto confirma a los derivados del ácido ascórbico y tocoferoles como antioxidantes. Existe una estrecha relación entre la actividad antioxidante y el potencial máximo de oxidación en voltamperometría cíclica, es decir, a mayor número de grupos hidroxilo, es menor el potencial de oxidación y por lo tanto mayor capacidad antioxidante. Es importante conocer los potenciales de oxidación a diferentes pH's, ya que proporcionan información sobre el mecanismo de oxidación. A pH's altos los compuestos son fácilmente oxidables y por lo tanto aumenta su capacidad antioxidante ^[20, 30, 178]. De los compuestos fenólicos que se evalúan con voltamperometría cíclica se obtienen los siguientes parámetros: 1.- El valor potencial es dependiente del comportamiento óxido-reducción de cada compuesto, lo cual refleja su capacidad para perder electrones. 2.- La magnitud de la corriente máxima es directamente proporcional a la concentración, es decir, a potenciales bajos encontramos a los mejores antioxidantes. En el caso de los anillos aromáticos con numerosas sustituciones, el potencial se mantiene bajo, contrario a lo que se esperaba. Por ejemplo: la introducción de un grupo metoxi al anillo aromático provoca variación en el potencial registrado, pero la adición de metilos no altera el potencial de oxidación, lo mantiene bajo. Los factores de tipo estructural que influyen en la disminución de la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos son la metilación de los grupos hidróxido, los grupos OH tienen efectos más fuertes que los $-OCH_3$. Generalmente, hay relación entre la capacidad antioxidante, los potenciales antioxidante y la actividad prooxidante. En su mayoría los compuestos con potencial anódico bajo (0.45 V) actúan como prooxidante. Según el potencial máximo de la oxidación, los compuestos bajo estudio se dividen en grupos: simple fenoles o ácidos monohidroxifenólicos, que se oxidan lentamente en comparación con otros compuestos en potenciales máximos ánódicos sobre 600 milivoltio y polifenoles con sustituyentes metoxi con potenciales máximos de oxidación dentro de 400-600 milivoltio; flavonoides y ácidos fenólicos con dos grupos hidroxilo en posiciones orto referente a uno del otro (Potenciales máximos de la oxidación debajo de 400 milivoltio). Es interesante que los compuestos monohidroxifenólicos con sustituyentes metoxi donen un electrón más rápidamente que monohidroxifenoles sin los grupos metoxi. Este fenómeno se puede explicar por el efecto estabilizador de los grupos metoxi en el anillo fenólico después de la pérdida del electrón. Otro factor que altera el potencial de oxidación es el número de grupos hidroxilo sustituidos en el anillo aromático cuanto más grande es el número de grupos hidroxilo, más bajo es el potencial de oxidación. Es evidente que cuanto más alta la capacidad antioxidante es más bajo el potencial de la oxidación. El primer pico anódico corresponde a la

transferencia rápida de dos electrones, que se traduce en datos electroquímicos y en capacidad antioxidante. Esta correlación también se observa para compuestos electroquímicamente irreversibles. Es obvio que los compuestos electroquímicamente reversibles están implicados en donación de un protón y de un electrón, que ocurren rápidamente con respecto al análisis de la capacidad antioxidante, lo que sugiere la presencia de otros mecanismos de su interacción con los radicales libres ^[182,198, 218,229].

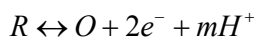
En el caso de los polifenoles, las características electroquímicas de los fenoles se puedan asociar a sus actividades biológicas. La capacidad de los compuestos fenólicos, especialmente los derivados polihidroxilados son la de limpiar radicales libres y se relaciona íntimamente con su eficacia para donar los átomos de hidrógeno. En este caso la oxidación electroquímica se puede utilizar como modelo de reacción, ya que implica la ruptura del enlace de O-H y la donación de electrones y de átomos de hidrógeno. Los potenciales de oxidación son indicadores generales de la capacidad de reacción con los radicales. Es decir, en un análisis estructural de los compuestos fenólicos, sugieren que la sustitución múltiple y la conjugación del anillo aromático son aspectos importantes que influyen en su comportamiento electroquímico y en la capacidad antioxidante, así como en la actividad preventiva de la peroxidación lipídica vía donación del átomo de hidrógeno de los grupos de hidroxilo unidos al anillo bencénico ^[67, 73].

Como ya se ha mencionado, un antioxidante actúa al captar un radical libre vía donación de electrones, el radical fenoxi resultante se reduce a otro compuesto por reacciones enzimáticas o no enzimáticas. Otro mecanismo antioxidante posible es vía la quelación de un metal de transición que disminuye la accesibilidad al ión metálico y con ello evita su participación en las reacciones tipo Fenton en presencia de metales de transición y de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, los compuestos fenólicos, reductores de gran alcance pueden ejercer efectos prooxidantes por autooxidación, esto ocurre por reducción a potenciales bajos, en la cadena de reacción en el paso inicial se forman una semiquinona y radical superóxido $O_2^{\cdot-}$, que reaccionan con las moléculas cercanas independientemente de su naturaleza. El equilibrio entre los efectos antioxidante y pro oxidante es muy delicado ^[93, 94,187].

Generalmente los antioxidantes se oxidan a las correspondientes quinonas en dos pasos el primero, es un intermediario semiquinona por la pérdida de un electrón, consecuentemente la formación de la quinona por la pérdida de un segundo electrón, descrito en la reacción siguiente.



La eliminación de H⁺ participa en cada paso redox, el potencial aplicado (E^o_{ap}) se aproxima al potencial de media onda (E_{1/2}) de los picos anódicos y catódicos, esto indica que deben ser dependientes del pH de la solución. Al aumentar el pH, el potencial de media onda va cambiando a potenciales negativos. Este comportamiento está de acuerdo con la literatura y se puede explicar por el intercambio de dos electrones en un solo paso durante la reacción de óxido reducción incluyendo la protonación.



Aquí R y O representan al antioxidante más los dos-electrones que ha perdido R en la reacción y m el número de protones implicados en la reacción redox. Un modo eficaz de retrasar la oxidación en los alimentos, así como en las células, es estar eliminando los radicales generados en la fase de la propagación o durante la subdivisión de los hidroperóxidos, por la presencia de compuestos con capacidad antioxidante, que actúan como inactivadores de los radicales peroxil o de los radicales alcohóxicos. En un nivel crítico se necesita de antioxidante que sean eficaces en un producto dado correspondiente a la concentración necesaria para inhibir todas las reacciones en cadena que comienzan en el proceso de iniciación. Mientras la concentración de antioxidante se encuentre sobre la concentración crítica, el número total de radicales se mantiene en un nivel bajo constante, un plazo que se define como período de inducción. Durante el período de inducción el antioxidante decrece gradualmente y cuando alcanza la concentración crítica, los radicales se escapan de la reacción con el antioxidante, entonces la concentración de hidroperóxidos aumentará. El alto nivel de hidroperóxidos y el aumento posterior en la concentración de radicales y el restante antioxidante, será utilizado totalmente. Con todo el antioxidante consumido, el proceso oxidativo se acelerará y el aumento en la producción de productos secundarios de la oxidación llevará a un proceso de deterioro en el sistema. A menudo las técnicas que se han utilizado para evaluar la capacidad antioxidante, necesitan que se confirmen con alguna otra, por ejemplo por espectroscopía de ultravioleta- visible ^[94, 105, 184].

Así, la voltamperometría cíclica se puede aplicar de manera complementaria a análisis como el ABTS⁺, a la caracterización de resinas fenólicas y al estudio de su acción antioxidante,

porque los mecanismos de oxidación electroquímica de diversos compuestos se pueden diferenciar perceptiblemente. Las técnicas electroquímicas ofrecen una caracterización de manera detallada de los parámetros físico-químicos necesarios como enumerar a los electrones implicados en la etapa de la transferencia de la carga (n), en los mecanismos de la transferencia de carga y de la influencia de protones, de las constantes de la reacción, etc. El estudio aislado de la sustancia permite la caracterización electroquímica, así como de establecer las relaciones entre el mecanismo estructural de la sustancia y su capacidad antioxidante. Algunos Fito antioxidantes en considerables cantidades se han investigado por técnicas electroquímicas [2,3, 7, 9, 32, 33, 38, 45, 55, 57, 77, 80, 81, 82, 84, 101, 124, 150, 152, 159, 194]. Las técnicas voltamperométricas correlacionan potenciales de oxidación, intensidad de corriente y/u otros parámetros electroquímicos con la capacidad antioxidante, además de ser más selectiva y sensible comparada con otros métodos, como los espectrofométricos y más reproducibles en análisis biológicos [244].

La desventaja más importante de las técnicas electroquímicas se relaciona con el hecho de que algunos antioxidantes biológicos relevantes (e.g. glutatión, cisteína), tienen una respuesta baja cuando se usan electrodos de carbón vítreo, para solucionar este inconveniente se emplean un electrodo de Au/Hg para la medida de la capacidad antioxidante del glutatión. Una limitación práctica importante, es que el electrodo de trabajo tiene que estar con frecuencia limpiándose para quitar residuos de muestra de su superficie y mantener su sensibilidad [40, 41, 42].

Por otra parte, se tiene la posibilidad de ocurrencia de los procesos electroquímicos conectados a las reacciones químicas, entonces la correlación entre la capacidad antioxidante, potencial de oxidación y/o la intensidad de la corriente no es siempre simple y directa. Así la posibilidad de que se oxide el fenol bajo determinadas condiciones para producir otras especies electroactivas que sean capaces de continuar con la cadena de reacción y aumentar la intensidad de corriente, disminuye. Los resultados conseguidos para la capacidad antioxidante de productos naturales con diversas técnicas han demostrado que la correlación entre los métodos electroquímicos y la capacidad antiradical es más grande en comparación con el número de electrones y el potencial de oxidación [73, 94, 105, 187, 198, 195, 244].

8.3.9. Estudio de la capsaicina con técnicas electroquímicas.

Los principales estudios de la capsaicina con técnicas electroquímicas son aquellos en los que se evalúa la pungencia en diferentes muestras de chiles, en sustitución al antiguo método de detección organoléptica, método Scoville, descrito a continuación [3, 19, 34].

Escala de unidades Scoville y la medición del picor de los chiles.

La escala de unidades Scoville, es un sistema de medición del picor de los chiles inventada por Wilbur Scoville, en la primera década del siglo XX. El picor era medido por el método organoléptico Scoville, sistema relativo debido a que se emplean voluntarios para percibir el picor en una dilución de agua-azúcar. Su objetivo es determinar la máxima dilución del extracto de chile en la que aún fuera detectable el picor. De esta manera, si un chile jalapeño ha sido determinado en 4500 unidades Scoville, significa que se necesitan 4500 partes de disolución para diluir una parte de extracto del chile jalapeño, hasta el punto en que el picor aún pueda ser detectado. Otros métodos para la medición de capsaicinoides es Gillette también sensorial pero de mayor eficiencia, la espectroscopía con oxitricloruro de vanadio (V), el cual mide la cantidad de capsaicinoides como grupo pero no hace diferencia en pungencia de los diferentes capsaicinoides. Hoy en día se emplea la cromatografía de líquidos de alta resolución para medir el contenido de capsaicina en chiles. Este método es más preciso, mide los niveles de capsaicina que se miden según American Spice Trade Association, unidades que son más reproducibles que el tradicional método Scoville. Los resultados pueden ser convertidos en unidades Scoville multiplicando por un factor de 15, sin embargo es una herramienta poco económica, lo que ha llevado al desarrollo de un sensor electroquímico, un nanotubo de carbono utilizando en voltamperometría de redisolución de especies adsorbidas mediante pulsos diferenciales ^[26, 49, 52, 111].

Se han reemplazado los métodos Scoville y la cromatografía de líquidos de alta resolución por uno más sensible, una técnica electroquímica para la determinación de capsaicina con un electrodo modificado, un nanotubo de carbono como electrodo de trabajo, un electrodo auxiliar de platino y como referencia un electrodo saturado de calomel, empleando como técnica la voltamperometría de redisolución de especies adsorbidas mediante pulsos diferenciales. En primera instancia obtuvieron el siguiente voltamperograma ^[60, 95, 111].

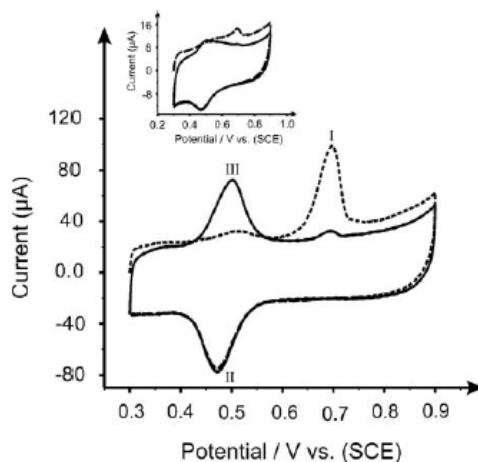


Fig. 8.11 Primer voltamperograma (línea no continua), segundo voltamperograma (línea continua) por voltamperometría absorbiva de 100 mM capsaicina, en 0.05 M de la disolución reguladora de Britton-Robinson a pH 1, a una $v=100 \text{ mV s}^{-1}$.

Podemos observar la aparición de los picos en el primer barrido (línea no continua, Fig 8.11), se observa un pico muy pequeño de oxidación (pico III) a 0.50 V, además de un pico bien definido de oxidación (pico I) en 0.70 V, junto con una reducción alrededor de 0.48 V. En un segundo barrido (línea continua), el pico I decrece considerablemente, la altura del pico de oxidación III incrementa abruptamente, sin embargo la altura del pico de reducción observada en 0.48 V permanece sin cambio. La oxidación electroquímica de la capsaicina en el primer "barrido" muestra una reacción químicamente irreversible, resultado de la hidrólisis del grupo 2-metoxi para la formación de la *o*-benzoquinona de la estructura de la capsaicina. Se realizó un estudio de la oxidación de la capsaicina en un intervalo de velocidades de 0.01 a 1 Vs^{-1} , el cual confirma que el proceso de óxido reducción es controlado por la adsorción y no por la difusión. El efecto del pH, estudio realizado en un intervalo de 1-12 para 100 mM de capsaicina, al ir incrementando el pH decrece el pico I, debido a la desprotonación de la mitad fenólica en la estructura de la capsaicina, esto sugiere que el número de protones y electrones involucrados en la reacción de oxidación de la capsaicina en el primer barrido es igual al número tanto en el paso electroquímico como en el químico en la oxidación de la capsaicina (Fig 8.12) ^[69, 111].

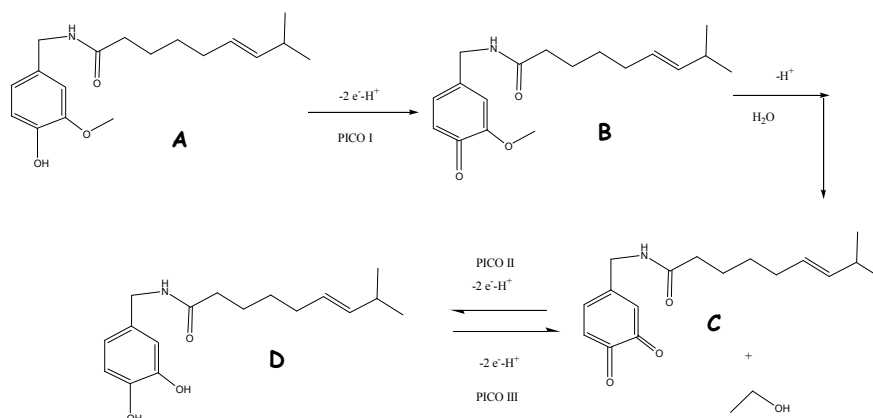


Fig 8.12 Mecanismo de oxidación de la capsaicina

La capsaicina también se ha estudiado por su actividad antioxidante, la cual se ha cuantificado *in vitro*, y debe comprobarse su efectividad como protectores de la salud *in vivo* o sobre los microorganismos de los alimentos. Como antioxidantes lipofílicos en *capsicum frutescens* destacan los pigmentos carotenoides mayoritarios (zeaxanteno, capsanteno, capsorrubeno) y otros minoritarios con actividad provitamina A (β -caroteno, γ -criptoxanteno). Otros compuestos antioxidantes son capsaicina, capsiato, dihidrocapsiato; α -tocoferoles; los ácidos: palmítico, cafeíco, mirístico y pentadecanoico; el campesterol y el estigmasterol, la resina del ácido laúrico, el mirceno, quercetina, terpinen-4-ol, la escopoletina, etc. En *capsicum annum* también existe eugenol, γ -terpineno y campfeno. En los carotenoides incluidos en los chiles encontramos también a la capsantina y caroteno ^[69, 114, 120].

A menudo los flavonoides y los ácidos fenólicos eran considerados por separado de los capsaicinoides, sin embargo se ha encontrado que los caminos biosintéticos del fenil propanoico y del capsaicoide, pueden converger durante la maduración del fruto del *capsicum annum*. Los chiles son una fuente rica en vitamina C y E, así como la provitamina A y compuestos carotenoides con las características antioxidantes bien conocidas. Cada carotenoide es de importancia en los chiles, por ejemplo: el color de los chiles depende de los niveles de componentes que éstos tengan y en función de ello se encuentra también la capacidad antioxidante de cada uno de los chiles. Hay pocos informes sobre la actividad antioxidante de la capsaicina y de la dihidrocapsaicina dependiendo de su estructura. La capacidad antioxidante de estos compuestos medidos por el sistema de modelo del β -caroteno y de ácido linoleico, comparados con la actividad del éster ácido ferúlico. Puede ser el resultado de la presencia de los mismos grupos en el anillo fenólico (un grupo metoxi en la posición orto al OH) de los capsaicinoides y del éster ácido ferúlico, que influenciaron las características antioxidantes ^[130,134]. Con lo anterior se demostró que el grupo amida presente

en capsaicina no desempeña un papel principal en su actividad antioxidante bajo condiciones de la oxidación del radical libre, que el comportamiento antioxidante para la capsicina era debido sobre todo a la mitad fenólica en la molécula, y que el producto principal de la oxidación de la capsicina es su dímero dicapsaicina (Fig 8.13), de actividad antioxidante más baja que la presentada por la dihidrocapsaicina y la capsicina ^[145, 149]. Esto puede sugerir que el doble enlace en la cadena, tiene que ver con la actividad antioxidante de la capsicina, además la sustitución con un grupo metoxi también disminuye el potencial de oxidación anódico. La actividad antiradical de la capsicina y de la dihidrocapsaicina en el sistema modelo de DPPH eran comparables. Esto sugiere que en este sistema modelo, el enlace doble en la cadena desempeña un papel de menor importancia en la actividad antiradical de la capsicina ^[160, 202, 206]. En otros estudios se ha encontrado que el carbón bencílico C-7 y no el grupo OH fenólico de la capsicina, es responsables de dicha actividad antioxidante. Además de encontrar que el grupo noneamida de la vainillina es producto de la descomposición oxidativa de la capsicina. La sustitución de un grupo electrón-donador como un grupo hidroxilo en el anillo de bencílico, dispersa generalmente la carga positiva en el Radical metileno de la mitad bencílico, por lo tanto estabiliza al radical bencílico. El grupo hidroxilo en un fenol dirige a posiciones *orto-para* que estabilizan a los cationes bencílicos ^[127, 128, 220].

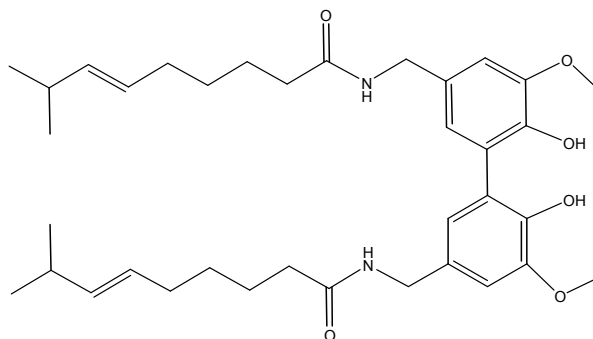


Fig 8.13 Dicapsaicina, dímero producto de la oxidación de la capsicina

La capsicina es estable en disolventes no polares, mientras que era inestable en disolventes polares y tiende especialmente a descomponerse en disolventes próticos, tales como alcohol y agua. La descomposición procede por sustitución nucleofílica unimolecular, SN^1 , vía el catión bencílico formado, y el grupo del *p*-hidróxido bencílico en la capsicina contribuye a la formación y a la estabilización del catión bencílico ^[223, 231].

9. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN HPLC.

9.1. Cromatografía líquida ^[63,147].

En la cromatografía líquida los componentes de una mezcla son llevados a través de una fase estacionaria fijada dentro de una columna mediante el flujo de una fase móvil líquida. Las separaciones están basadas en las diferencias de la velocidad de migración entre los componentes de la muestra, que vienen condicionadas por la naturaleza de los analitos y su interacción con las fases.

Se lleva a cabo una cromatografía líquida en *fase normal* cuando la fase estacionaria es relativamente polar y la fase móvil es relativamente apolar. Se realiza una cromatografía en *fase inversa* cuando la fase estacionaria es relativamente apolar y la fase móvil es relativamente polar.

Hay cuatro tipos básicos de cromatografía en los que la fase móvil es un líquido:

- Cromatografía de reparto, para especies poco polares pero no iónicas de masa molecular < 104 g/mol.
- Cromatografía de adsorción o cromatografía líquido-sólido, para especies no polares, isómeros estructurales y grupos de compuestos de masa molecular < 104 g/mol.
- Cromatografía de intercambio iónico, para especies iónicas de masa molecular < 104 g/mol.
- Cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía en geles, para solutos con masa molecular >104 g/mol.

La elución de los componentes de una muestra comprende el lavado de una parte de la muestra disuelta en la fase móvil a través de una columna de fase estacionaria por agregado de disolvente fresco.

La velocidad de migración de un soluto es función del tiempo requerido para salir de la columna (\times longitud). El tiempo de retención es grande si los solutos son fuertemente retenidos por la fase estacionaria, velocidades bajas, y el tiempo de retención es pequeño si los solutos tienen mayor afinidad por la fase móvil, velocidades altas.

El detector se coloca en el extremo final de la columna, y la señal se transforma en una gráfica en función del tiempo, un cromatograma, que consta de una serie de picos simétricos.

Los picos sobre el eje de tiempo se emplean para identificar tanto cualitativa (posición en el eje) como cuantitativamente (área bajo los picos) los componentes de la muestra.

La cromatografía cuantitativa se basa en una comparación de la altura o del área del pico de un analito con el de uno o más estándares. Ambos parámetros varían linealmente con la concentración. La cromatografía cualitativa se basa en la comparación de la posición de los picos (tiempos determinados de retención) con cromatogramas estándares.

La efectividad de la columna cromatográfica para la separación de solutos depende de las velocidades relativas a las cuales las especies son eluidas. La eficiencia máxima para la cromatografía líquida ocurre a muy bajas velocidades de flujo. Se puede incrementar la eficiencia de la columna si se disminuye el tamaño de la partícula del empaque de la columna, se reduce la viscosidad de la fase móvil o se incrementa la temperatura.

En las primeras etapas del desarrollo de la cromatografía de líquidos, los científicos se dieron cuenta de que se podían conseguir grandes aumentos en la eficacia de la columna, disminuyendo el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. Sin embargo, no fue sino hasta finales de los años sesenta, cuando se desarrolló la tecnología adecuada para producir y utilizar fases estacionarias de tamaño de partícula del orden de los 3 ó 10 μm . Esta tecnología requiere una instrumentación sofisticada, que contrasta con las simples columnas de vidrio de la cromatografía de líquidos clásica. Para distinguir estos procedimientos más nuevos de los métodos básicos, se emplea la denominación de *cromatografía de líquidos de alta resolución* (HPLC).

9.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ^[63,147].

La cromatografía líquida de alta resolución es el método más sofisticado y moderno de la cromatografía líquida, que utiliza partículas granuladas como fase estacionaria de la columna con diámetros muy pequeños para aumentar la eficiencia, en torno a 3-10 μm . Así, se ha conseguido reducir el tamaño de la columna a 10-30 cm de largo y 4-10 mm de diámetro en la HPLC, y el tiempo necesario para la separación, de minutos a 1 h.

9.2.1. Instrumentación.

Con objeto de alcanzar un caudal de eluyente razonable la fase estacionaria con un tamaño de partícula entre 3 y 10 μm , son las más comunes en la cromatografía de líquidos moderna, se requieren presiones de algunos cientos de kilos por centímetro cuadrado. Por

consecuente, de las altas presiones, el equipo necesario para la **cromatografía líquida de alta resolución** es más sofisticado y caro que el que se utiliza en otros tipos de cromatografía. La Figura 9.1 muestra un esquema de los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

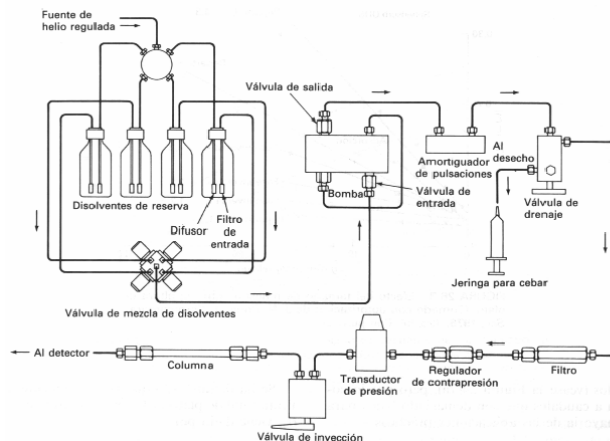


Fig. 9.1 Componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución

Descripción breve de los componentes principales de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución:

Las columnas que se utilizan para la cromatografía líquida de alta resolución son de acero inoxidable, con un diámetro interno de 2-5 mm y una longitud variable de 10 a 30 cm, dependiendo del diámetro de las micropartículas de fase estacionaria puede ser de 3-10 μm . En muchos casos se utiliza una precolumna para eliminar contaminantes y partículas de polvo.

Los equipos de cromatografía líquida de alta resolución modernos están equipados con calentadores de columna, que controlan la temperatura desde la cercana al ambiente hasta 150 $^{\circ}\text{C}$. Al mantener la temperatura constante se obtienen mejores cromatogramas.

Los materiales de relleno de las columnas dependen de las distintas separaciones. Básicamente, las micropartículas utilizadas están compuestas de sílice, aluminio o resina. Pueden ser de dos tipos:

- Partículas enteramente porosas, de forma irregular y diámetro 3-10 μm .
- Partículas esféricas de superficie porosa, con diámetros de 30-60 μm .

Las bombas de presión necesarias son de varios centenares de atmósferas para conseguir velocidades de flujo razonables con micropartículas de 3-10 μm debido a la

resistencia que ofrecen. Las elevadas presiones que generan las bombas no constituyen un peligro de explosión, puesto que los líquidos no son muy compresibles.

Se dispone de varios **depósitos de disolvente de un volumen aproximado de 500 mL**. Es necesario que estos depósitos estén acompañados de desgasificadores para eliminar los gases del disolvente, pues al producir burbujas en la columna se interfiere en los resultados.

En la elección de la fase móvil o disolvente, se debe considerar la óptima interacción con la fase estacionaria y además la separación debe ser lo más rápida posible. Los parámetros que determinan el tipo de disolvente a utilizar son: viscosidad, transparencia al ultravioleta, punto de ebullición, índice de refracción, inercia frente a la muestra, resistencia a la corrosión, toxicidad, precio y mantenimiento.

El sistema de inyección de muestra se basa en "asas de muestreo", son bucles o válvulas dosificadoras que permiten una aplicación cuantitativa y reproducible a presión elevada. Proporcionan una selección del tamaño de la muestra que va desde 5 a 500 μL . La muestra se pasa primero al bucle sin presión, para luego pasar a la columna accionando el flujo del disolvente con una llave de varias vías o válvulas de membrana.

La muestra no debe contener sólidos para que no se atasque la columna, si es necesario deberá filtrarse primero a través de un filtro de membrana o precolumna. Lo mejor es disolver la muestra en el eluyente que se vaya a emplear en la separación. El volumen inyectado de muestra debe ser lo más pequeño posible, para que los resultados aparezcan más nítidos.

Para la cromatografía líquida de alta resolución se emplean distintos detectores dependiendo de la naturaleza de la muestra.

9.2.2. Detectores.

Uno de los mayores retos en el desarrollo de la cromatografía de líquidos ha sido el perfeccionamiento de los detectores. Un detector de cromatografía líquida de alta resolución debe tener un volumen interno mínimo a fin de reducir las interferencias en la medición de la muestra.

Los detectores en cromatografía de líquidos son de dos tipos. Los detectores basados en las propiedades de la disolución comparan el cambio global de alguna propiedad física de la

fase móvil con y sin soluto eluido, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica, la densidad que se modifica por la presencia de los analitos. Estos detectores responden a un conjunto amplio de solutos, pero suelen ser poco sensibles. En contraste, los detectores basados en una propiedad del soluto responden a alguna de las propiedades física o fisico-química del soluto, como la absorbancia ultravioleta, fluorescencia, o intensidad de difusión, electroquímicos que no son propias de la fase móvil.

9.3.2.1. Detectores de absorbancia.

Los detectores de absorbancia ultravioleta son los más utilizados en cromatografía líquida de alta resolución y la modificación más importante es diseñar adecuadamente la celda de flujo, en la Figura 9.2 muestra el esquema de una celda de flujo en forma de Z para la medida de la absorbancia de los efluentes en una columna cromatográfica. El volumen de las celdas debe ser lo menor posible lo cual se limita de 1 a 10 μL y las longitudes de la celda van de 2 a 10 mm, la celda debe ser capaz de soportar presiones de varias atmósferas

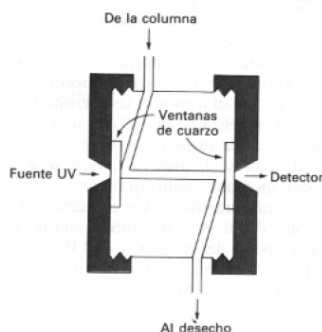


Fig. 9.2 Detector de absorbancia

Muchos detectores de absorbancia son dispositivos de doble haz, en los que uno de los haces pasa por la cubeta de flujo y el otro a través de un filtro que reduce su intensidad. Para comparar las intensidades de los dos haces se utilizan detectores fotoeléctricos contrastados. También se utilizan instrumentos de un solo haz. En este caso las medidas de intensidad del disolvente se almacenan en la memoria de un ordenador y al final se recuperan para el cálculo de la absorbancia.

9.3.2.2. Detectores de absorbancia de radiación ultravioleta con filtros.

Los detectores de absorción de luz ultravioleta más simples son los fotómetros de filtros con una lámpara de mercurio como fuente. En estos casos se aísla la línea intensa a 254 nm por medio de filtros; en algunos equipos también se pueden utilizar las líneas a 250, 313, 334 y 365 nm empleando otros filtros. Este tipo de detector se utiliza de forma restringida para aquellos solutos que absorben a alguna de estas longitudes de onda. Algunos grupos funcionales orgánicos y diversas especies inorgánicas exhiben una banda ancha de absorción a una o más de esas longitudes de onda.

9.3.2.3. Detectores de absorbancia ultravioleta con monocromadores.

Algunos instrumentos de cromatografía líquida de alta resolución cuentan con detectores de radiación ultravioleta que consisten en un espectrofotómetro de barrido con óptica de red, otros se limitan a la radiación ultravioleta; mientras que otros abarcan la radiación ultravioleta y la visible.

Los detectores espectrofotométricos de ultravioleta más potentes son los instrumentos de rearreglo de diodos. Este tipo de instrumentos permiten obtener datos de un espectro completo en aproximadamente un segundo. De esta forma los datos espectrales para cada pico cromatográfico se pueden recoger y almacenar a medida que van saliendo de la columna.

9.3.2.4. Detectores de absorción de radiación de infrarrojo.

En los detectores de absorción de radiación de infrarrojo, existen dos tipos de detectores de radiación de infrarrojo. El primero con barrido de longitud de onda que se proporciona a través de tres segmentos de filtros semicirculares. El segundo, mucho más sofisticado, es un tipo de detector infrarrojo que se basa en los instrumentos de transformada de Fourier. Las celdas de los detectores de infrarrojo son semejantes a las de radiación ultravioleta, excepto en que las ventanas se construyen de cloruro de sodio o de fluoruro de calcio. Las longitudes de la celda oscilan de 0.2 a 1.0 mm, y los volúmenes de 1.5 a 10 μL . Los instrumentos de infrarrojo más sencillos pueden trabajar a una o más longitudes de onda; alternativamente, se pueden obtener los espectros de los picos parando el flujo en su tiempo de elución. Una de las mayores limitaciones al uso de los detectores de infrarrojo se debe a la baja transparencia de muchos de los disolventes que se utilizan. Por ejemplo, las bandas anchas de absorción infrarroja del agua y de los alcoholes impiden prácticamente el uso de este detector para muchas aplicaciones.

9.3.2.5. Detectores de radiación fluorescente.

Un cierto número de compuestos químicos tienen propiedades fluorescentes, esto es, pueden absorber radiación electromagnética de una determinada longitud de onda y emitir radiación fluorescente a longitud de onda más larga. Son compuestos típicamente fluorescentes aquellos sistemas cíclicos con un alto grado de conjugación

Los detectores de fluorescencia para cromatografía líquida de alta resolución son semejantes en diseño a los fluorímetros y espectrofluorímetros. En la mayoría de ellos, la fluorescencia se detecta por medio de un detector fotoeléctrico colocado perpendicularmente respecto al haz de excitación, la cual suele originarse por una lámpara de xenón o deuterio y seleccionar la longitud de onda adecuada mediante los correspondientes filtros. Los futuros desarrollos en los detectores de fluorescencia probablemente se basarán en el uso de fuentes de láser sintonizables, las cuales permiten una mayor sensibilidad y selectividad. Una ventaja inherente a los métodos de fluorescencia es su alta sensibilidad, que resulta ser más de un orden de magnitud mayor que la de los sistemas de absorbancia.

Los detectores de fluorescencia se caracterizan por ser especialmente sensibles, si bien, responden solo a la limitada gama de analitos que tienen propiedades fluorescentes. Con objeto de incrementar su aplicabilidad, es posible comunicar fluorescencia a determinados analitos mediante el uso de reactivos apropiados. En cromatografía de líquidos se ha aprovechado esta ventaja para la separación y determinación de los componentes fluorescentes de las muestras.

9.3.2.6. Detectores de índice de refracción.

El detector de índice de refracción es, posiblemente, el que más se aproxima al detector universal ideal, ya que, en principio, el índice de refracción (IR) de la fase móvil deberá modificarse por la presencia de cualquier soluto que tenga un índice de refracción diferente de ella. Por ello, la comparación del índice de refracción de la fase móvil pura con el de los efluentes que salen de la columna cromatográfica, indicará la presencia de cualquier soluto eluido.

Estos detectores miden la diferencia de índice de refracción entre el disolvente, que en su camino hacia la columna pasa a través de una mitad de la celda y el efluente de la columna que pasa por la otra mitad. Los dos compartimentos están separados por una placa de vidrio montada a un ángulo de modo que si las dos disoluciones difieren en el índice de refracción se produce una desviación de un haz de luz incidente. El desplazamiento del haz con respecto a

la superficie fotosensible del detector provoca una variación de la señal de salida, la cual, una vez amplificada y registrada, proporciona el cromatograma.

Los detectores de índice de refracción tienen la ventaja de que responden a casi todos los solutos, es decir, son detectores universales análogos a los detectores de llama en cromatografía de gases. Además, son fiables y no dependen del caudal. Sin embargo, son muy sensibles a los cambios de temperatura y se han de mantener a una temperatura constante en unas pocas milésimas de grado centígrado. Por otra parte, no son tan sensibles como la mayoría de los otros detectores, y por lo general no se pueden utilizar en la elución con gradiente. Otra desventaja de este tipo de detectores es que son muy sensibles a los cambios de temperatura, la cual debe ser controlada con fluctuaciones de ± 0.0001 °C. Por otra parte, no resultan adecuados para trabajar con la modalidad de elución por gradiente.

9.3.2.7. Detector de dispersión de luz.

En el detector de dispersión de luz, el efluente de la columna se pasa a un nebulizador donde se convierte en una fina niebla mediante un flujo de nitrógeno o aire. Las finas gotitas se llevan a través de un tubo de conducción a temperatura controlada, donde tiene lugar la evaporación de la fase móvil, lo que origina unas finas partículas de analito. La nube de partículas de analito pasa a través de un haz láser. Mediante un fotodiodo de silicio se detecta la radiación dispersada perpendicularmente al flujo.

Una de las mayores ventajas de este tipo de detector es que su respuesta resulta ser aproximadamente la misma para todos los solutos no volátiles. Además es notablemente más sensible que el detector de índice de refracción.

9.3.2.8. Detectores electroquímicos ^[63].

La detección electroquímica ofrece ciertas ventajas respecto a otros métodos de detección, en orden a su especificidad, sensibilidad y amplia aplicabilidad, especialmente para compuestos orgánicos. En este sentido, cualquier especie capaz de ser oxidada o reducida sobre un electrodo es susceptible de detección vía electroquímica en una variedad de matrices, como medio ambientales, farmacéuticas y químicas. Por ejemplo, fenoles, aminas, peróxidos y mercaptanos pueden detectarse por oxidación, mientras que hidrocarburos no saturados, cetonas, aldehidos y nitrocompuestos aromáticos son detectados por procesos de reducción. Las técnicas electroquímicas más utilizadas con esta finalidad son la amperometría, voltamperometría, la conductimetría y culombimetría*.

En los detectores amperométricos se aplica un determinado potencial al electrodo de trabajo y se mide la intensidad de la corriente resultante de la reacción electroquímica que ocurra en dicho electrodo. La superficie de este electrodo suele ser muy pequeña (menor de 0.5 cm^2), por lo que la electrólisis del analito es incompleta. Cuando se usan electrodos de gran área superficial, puede tener lugar una reacción cuantitativa sobre el electrodo, y entonces se tiene la detección coulombimétrica. Por su parte, la detección voltamperométrica (incluida la polarográfica) implica la aplicación de una diferencia de potencial variable al electrodo de trabajo seguida de la medida de la intensidad de la corriente resultante de la reacción electrónica.

Los detectores amperométricos consisten simplemente en un electrodo de trabajo (carbón vítreo) en la pared de la columna por donde el analito fluye a través de la superficie del electrodo, la reacción química puede ocurrir cuando el analito pierde uno o más electrones (es decir, se oxida), estos electrones se detectan como flujo actual a través del electrodo de trabajo. La corriente que atraviesa la celda electroquímica en todo momento está en función lineal del número de moléculas que son oxidadas en la superficie de la celda a determinado tiempo. La sensibilidad intrínseca es dependiente de dos factores principales: el potencial de la oxidación del analito y la constante de equilibrio para la adsorción de la celda. La desventaja de los detectores amperométrico es que son ineficaces debido a la limitación en la transferencia de masa, por que solo una pequeña fracción del analito total en la corriente del flujo, típicamente menos del 10 %, difunde realmente sobre la superficie en la conversión electroquímica de las especies en el electrodo.

En el caso de los detectores coulombimétricos son diseñados para evitar esta limitación. En el esquema coulombimétrico, el analito atraviesa una matriz porosa (carbón típicamente poroso). Estos detectores son de dos a cinco veces más sensibles que los detectores amperométricos, con límites de detección de 2 a 3 órdenes de magnitud. Si varios detectores coulombimétricos se arreglan en serie con potenciales sistemáticamente incrementados, se genera un cromatograma de dos dimensiones. Un cromatograma con un acoplamiento con detectores electroquímicos proporciona varias ventajas estratégicas sobre una grabación de un solo canal. Primero, se puede ajustar la celda en la corriente de flujo próxima a potenciales bajos para oxidar sustancias de interferencia y para simplificar el cromatograma en los últimos canales. En segundo lugar, la polaridad de varias celdas en una serie se puede ajustar para reducir a los analitos dentro de la corriente específica de flujo. Los productos de la reducción se pueden entonces medir en estos últimos canales, esta estrategia aumenta a veces la sensibilidad.

En un arreglo multidimensional los detectores electroquímicos pueden proporcionar un diagrama de diagnóstico llamado un voltamperograma hidrodinámico. Cuando los potenciales de la oxidación de varias celdas se arreglan y emparejan a la velocidad de la corriente del flujo,

un analito se oxida a través de tres a cuatro canales, entonces se genera un voltamperograma hidrodinámico que es trazado con la fracción acumulativa de la respuesta actual total en cada uno de los canales sucesivos. Este diagrama es característico para cada analito de acuerdo al sistema especificado en los parámetros cromatográficos. En un caso particular, al interpolar el diagrama se permite la determinación de un potencial de media onda máximo correspondiente a la oxidación. Un pico cromatográfico que asocia a un pico estándar respecto al tiempo de retención de voltamperometría hidrodinámica es, asignable con un alto nivel de confianza.

Los detectores electroquímicos se han utilizado en las separaciones con cromatografía líquida de alto rendimiento por que pueden ser detectadas muchas biomoléculas, incluyendo bases anormales del ADN, polifenoles, aminoácidos artificiales y metabolitos de drogas. Los analitos más prácticos para la cromatografía líquida de alto rendimiento acoplado a detectores electroquímicos tienen ciertas características dominantes. En primer lugar, deben ser oxidables en los potenciales intermedios (200-900 mV), debajo de estos potenciales los analitos tienden a auto oxidarse, lo que se refleja en un proceso de separación rápido de la muestra. En segundo lugar, los analitos deben ser químicamente estables en el entorno biológico y a pH ácido, porque las celdas coulombiométricas son vulnerables a las soluciones altamente básicas. Los compuestos deben ser razonablemente hidrofóbicos para ser separados en columnas de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase reversa. Convenientemente, los compuestos fenólicos satisfacen todos estos criterios. La desventaja principal de la detección electroquímica es que no puede ser empleada en fases móviles de alta fuerza iónica, por que esto implicaría un componente acuoso significativo. Así, la cromatografía de la fase normal se emplea raramente cuando se utiliza detectores electroquímicos y limita la separación de ciertas especies.

9.3. Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector electroquímico, herramienta para la evaluación de la capacidad antioxidante. Cromatografía líquida de alta resolución como herramienta importante en la determinación de capacidad antioxidante de compuestos químicos, con especial atención a la capsaicina.

En recientes investigaciones se ha empleado la técnica de HPLC, acoplado a un detector coulombimétrico, de los cuales se han obtenido resultados para ácidos fenólicos, en estos casos la capacidad antioxidante o antiradical de algunos compuestos fenólicos es inversa a su potencial de respuesta máxima del detector, por ejemplo los difenoles y trifenoles tienen una alta actividad antioxidante y un bajo potencial de respuesta máxima del detector, mientras que los mono fenoles son menos activos (menos antioxidantes) y responden a un potencial más alto, especialmente si su anillo aromático no es substituido por los grupos metoxi ^{[136, 204,}

^{217]}. Cuanto más alta es su capacidad de actuar como antioxidantes primarios, cuanto más bajo es su potencial de la oxidación, puesto que este valor proporciona una estimación de la energía requerida para donar un electrón. En el caso de los flavonoides su eficacia como antioxidantes se puede explicar parcialmente por su comportamiento electroquímico, principalmente por el valor de energía baja requerida para donar un electrón. Según los resultados obtenidos con los flavones, la presencia de un segundo grupo del *o*-difenol en el anillo mejora claramente la capacidad antioxidante y la capacidad antiradical, sin embargo, una glucosilación de los 3 grupos de hidróxido dentro de los flavonoides no modifican perceptiblemente su comportamiento electroquímico, pero disminuye claramente la capacidad antioxidante o antiradical, tanto como el número de glucósidos aumenta. Esta disminución puede ser ocasionada por impedimento estérico creado por los sacáridos, para la prueba en el medio lipídico disminuya la solubilidad de estos compuestos ^[15, 21, 117].

Según el comportamiento voltamperométrico de los compuestos fenólicos determinados por cromatografía líquida de alta resolución fase inversa acoplado a una detección coulombiométrica, los ácidos y los tocoferoles fenólicos demuestran respuesta máxima del detector en los potenciales bajos (100-450 milivoltio) mientras que los flavonoides tienen dos ondas de la oxidación. El más bajo este potencial, el más alto es la eficacia antioxidante, demostrando la capacidad de ácidos fenólicos de actuar como antioxidantes primarios. Por el contrario, ninguna relación se ha establecido para los flavonoides donde diversos efectos estructurales interfieren en los parámetros. Parece que la capacidad antioxidante de los extractos de la planta se podría predecir rápidamente por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector electroquímico, solamente cuando los ácidos fenólicos sean los componentes principales del extracto. En los estudios realizados, para la determinación de capacidad antioxidante de compuestos fenólicos, empleando cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector electroquímico, se han modificado los electrodos de trabajo, un ejemplo de ello es la modificación con un polímero de ftalocianina y níquel en condiciones de inyección de flujo, para la evaluación del BHA, que sirvió como modelo de comprobación del electrodo modificado, sin embargo es aventurado asegurar que se pueda emplear como detector amperimétrico en condiciones de cromatografía líquida de alta resolución, con elución de gradiente. ^[21, 22, 117, 204, 217].

En relación con la cromatografía líquida de alto rendimiento, la mayoría de los usos implican la detección por ultravioleta. En un estudio realizado para la determinación de nueve antioxidantes fenólicos en aceite de mantequilla y una determinación simultánea de los mismos en cosméticos y preparaciones farmacéuticas, usando una elución de gradiente lineal, además de realizarse una comparación entre la electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta resolución de antioxidantes de la categoría alimenticia. En comparación a la detección electroquímica que se ha utilizado para detectar algunos antioxidantes en muestras del aceite y

de alimentos. La cromatografía líquida de alta resolución con detector electroquímico ha demostrado ser un complemento muy útil comparado con la detección ultravioleta en el análisis de las mezclas, donde se plantean los problemas de interferencia que no pueden ser resueltos con espectros ultravioleta ^[26, 117, 176, 179].

El uso de la cromatografía líquida de alta resolución en la cuantificación de los capsaicinoides y los dihidrocapsaicinoides componentes del chile que han sido estudiados para determinar las causas de su pungencia, su habilidad para hacer estornudar, como irritante de la piel, e inhibidor y promotor de sustancias P. este conjunto de sustancias, capsaicinoides y dihidrocapsaicinoides, han sido separados e identificados por cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Uno de los primeros métodos cromatográficos es el empleado por Woodbury con detectores de radiación ultravioleta y de fluorescencia, sin embargo los capsaicinoides absorben fuertemente estas radiaciones, lo que ocasiona que no se pueda diferenciar entre dos capsaicinoides distintos. Hoffman desarrolló un método que utiliza un estándar externo disponible en el comercio de estructura química similar a la de los componentes que son evaluados. El uso de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector electroquímico se ha reconocido desde 1952, ha ganado renombre nunca alcanzado por un electrodo de mercurio, ni por las celdas grandes de volumen muerto, en el caso de la cromatografía líquida de alta resolución los detectores electroquímicos proporcionan volúmenes muertos en el orden de microlitros, lo que se logra al reducir al máximo la extensión de la columna ^[15, 19.].

A partir de 1977, diversos grupos han determinado capsainoides por cromatografía de gases y cromatografía líquida de alto rendimiento. En cromatografía de gases el se requiere que los compuestos de estudio sean lo suficientemente volátiles para la determinación, esto limita su uso. Por lo que la cromatografía líquida de alto rendimiento es ampliamente utilizada por investigadores y laboratorios comerciales. El análisis propuesto para cromatografía líquida de alto rendimiento de fase reversa no se requiere de un tratamiento especial previo de la muestra y su sensibilidad es adecuada para las concentraciones de capsainoides que se encuentran comúnmente en productos alimenticios. La mayoría de los detectores acoplados a cromatografía líquida de alta resolución descritos en la literatura han determinado con éxito a la capsaicina, nordihidrocapsaicina, y la dihidrocapsaicina y en ninguno se considera apremios de tiempo o dinero, pues cumplen con el objetivo de determinar los tres capsainoides más importantes en chiles disponibles a un costo razonable. Puesto que en los estudios de determinación de capsaicinoides el contenido es un requisito obligatorio, se han usado varias técnicas analíticas y diversos métodos para su cuantificación, cromatografía de papel, cromatografía de capa fina y cromatografía líquida de alto rendimiento, como técnicas de separación y espectroscopia del ultravioleta visible como técnicas de la detección. El uso de la cromatografía líquida de alta resolución en la cuantificación de diferentes capsaicinoides y

dihidrocapsaicinoides, así como las causas de su pungencia, su habilidad para hacer estornudar, como irritante en la piel, e inhibidor y promotor de sustancias P [26, 70, 95, 99].

Se han descrito de manera muy ligera, las principales características de la cromatografía líquida de alta resolución con diferentes detectores. Recientemente, se ha propuesto como herramienta en el estudio de la capacidad antioxidante de vinos, frutos, vegetales, de interés en este estudio la capsaicina. La detección electroquímica es conocida por su capacidad para detectar cantidades a niveles de trazas de compuestos en matrices complejas debido a su excelente sensibilidad y selectividad. A diferencia de lo que ocurre en otros ensayos que mide la capacidad antioxidante, las reacciones electroquímicas ocurren en la superficie del electrodo, se utilizan con mayor eficiencia en el análisis de una muestra que se confina a una película fina de electrólito soporte adyacente al electrodo. Comparada con otras técnicas electroquímicas similares como polarografía, es insignificante la fracción de la muestra que contribuye a la información que se obtiene de los fenoles, moléculas que pueden ser oxidadas electroquímicamente, lo que sugiere que la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector electroquímico proporciona datos importantes para los análisis cuantitativos a bajos niveles [21, 22, 117].

El grado de capsaicinoides presentes en las muestras puede ser resuelto por análisis instrumental o métodos sensoriales. En los artículos publicados al respecto los métodos sensoriales son empleados para determinar el picor de los chiles y los métodos instrumentales para determinar la cantidad de capsaicinoides. Los problemas que presentan estos métodos son largo tiempo de extracción, baja reproducibilidad y dificultad en la preparación de la muestra. En cromatografía líquida de alta resolución la recuperación de la capsaicina y del dihidrocapsaicina son 90 y 92 %, respectivamente, capsicina (21.88-53.05 mg/100 g) y dihidrocapsaicina (11.53-40.63 mg/100 g). En cromatografía líquida de alta resolución los capsaicinoides pasan por una columna de longitud acorde al tamaño de la cadena alifática lateral en un sistema agua/metanol, el cual ofreció las mejores condiciones para la separación de los capsaicinoides. Sin embargo solo se han identificado los capsaicinoides principales presentes en los chiles jalapeño y habanero Fig. 9.3 y 9.4. Se han estudiado con cromatografía líquida de alta resolución de diferentes chiles, en la separación de sus componentes se ha obtenido que los capsaicinoides que se encuentran en mayor proporción son la capsaicina y la dihidrocapsaicina, figura 9.3, donde se observa que en las primeras fracciones se encuentra la capsaicina en un tiempo de retención de 4.837 min y la dihidrocapsaicina aparece en las subsecuentes fracciones en un tiempo de retención de 6.62 min, en el caso de chile jalapeño, sin embargo no existe una variación importante en tiempo de retención para cada componente en el chile habanero, Fig. 9.4. La separación por cromatografía líquida de alta resolución se ha optimizado el tiempos de retención, composición de la fase móvil (ácido fórmico del acetonitrilo/0.5 % en H₂O), longitud de la columna y los

valores de capacidad del embalaje de columna (k). La identificación individual de cada capsaicinoides se basa en tiempos de retención y picos individuales de cada espectro. La cuantificación se basa en la respuesta ultravioleta a 280 nm en cromatografía líquida de alta resolución y en la recuperación de las muestras. En cromatografía líquida de alta resolución cuyo límite de detección de aproximadamente 15-30 ng, se ha utilizado con éxito para cuantificar niveles de capsaicinoides en diferentes partes del chile como pericarpio, placenta, semillas, tapa, centro, y las partes bajas de chiles enteros Fig. 9.5, en 17 especies de chiles y en 23 alimentos que contiene algún tipo de picante. Los componentes de la mezcla natural de capsaicinoides se han separados por cromatografía líquida de alta resolución, y se encontró que las primeras fracciones son los capsaicinoides que se caracterizan por la presencia de un doble enlace en la cadena acil, y en las demás fracciones se encuentran componentes que no pertenecen al grupo de los capsaicinoides los cuales sólo tienen enlaces sencillos en la cadena acil. La pureza de cada una de las fracciones es cuantificada por medio de espectroscopía ultravioleta visible. Se han estudiado diferentes chiles con cromatografía líquida de alta resolución, la separación de sus componentes se ha obtenido que los capsaicinoides que se encuentran en mayor proporción son la capsaicina y la di-hidrocapsaicina, además de destacar que en los chiles la mayor cantidad de capsaicina se encuentra en la placenta ^[1171, 172, 183,220].

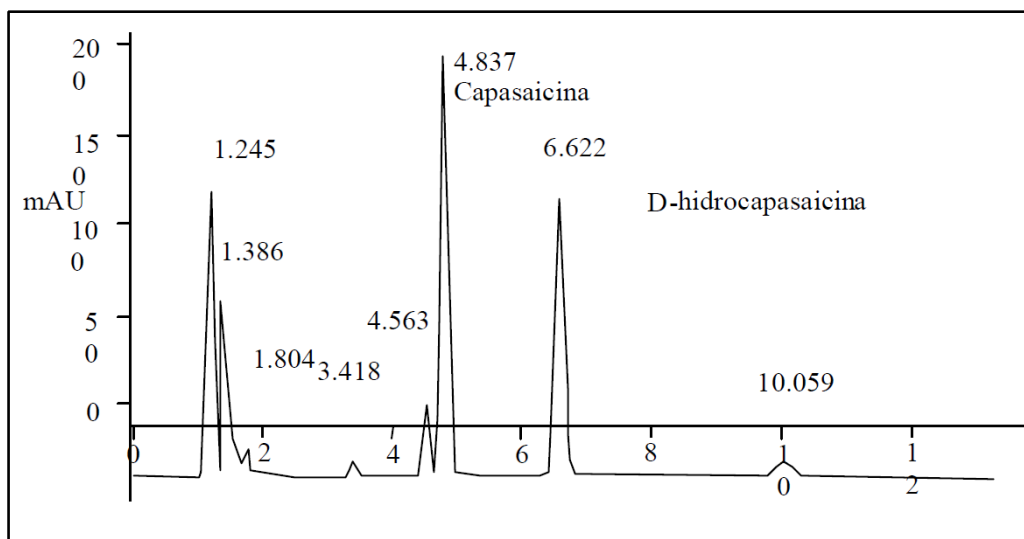


Fig. 9.3 Cromatograma del chile jalapeño, obtenido por cromatografía líquida de alta resolución acomplada a un detector de radicación ultravioleta

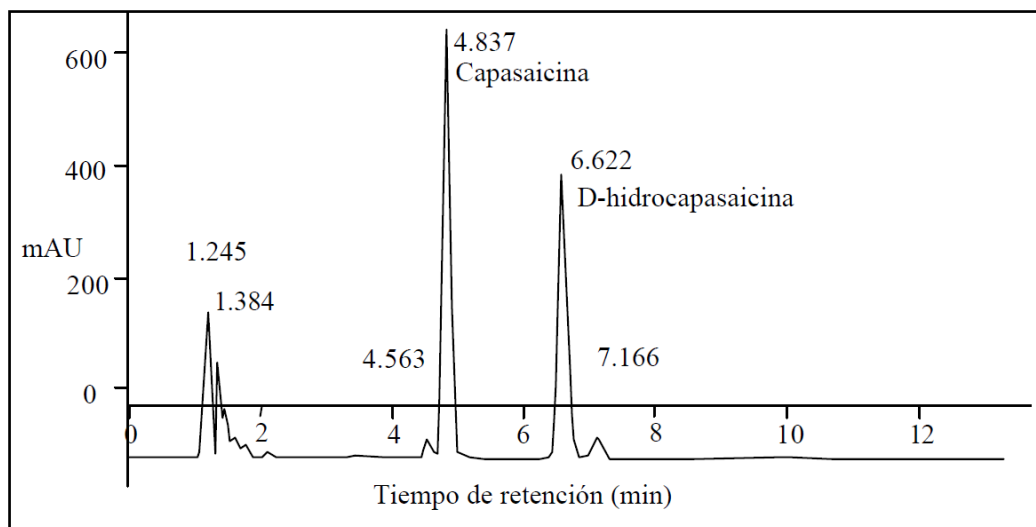


Fig. 9.4 Cromatograma del chile habanero, obtenido por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de radiación ultravioleta

En los estudios referentes a derivados capsaicinoides y capsinoides, la literatura incluye determinaciones cromatográficas con un detector electroquímico que se han empleado en la separación y cuantificación de estos compuestos, principalmente en la proporción de la capsaicina dentro del mismo fruto. Se han estudiado extractos de la placenta, las semillas y Septum, en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector electroquímico, con un sistema de tres electrodos, electrodo de trabajo de pasta de carbono, electrodo de referencia Ag/AgCl y Pt como electrodo auxiliar, en electrolito soporte a pH controlado, pH= 4. Del cual se obtiene un cromatograma típico de capsaicina que se muestra en la figura 9.6 A, donde se observa la señal de la capsaicina a 20.5 min y una señal en 18.8 min correspondiente a la dihidrocapsaicina, con detectores electroquímicos se observa en las primeras fracciones a la dihidrocapsaicina, después a la capsaicina ambas regularmente vienen juntas debido a que su estructura es muy parecida, en la gráfica se muestra una señal bien definida, simétrica, crece linealmente en función de la concentración, es decir, la capsaicina se encuentra en mayor proporción, comparada con otros capsaicinoides Fig 9.6 B. Este análisis da pauta a estudios de contenido de capsaicina en productos comerciales, lo que proporciona interés adicional a la técnica a nivel industrial ^[136, 176].

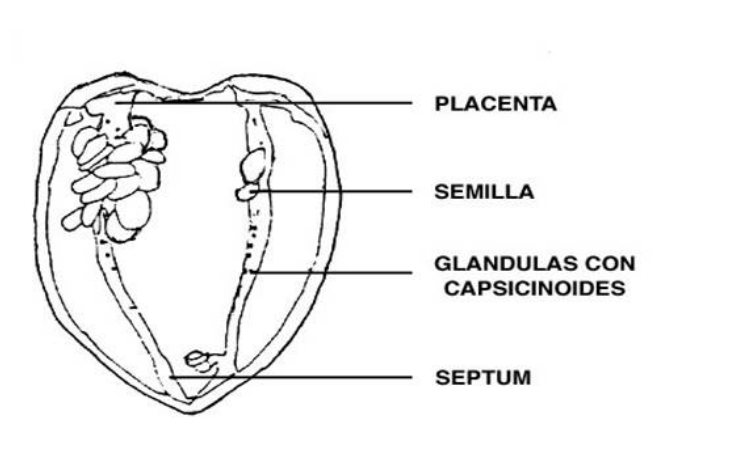


Fig 9.5 Estructura externa de un chile, la proporción de capsaicina y dihidrocapsaicina varían dependiendo de la parte del chile a estudiar.

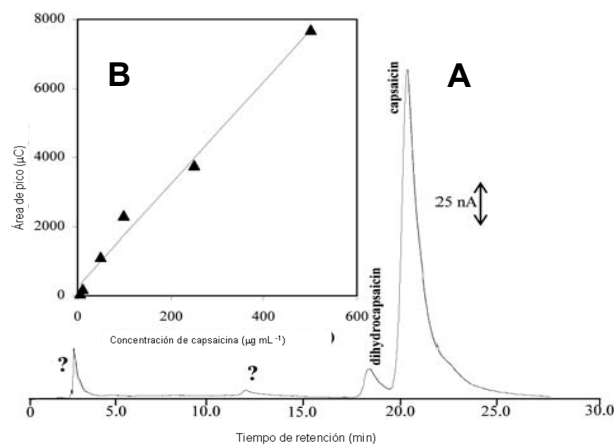


Fig. 9. 6 Cromatograma de capsaicina (100 mg mL⁻¹) obtenido por cromatografía líquida de alta resolución acomplada a un detector electroquímico

Otras investigaciones han centrado su estudio en derivados no pungentes los capsinoides aislados de un chile dulce, el cual ofrece ventajas similares a sus análogos capsicinoides con un sabor más suave, se han cuantificado usando una variedad de metodologías analíticas como cromatografía de gases con detectores de captura de electrón o de espectrometría total, también cromatografía líquida de alto rendimiento con un detector de arreglo de fotodiodo o con espectrómetro de masas, la cromatografía de capa delgada se ha utilizado para separar e identificar con éxito capsicinoides. La espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la espectroscopía infrarroja fueron utilizadas para aclarar las estructuras

del capsiato, dihidrocapsiato, y nordihidrocapsiato. La información que se obtiene de la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector electroquímico ha sido empleada en las investigaciones sobre la capacidad antioxidante de los capsinoides, por que es capaz de analizar antioxidantes primarios que sean electro activos. Además de evaluar la capacidad antioxidante de matrices complejas, extractos de plantas, en lo que se ha estudiado la estructura de los compuestos fenólicos, su capacidad antioxidante y su comportamiento electroquímico. La capacidad antioxidante determinada por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector electroquímico se basa en la aceleración de la auto oxidación del metil linoleato a anhidro dodecano, utilizando condiciones fuertes de oxidación [179, 204, 217].

Diversos métodos, incluyendo métodos organolépticos (Prueba organoléptica) de Scoville, espectrofotometría, cromatografía de capa delgada, cromatografía líquida de alto rendimiento y cromatografía de gas, para la cuantificación de capsaicinoides de los chiles y de las oleoresinas. El método organoléptico Scoville, ha sido sustituido por la cromatografía líquida de alto rendimiento en la determinación de los componentes que dan las características picantes de los chiles por que se considera el más confiable y más exacto para determinar la cantidad de capsaicina y la acritud en una muestra de chiles. En los últimos años, la cromatografía líquida de alto rendimiento fase inversa se ha convertido en el método frecuentemente usado para el análisis de capsaicinoides debido a su rapidez y confiabilidad, utiliza una columna convencional C-18 para separar los tres capsaicinoides principales presentes en los chiles picantes (capsaicina, dihydrocapsaicina y nordihydrocapsaicina), así como el grado de picor en unidades de scoville (SHU del inglés *Scoville heat units*) que corresponden a la concentración de capsaicinoides calculada. Además se ha analizado el contenido de capsaicinoides en los diferentes tejidos del fruto de *Capsicum annum*, así como la separación de los principales componentes capasaicina, dihidrocapasaicina y norhidrocapsaicina a los cuales les confieren el grado de picor a los diferentes chiles [16, 95, 99].

Se ha encontrado que el contenido de capasaicinoides y el picor están relacionados con el nivel de maduración de este cultivo, se puede esperar en un alto nivel si solamente se analizan los tejidos placentarios, aquí es donde se produce la capsaicina, mientras que en las glándulas de la placenta, el pericarpio y las semillas, que forman el bulto más grande de la frutas enteras contienen la cantidad mínima de capsaicina. Por otra parte, puesto que todos los cultivos contienen más de 0.1 % capsaicinas y sus niveles del picor son mayores de 3000-4500 SHU, pueden servir como fuente potencial de capsaicina.

10.- Conclusiones

La diversidad de compuestos de origen natural con propiedades antioxidantes ha impulsado el desarrollo, renovación e invención de ensayos que permitan evaluar su capacidad antioxidante de manera directa, uno de los más importantes que está en desarrollo y que proporciona información eficiente y a bajo costo son las técnicas electroquímicas.

Las técnicas electroquímicas nos permite determinar varios compuestos biológico importantes y también minimiza el consumo de la muestra con suficiente sensibilidad y con límites de detección bajos.

La voltamperometría cíclica también se ha utilizado para la evaluación de la capacidad antioxidante de varios polifenoles y de sus mezclas.

Los antioxidantes de poco peso molecular son un grupo de moléculas absolutamente pequeñas que proporcionan electrones que protegen otras moléculas contra la oxidación.

El comportamiento del antioxidante observado para la capsaicina es debido sobre a la presencia del grupo fenol en la molécula y no al grupo amida. En el caso de la dihidrocapasaicina, la capacidad antioxidante es menor a la de la capsaicina por la ausencia del doble enlace en la cadena alifática.

La capacidad antioxidante de los polifenoles es consecuencia de su capacidad para donar H^+ y estabilizar el radical.

Existe una relación entre la capacidad antioxidante y el potencial máximo de oxidación en voltamperometría cíclica. A mayor número de grupos hidroxilo como sustituyentes en el anillo aromático, menor es el potencial de oxidación y por lo tanto mayor su capacidad antioxidante.

Existe un amplio campo de estudio referente al descubrimiento de nuevas sustancias con propiedades antioxidantes, así como amplio es el camino de estandarización de ensayo que permitan realizar experimentos, de los cuales obtengamos información comparable.

11 Bibliografía.

1. Aboul-Enein H. Y., Kruk I. Scavenging effects of phenolic compounds on reactive oxygen species. *Biopolymers*. 2007. 86 (3). 222-230.
2. Abreu P., Matthew S. Anti-inflammatory and antioxidant activity of a medicinal tincture from *Pedilanthus tithymaloides*. *Life Sciences*. 2006. 78. 1578 – 1585.
3. Ahuja K. D. K. Dale A. Effects of capsaicin, dihydrocapsaicin, and curcumin on copper-induced oxidation of human serum lipids. *J. Agric. Food Chem.* 2006. 54. 6436-6439.
4. Alamdari D. H., Ordoudi S. A. Comparison of prooxidant-antioxidant balance method with Crocin method for determination of total prooxidant-antioxidant capacity. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2009. 12(2). 93-99.
5. Alasalvar C., Karamacä M. Antioxidant and antiradical activities in extracts of hazelnut kernel (*Corylus avellana L.*) and hazelnut green leafy cover. *J. Agric. Food Chem.* 2006. 54. 4826-4832.
6. Alonso A. M., Dominguez C. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *J. Agric. Food Chem.* 2002. 50. 3112-3115.
7. Álvarez E. Jiménez O. J. Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del genero vismia (*guttiferae*). *VITAE*. 2008. 15(1). 165-172.
8. Antolovich M. Prenzler P. D. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 2002. 127. Pp. 183–198.
9. Apak R., Guclu K. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *Int J Food Sci Nutr.* 2006. 57(5/6). 292-304.
10. Apak R. Güçlü K. Demirata B. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*. 2007. 12. 1496-1547.
11. Araki T. Antioxidative Properties of probucol estimated by the reactivity with superoxide and by electrochemical oxidation. *Chem. Pharm. Bull.* 2001. 49(8). 943-947.

12. Aruoma O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*. 2003. 9(20). 523–524.
13. Asghar M. Khan I. Evaluation of antioxidant activity using an improved DMPD radical cation decolorization assay. *Acta Chim. Slov.* 2007. 54. 295–300.
14. Banerjee A. K., Mandal A. Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Mol Cell Biochem.* 2003. 253. 307–312.
15. Barbero G.F., Liazid A. Fast determination of capsaicinoids from peppers by high-performance liquid chromatography using a reversed phase monolithic column. *Food Chemistry*. 2008. 107(3). 1276-1282.
16. Barbero G. F., Palma M. Pressurized liquid extraction of capsaicinoids from peppers. *J. Agric. Food Chem.* 2006. 54. 3231-3236.
17. Bard A. J. Faulkner L.R. Electrochemical methods. Fundamentals and applications. Second edition. United States of America, John Wiley & Sons, Inc, 2001. 850.
18. Barros L. Falcão S. Antioxidant activity of *Agaricus sp.* mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry*. 2008.111. 61–66.
19. Batchelor J. D. and Jones B. T. Determination of the Scoville heat value for hot sauces and chillies: An HPLC experiment. *J Chem Educ.* 2000. 77(2). 266-267.
20. Beer D. D., Joubert E. Antioxidant activity of south African red and white cultivar wines: free radical scavenging. *J. Agric. Food Chem.* 2003. 51. 902-909.
21. Bedner M. MacCrehan W. and George R. Helz. Improving the recoveries of unstable N-chloramines determined by liquid chromatography–postcolumn electrochemical detection. *J Chromatogr Sci.* 2002. 40 (8). 447-456.
22. Begoña B. M. Rosa M. A. and Jimenez R. M. Simultaneous determination of torasemide and its major metabolite M5 in human urine by high-performance liquid Chromatography-electrochemical detection. *J Chromatogr Sci.* 2001. 39 (11). 491-496.
23. Benítez D. E. Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2006. 25(2). 12-19.

24. Benzie I. F. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996. 239. 70–76.
25. Benzie I.F. and Szteo Y.F. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food. Chem.* 1999.47. 633-636.
26. Betts T. A. Pungency Quantitation of hot pepper sauces using HPLC. *J. Chem. Educ.* 1999. 76 (2) . 240-244.
27. Blasco A. J. "Electrochemical Index" as a screening method to determine "total polyphenolics" in foods: A proposal. *Anal Chim Acta.* 2005. 539. 237–244.
28. Blokhina O. Virolainen E. Antioxidant, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Annals of Botany.* 2003. 91. 179-194.
29. Bondet V. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH^{*} free radical method. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 1997. 30. 609-615.
30. Born M. Carrupt P.A. Electrochemical behavior and antioxidant activity of some natural polyphenols. *Helv Chim Acta.* 1996. 79. 1147-1158.
31. Buratti S. Pellegrini N. Rapid electrochemical method for the evaluation of the antioxidant power of some lipophilic food extracts. *J. Agric. Food Chem.* 2001.49. 5136-5141.
32. Büyükokuro M. In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacol Res.* 2001.44 (6). 490- 494.
33. Calucci L. Pinzino C. Effects of γ -Irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices. *J. Agric. Food Chem.* 2003. 5. 927-934.
34. Cázares-Sánchez E. Capsaicinoids and preference of use in different morphotypes of chili peppers (*Capsicum annum* L.) of east-central Yucatán. *Agrociencia.* 2005. 39. 627-638.
35. Chambers J.Q. Electrochemistry in the general chemistry curriculum. *J. Chem. Educ.* Fundamentals of electrochemistry. 1983. 60 (4). 259- 262.
36. Charlot, G. Delahay, P. y Laitinen, H. Reacciones electroquímicas. 1959. Vol 1. 149-155.

37. Chaudière J. and Ferreri-Iliou R. Intracellular antioxidant: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol.* 1999. 37. 949-962.
38. Chen J., L. Gorton and B. Akesson. Electrochemical studies on antioxidants in bovine milk. *Anal Chim Acta.* 2002. 474 (1-2).137-146.
39. Cheng J. and Jandik P. New type of microfabricated carbon electrodes for high-performance liquid chromatography—Amperometric detection of fat-soluble vitamins and antioxidants. *J. Chromatogr. A.* 2008. 1198-1199. 148-153.
40. Chevion S., Berry E. Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry. *Free Radical Biology & Medicine.* 1997. 22(3). 411-421.
41. Chevion S. The antioxidant properties of thiocetic acid: Characterization by cyclic voltammetry. *Biochem Mol Biol Int.* 1997. 41(2).317-327.
42. Chevion S. Roberts M. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Radicals biology & Medicine.* 2000. 28(6). 860-870.
43. Corbett J.T. The scopoletin assay for hydrogen peroxide. A review and better method. *J Biochem Biophys Meth.* 1989. 18. Pp. 297-308.
44. Cosio M.S. Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. *Food Chemistry.* 2006. 97. 725–731.
45. Dairam A. Fogel R. Antioxidant and Iron-Binding Properties of Curcumin, Capsaicin, and S-Allylcysteine Reduce Oxidative Stress in Rat Brain Homogenate. *J. Agric. Food Chem.* 2008. 56. 3350–3356.
46. Damaskin B.B. Petri. O. A. Fundamentos de electroquímica teórica. 1 era Edición, en español. Moscú, Mir. 1990. 142.
47. Davis C. B., Markey C. E. Determination of capsaicinoids in habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data. *J. Agric. Food Chem.* 2007. 55. 5925-5933.
48. Deepa N., Kaur C. Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annum* L.) genotypes during maturity. *LWT.* 2007. 40. 121–129.

49. De Lima A.A. Electrochemical and antioxidant properties of anthocyanins and anthocyanidins. *Croat. Chem. Acta.* 2007. 80 (1). 29-34.
50. Díaz B. Colmenero M.D. Capacidad antioxidante de la melatonina: su papel defensivo contra afecciones relacionadas con la edad. *Medicina Clínica.* 1998. 110 (17). 668-676.
51. Díaz J., Pomar F. Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annum* L. *Phytochemistry Reviews.* 2004. 3. 141–157.
52. Dinis T., Madeira V. Action of phenolic derivatives (Acetaminophen, Salicylate, and 5-Aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy Radical Scavengers. *Arch Biochem Biophys.* 1994. 315(1). 161-169.
53. Diopan V., Babula P. Electrochemical and spectrometric study of antioxidant activity of *pomiferin*, *isopomiferin*, *osajin* and *catalposide*. *J Pharmaceut Biomed Anal.* 2008. 48. 127–133.
54. Dragović-Uzelac V. Levaj B. Total phenolics and antioxidant capacity assays of selected fruits. *Agric. Conspec. Sci.* 2007. 72(4). 279- 284.
55. Eaton S.S. Eaton G. R. Biomedical EPR- Part A: Free radicals, metals, medicine, and physiology. United States of America, Kluwer Academic Publishers, 2005. 536.
56. EE G. C. L., Daud S. Xanthonones from *Garcinia mangostana* (Guttiferae). *Nat Prod Res* 2006. 20 (12). 1067–1073.
57. Elvir Mairena J. R. Radicales libres, alcoholismo y daño hepático. *Revista medica hondureña.* 1994. 62. 76-82.
58. Espinoza M. Olea-Azar C. Determination of reactions between free radicals and selected Chilean wines and transition metals by ESR and UV-vis technique. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2008. 71(5). 1638-43.
59. Estrada B., Bernal M. A. Capsaicinoids in vegetative organs of *Capsicum annum* L. in relation to fruiting. *J. Agric. Food Chem.* 2002. 50 (5). 1188-1191.
60. Evans H.D. O'Connell K.M. Cyclic voltammetry. *J Chem Educ.* 1983. 60 (4). 290-293.

61. Faulkner L.R. Understanding electrochemistry: Some distinctive concepts *J Chem Educ.* 1983. 60 (4). 262- 264.
62. Flanagan R. J. Electrochemical detection in HPLC. Analysis of drugs and poisons. R.M. Smith, Loughborough University of Technology, UK. 2005. 248.
63. Fedorowski J. LaCourse W. R. A review of post-column photochemical reaction systems coupled to electrochemical detection in HPLC. *Anal Chim Acta.* 2010.657. 1–8.
64. Fridovich I. Oxygen Toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol.* 1998. 1203–1209.
65. Fukumoto L. R. and Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2000. 48. 3597-3604.
66. Firuzi O. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “Ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *BBA.* 2005.1721. 174-184.
67. Galgani J. E., Ryan D. H. Effect of capsinoids on energy metabolism in human subjects. *Br J Nutr.* 2009. 1- 5.
68. Gannett P. M., Nagel D. L. Capsaicinoids: their separation, synthesis, and mutagenicity. *J. Org. Chem.* 1988. 53 (5). Pp. 1064-1071.
69. Garceäs-Claver A. Inheritance of capsaicin and dihydrocapsaicin, determined by HPLC-ESI/MS, in an intraspecific cross of *capsicum annum L.* *J. Agric. Food Chem.* 2007. 55. 6951-6957.
70. Ghiselli A., Serafini M.. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology & Medicine.* 2000. 29(11). 1106–1114.
71. Gilbert D.L. Colton C.A. Reactive oxygen species in biological systems: an interdisciplinary approach. United States of America, Kluwer Academic Publishers, 2002. 731.
72. Gomes A. Fernandez E. Cyclic voltammetric analysis of *2-styrylchromones*: Relationship with the antioxidant activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008. 16. 7939–7943.

73. Gomes A. Costa D. Antioxidant activity of b-blockers: An effect mediated by scavenging reactive oxygen and nitrogen species? *Bioorg Med Chem Lett.* 2006. 14. 4568–4577.
74. González- Águilar G.A. Villegas-Ochoa M.A. Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated whit UV-C. *J Food Sci.* 2007. 72(3). 197-202.
75. Gorinstein S. Park Y.-S. A comparative study of phenolic compounds and antioxidant and antiproliferative activities in frequently consumed raw vegetables. *Eur Food Res Technol.*2009. 228: 903–911.
76. Grotenhermen F. Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide. *Cannabinoids.* 2006.1(1). Pp.10-14.
77. Gülcin I. In vitro antioxidant properties of morphine. *Pharmacol Res.* 2004. 49. 59–66.
78. Gülcin I. Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propofol. *Chem. Pharm. Bull.* 2005. 53(3). 281-285.
79. Gülcin I. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne. *J Ethnopharmacol.* 2005. 101. 287-293.
80. Gülcin I. Antioxidant and antiradical activities of *L-carnitine*. *Life Sci.* 2006. 78. 803- 811.
81. Gülcin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology.* 2006. 217. 213–220.
82. Gunckel S. Antioxidant activity of gallates: an electrochemical study in aqueous media. *Chem Biol Interact.* 1998.114. 45–59.
83. Hagerman A. E. High Molecular Weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 1998. 46. 1887-1892.
84. Halliwell B. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984. 1-14.
85. Halliwell B. The Deoxyribose method: A simple “Test-Tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem.* 1987. 165. 215-219.

86. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *The FASEB Journal*. 1987. (1). 358-364.
87. Halliwell B., Aeschbacht R. The Characterization of antioxidants. *Fd. Chem. Toxc.* 1995. 33(7). 601-617.
88. Halliwell B., Gutteridge M. C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology & Medicine*. 1995. 18 (1). 125-126.
89. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Anna Rev. Nutr.* 1996. 16:33(50). 34- 53.
90. Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet*. 2000. 355. 1179-1180.
91. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. 2006. 141. 312-322.
92. Hanuštiak P. Electrochemical behaviour of flavonoids on a surface of a carbon paste electrode. *Biomed. Papers*. 2005. 149 (1). 44-47.
93. He JB. Wang Y. Study of the adsorption and oxidation of antioxidant rutin by cyclic voltammetry–voltabsorptometry. *Bioelectrochemistry*. 2007. 71. 157–163.
94. Henderson, D. E.; Slickman, A. M.; Henderson, S. K. Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of capsaicin on the formation of lipid hydroperoxides of linoleic acid: a comparative study against BHT and melatonin. *J. Agric. Food Chem.* 1999. 47. 2563-2570.
95. Hensley K. and Williamson K.S. HPLC-electrochemical detection of tocopherol products as Indicators of reactive nitrogen intermediates. *Methods in enzymology*. 2005. 396. 171-182.
96. Hernández Sampieri R. Metodología de la investigación. Primera edición. Mc-Graw-Hill Interamericana de México, S.A. de C.V. 1991. 128.
97. Hirayama O. Evaluation of hydroxyl radical- scavenging ability by chemiluminescence. *Anal Biochem*. 1997. 251. 297-299.

98. Hoffman P. G. Separation and quantitation of red pepper major heat principles by reverse phase high-pressure liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 1983.31. 1326-1330.
99. Hotta H. Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants. *BBA.* 2001. 1526. 159-167.
100. Hotta H. Ueda M. Mechanistic study of the oxidation of caffeic acid by digital simulation of cyclic voltammograms. *Anal Biochem.* 2002. 303. 66-72.
101. Howard L. Nonivamide, a constituent of capsicum oleoresin. *J. Nat. Prod.* 1996. 59. 425-426.
102. Howard L. R. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* Species) as influenced by maturity. *J. Agric. Food Chem.* 2000. 48 (5). 1713-1720.
103. Hsu C.-L. and Yen G.-C. Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J. Agric. Food Chem.* 2007. 55. 1730-1736.
104. Hu Y.L. A simple electrochemical method for the determination of hydroxyl free radicals without separation process. *Talanta.* 2008. 74. 760- 765.
105. Huang D. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005. 53 (6). 1841-1856.
106. İmer F. Aldemir E. The protective effect of amino acids on the copper (ii) -catalyzed autoxidation of ascorbic acid. *Journal of Food and Drug Analysis.* 2008.16(6). 46-53.
107. James Q. Chambers. Electrochemistry in the general chemistry curriculum. *Fundamentals of Electrochemistry.* 1983. 60 (4). 259-262.
108. Jefferson A. Isolation of g-mangostin from *garcinia mangostana*, and preparation of the natural mangostin by selective demethylation. *J. Chem.* 1970. 23. 2539-43.
109. Jung Hyun-ah. Antioxidant Xanthenes from the Pericarp of *Garcinia mangostana* (*Mangosteen*). *J. Agric. Food Chem.* 2006. 54. 2077-2082.

110. Kachoosangi R. T., Wildgoose G. G. Carbon nanotube-based electrochemical sensors for quantifying the 'heat' of chilli peppers: the adsorptive stripping voltammetric determination of capsaicin. *Analyst*. 2008. 133. 888–895.
111. Kahl R. Methodology for studying antioxidant activity and mechanisms of action of antioxidants. *Fd Chem. Toxic*. 1986. 24(10/11). 1007-1014.
112. Khan A.U. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction (superoxide dismutase / peroxide cleavage/electron transfer). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. 91. 12365-12367.
113. Katritzky A. R., Xu Y.J. Model compounds of caged capsaicin: design, synthesis, and photoreactivity. *J. Org. Chem*. 2003. 68. 9100-9104.
114. Kikuchi A. and Kitamura K. Simple and rapid carotene bleaching test for the detection of lipoxygenase isozymes in soybean seeds. *Japan. J. Breed*. 1987. 37. 10-16.
115. Kilmartin P. A., Zou H. A Cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J. Agric. Food Chem*. 2001. 49.1957-1965.
116. Kissinger P. T. Felice L. J. Electrochemical detection of selected organic components in the eluate from high-performance liquid-chromatography. *Clin. Chem*. 1974. 20(8). 992-997.
117. Kogure K., Goto S. Mechanism of potent antiperoxidative effect of capsaicin. *BBA*. 2002. 1573. 84– 92.
118. Kohen R. and Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 2002. 30(6). 620–650.
119. Korel F. Ground red peppers: capsaicinoids content, Scoville scores, and discrimination by an electronic nose. *J. Agric. Food Chem*. 2002. 50. 3257-3261.
120. Kozukue N. Analysis of eight capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by high performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem*. 2005. 53. 9172-9181.

121. Kulisic T. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. 2004. 85. 633–640.
122. Kumar S. Narayanan S. Mechanically immobilized nickel aquapentacyanoferrate modified electrode as an amperometric sensor for the determination of BHA. *Talanta*. 2008. 76. 54–59.
123. Kuskoski E. M. Asuero A. G. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*. 2005. 25(4). 726-732.
124. Lazar J., Braun D.C. Kinetics of penetration influence the apparent potency of vanilloids on TRPV1. *Mol Pharmacol*. 2006. 69. 1166–1173.
125. Lee K. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem*. 2003. 51. 7292-7295.
126. Lee Y. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*capsicum annuum*) cultivars. *J Food Sci*. 1995. 60 (3). 473-476.
127. Leete E. and Louden M. C. L. Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum frutescens*. *J. Am. Chem. Soc*. 1968. 90 (24). 6837-6841.
128. Leeuwenburgh C. and Heinecke J. W. Oxidative stress and antioxidants in exercise. current medicinal chemistry. 2001.8. 829-838.
129. Legin I G. Ya. Capsaicin and its analogs: Properties, preparation and applications (A Review). *Pharmaceut Chem J*. 1996. 30(I). 54-61.
130. Lemanska k., Szymusiak h. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology & Medicine*. 2001. 31 (7). 869–881.
131. Li L. Chen C. A fluorometric assay to determine antioxidant activity of both hydrophilic and lipophilic components in plant foods. *J Nutr Biochem*. 2009.20. 219–226.
132. Lloyd R.V. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free radical biology & medicine*. 1997. 22(5). 885-888.

133. López G. Chilli: La especial del nuevo mundo. *Ciencias*. 2003. 69. 66-75.
134. Lozano MC. Iglesias B. Variación de la peroxidación lipídica según la composición de ácidos grasos de Microsomomas hepáticos de aves. *Analecta Veterinaria*. 2006. 25 (2). 5-10.
135. Lunn G. HPLC Methods for recently approved pharmaceuticals. John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved. Published by John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. 2005. 737.
136. Mabbott G.A. An introduction to cyclic voltammetry. *J Chem Educ*. 1983. 60 (9). 697-701.
137. Magalhaes L. M., Segundo M. A.. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta*. 2008. 613. 1–19.
138. Mahabusarakam W. Inhibition of lipoprotein oxidation by prenylated xanthenes derived from mangostin. *Free Rad. Res*. 2000. 33. 643-659.
139. Malavolta L. Application of electron paramagnetic resonance spectroscopy for validation of the novel (AN+DN) solvent polarity scale. *Int. J. Mol. Sci*. 2008. 9. 1321-1332.
140. Mannino S. Brenna O. A new method for the evaluation of the 'antioxidant power' of wines. *Electroanalysis*. 1998. 10(13). 908-912.
141. New York. Nova Biomedical Books. 311.
142. Martínez-Flórez S., González-Gallego J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp*. 2002. XVII (6). 271-278.
143. Mastelic J. Jerkovic I. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *J. Agric. Food Chem*. 2008. 56(11). 3989–3996.
144. Materska M. and Perucka I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*capsicum annuum l.*). *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53 (5). 1750–1756.

145. Mathews, C. Bioquímica, 3^{ra} Edición en español. 2002. Editorial Addison Wesley. 618-620.
146. McMaster M.C. HPLC A Practical User's Guide. Second Edition. Wiley-Interscience a John Wiley & Sons, Inc., Publication. New Jersey. 2007. 239.
147. Mermelstein N. Determining antioxidant activity. *Food Technol.* 2008. 11. 63-68.
148. Monroy- Vazquez A. Totosaús A. Antioxidantes I. Chile ancho (*Capsicum annum L. grossum sendt.*) y romero (*Rosmarinus officinalis L.*) como fuentes naturales de antioxidantes. *Ciencia y Tecnología, Investigación universitaria multidisciplinaria.* 2007. 6(6). 112-117.
149. Montoya G. Londoño J. Monoterpenos aromáticos timol y carvacrol: Aproximaciones de su posible papel en procesos claves de la patología cardiovascular. *Scientia et Technica.* 2007. XIII (33). 27-33.
150. Moon J.-K. Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* 2009. 57 (5). 1655-1666.
151. Muedas G. Evaluación electroquímica de la actividad antioxidante del extracto alcohólico de la bauhinia guianensis var. kuntiana aubl. *Rev Soc Quím Perú.* 2008. 74 (4). 233-246.
152. Muñoz-Cuevas H., Cruz-Paz M. Propofol ayer y hoy. *Revista Mexicana de Anestesiología.* 2005. 28(3). 148-158.
153. Narasimha Prasad B. C., Kumar V. Characterization of capsaicin synthase and identification of its gene (*csy1*) for pungency factor capsaicin in pepper (*Capsicum sp.*). *PNAS.* 2006 .103 (36).13315–13320.
154. Nelson E. K. Capsaicin, the pungent principle of capsicum, and the detection of capsicum. *J Ind Eng Chem.* 1910. 3 (2). 419-421.
155. Nelson E. K. And Dawson I. E. The constitution of capsaicin, the pungent principle of capsicum I. *J Ind Eng Chem.* 1919(11). 1115-1121.

156. Nicholson R. S. and Shain I. Theory of stationary electrode polarography: single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. *Analytical chemistry*. 1964. 36(4). 706- 723.
157. Nordberg J. and Arnér E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*. 2001. 31(11). 1287–1312.
158. Obame L. C. Edou P. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oil of *Dacryodes edulis* (G. Don) H. J. Lam from Gabon. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2008. 2. 148-152.
159. Ochi T., Takaishi Y. Antioxidant activity of a new capsaicin derivative from *capsicum annum*. *J. Nat. Prod.* 2003. 66 (8). 1094-1096.
160. Oikawa S. Nagao E. Mechanism of oxidative DNA damage induced by capsaicin, a principal ingredient of hot chili pepper. *Free Radic Res.* 2006. 40(9). 966–973.
161. Olasehinde E. F. Application of Fenton reaction for nanomolar determination of hydrogen peroxide in seawater. *Anal Chim Acta*. 2008. 627. 270–276.
162. Osman H. Rahim A. Antioxidant activity and phenolic content of *paederia foetida* and *syzygium aqueum*. *Molecules*. 2009. 14. 970-978.
163. Özyürek M. Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation. *Anal Chim Acta*. 2008. 616. 196–206.
164. Padilla F. C. Rincón A. M. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 2008. 58(3). 303-309.
165. Pan Y. Characterization and free radical scavenging activities of novel red pigment from *Osmanthus fragrans* seeds. *Food Chemistry*. 2009. 112. 909–913.
166. Pastene E. R. Current state of the search for plants with antioxidant activity. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2009. 8 (6). 449-45.
167. Patel R. P. Biological aspects of reactive nitrogen species. *BBA*. 1999. 1411. 385-400.

168. Patthamakanokporn O. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *J Food Compos Anal.* 2008. 21. 241–248.
169. Pázdziach-Czochra M. Spectrofluorimetric determination of hydrogen peroxide scavenging activity. *Anal Chim Acta.* 2002. 452. 177-184.
170. Peng A., Ye H. Preparative separation of capsaicin and dihydrocapsaicin from *Capsicum frutescens* by high-speed counter-current chromatography. *J. Sep. Sci.* 2009. 32. 2967- 2973.
171. Peña A. Ramírez-Maya E. Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in peppers and pepper sauces by solid phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2009. 1216. 2843-2847.
172. Peña C.B. Ospina L.F. Evaluación de la actividad scavenger frente a los radicales superóxido, peróxidos e hidroxilos por parte de algunos compuestos obtenidos de plantas medicinales colombianas. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* 1998. 27. 41-47.
173. Pérez R. M. Vargas R. Actividad antioxidante de los alcaloides de *Bocconia arborea*. Estudio sobre seis métodos de análisis. *Ars Pharmaceutica.* 2003. 44(1). 5-21.
174. Pérez Trueba G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev. Cubana Invest Biomed.* 2003. 22(1). 48-57.
175. Perucka I. and Oleszek W. Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annum* L. by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry.* 2000. 71. 287-291.
176. Peus D., Meves A. H₂O₂ Is Required For UVb-Induced EGF receptor and downstream signaling pathway activation. *Free Radical Biology & Medicine.* 1999. 27(11/12). 1197-1202.
177. Peyrat-Maillard M.N. Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection. *Talanta.* 2000. 51. 709-716.
178. Pino J., González M. Characterization of total capsaicinoids, colour and volatile compounds of Habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jack.) cultivars grown in Yucatan. *Food Chemistry.* 2007. 104. 1682–1686.

-
-
179. Pingarrón J.M. Química electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones. Primera edición. Editorial Síntesis. 1999. 377.
180. Plambeck J.A. Electroanalytical chemistry. Basic principles and applications. John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved. Published by John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.1982. 404.
181. Pohanka M. Ferric reducing antioxidant power and square wave voltammetry for assay of low molecular weight antioxidants in blood plasma: Performance and comparison of methods. *Sensors*. 2009.9. 9094-9103.
182. Pomar F., Bernal M. A. Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase. *Phytochemistry Rev.* 1997. 46(8). 1313-1317.
183. Prior R. L. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999. 27(11/12). 1173-1181.
184. Prior R. I., Wu X. and Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005. 53. 4290-4302.
185. Psotová J. Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomed. Papers*. 2003. 147(2). 147–153.
186. Psotová J. Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltammetry: two case reports. *Biomed. Papers*. 2001. 145(2). 81–83.
187. Prakash A. Rigelhof F. Antioxidant activity. *Analytica Progress*. 2001. 19(2). 1-6.
188. Pussard E. Guigueno N. Validation of HPLC-amperometric detection to measure serotonin in plasma, platelets, whole blood, and urine. *Clinical Chemistiy*. 1996. 42(7). 1086-1091.
189. Raggi M. A. Determination of melatonin in galenic preparations by LC and voltammetry. *J Pharmaceut Biomed Anal*. 2002. 29. 283–289.

190. Rattanachaikunsopon P. In vitro study of synergistic antimicrobial effect of carvacrol and cymene on drug resistant *Salmonella typhi*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2009. 3(12). 978-980.
191. Redovniković I. R. Polyphenolic content and composition and antioxidative activity of different cocoa liquors. *Czech J. Food Sci.* 2009. 27(5). 330–337.
192. Reis N. Métodos Eletroquímicos usados para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. *Lat. Am. J. Pharm.* 2009. 28 (6). 949-53.
193. Reyes D. Castillo E. Capsaicin hydrolysis by candida antarctica lipase. *Biotechnology Letters.* 2000. 22. 1811–1814.
194. Riber J. De la Fuente C. Electrochemical study of antioxidants at a polypyrrole electrode modified by a nickel phthalocyanine complex. Application to their HPLC separation and to their FIA system detections. *Talanta.* 2000. 52 (2). 241-252.
195. Rice Evans A. Miller J. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science.* 1997. 2(4). 152-159.
196. Risch S. J. Chi-Tang Ho. Spices flavor chemistry and antioxidant properties. ACS symposium series. 1996. 660.
197. Roginsky V., Barsukova T. Chain-breaking antioxidant activity and cyclic voltammetry characterization of polyphenols in a range of green, oolong, and black teas. *J. Agric. Food Chem.* 2003. 51. 5798-5802.
198. Rojano A., Gaviria A. Antioxidant activity determination in a lipidic peroxidation model of butter inhibited by isoespintanol. *VITAE.* 2008. 15(2). 212-218.
199. Rojano A, Gaviria A. Antioxidant activity of the isoespintanol in different media. *VITAE.* 2008. 15(1). 173-181.
200. Romay C. Remírez D. Actividad antioxidante de la ficocianina frente a radicales peroxilo y la peroxidación lípidica microsomal. *Rev Cubana de invest. Biomed.* 2001. 20(1). 38-41.
201. Rosa A., Delana M. Antioxidant activity of capsinoids. *J. Agric. Food Chem.* 2002. 50. 7396-7401.

-
-
202. Rugna A. Polo J. Antioxidant activity in Rhizomes from *Smilax Campestris* Griseb Smilacaceae. *Molecular medicinal chemistry*. 2003. 1. 21-25.
203. Ruiz M. A. García-Moreno E. Determination of phenolic antioxidants by HPLC with amperometric detection at a nickel phthalocyanine polymer modified electrode. *Electroanalysis*. 1999. 11 (7). 470–474.
204. Salah N. Miller N. J. and Rice-Evans C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys*. 1995. 322(2). 339-346.
205. Salazar-Olivo L. A. y Silva-Ortega C. O. Efectos farmacológicos de la capsaicina, el principio pungente del chile. *Biología Scripta*. 2004. 1(1). 7-14.
206. Sanatombi K. Sharma G. J. Capsaicin content and pungency of different capsicum spp. cultivars. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*. 2008.36 (2). 89-90.
207. Sawyer D.T. Oxygen Chemistry. United States of America, Texas A&M University, 1991. 236.
208. Scott G. Antioxidant. *Bull. Chem. Soc. Jpn*. 1988. 61. 165-170.
209. Sen C. K. Antioxidant and redox regulation of genes. *Academic Press*. 2000. 591
210. Sen A.K. Xanthone from *garcinia mangostana*. *Phytochemistry Rev*. 1980. 19. 2223-2225.
211. Shan B., Cai Y. Z. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem*. 2005. 53. 7749-7759.
212. Shi X. Antioxidant behaviour of caffeine: Efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Fd. Chem.Toxic*. 1991. 29(1). 1-6.
213. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem*. 1993. 215. 213-219.
214. Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997. 82. 291-295.
215. Simić A. Manojlović D. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*. 2007. 12. 2327-2340.

216. Singh S. Jarret R. Determination of capsinoids by HPLC-DAD in capsicum species. *J. Agric. Food Chem.* 2009. 57. 3452-3457.
217. Sousa W. R. Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. *J Food Compos Anal.* 2004. 17. 619–633.
218. Stangeland T. Antioxidants in some Uganda Fruits. *Afr. J. Eco.* 45 (3). 461-471.
219. Sun T. Xu Z. Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annuum L.*). *J Food Sci.* 2007. 72(2). 98-102.
220. Supalkova V. Stavelikova H. Study of capsaicin content in various parts of pepper fruit by liquid chromatography with electrochemical detection. *Acta Chim. Slov.* 2007. 54. 55–59.
221. Surh Y-J and Lee S. S. Capsaicin, a double-edged sword: toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. *Life Science.* 1995. 56(22). 1845~1855.
222. Sutoh K., Kobata K., and Watanabe T. Stability of capsinoid in various solvents. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 4026-4030.
223. Suzuki, J. I. Tausig, F.; Mores, R. E. *Food Technol.* 1947.11. 100-104.
224. Szeto Y. T. Tomlinson B. Total antioxidant and ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables: implications for dietary planning and food preservation. *Br J Nutr.* 2002. 87. 55–59.
225. Tabart J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry.* 2009. 113. 1226–1233.
226. TBARS Assay Kit. Zeptometrix corporation
227. Tewksbury J. J., Reagan K. M. Evolutionary ecology of pungency in wild chilies. *PNAS.* 2008. 105(33). 11808-11811.
228. Timbola A. K. Electrochemical Oxidation of Quercetin in Hydro-Alcoholic Solution. *J. Braz. Chem. Soc.* 2006.17(1). 139-148.
229. Thaipong K. Boonprakob U. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal.* 2006. 19. 669–675.

230. Thompson R. Q. Isolation of individual capsaicinoids from a mixture and their characterization by ^{13}C NMR spectrometry. *Talanta*. 2006. 70. 315–322.
231. Valko M. Rhodes C.J. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006.160. 1–40.
232. Van Benschoten J.J. Cyclic voltammetry experiment. *J Chem Educ*. 1983. 60 (9). 772-776.
233. Vargas F. Reacciones de radicales libres en relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances en química*. 2007. 2(2). 3-15.
234. Vela E. Edición especial: Los chiles de México. Catálogo visual. *Arqueología Mexicana*. 2009. 32. 1-90.
235. Velázquez Paniagua M. El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias*. 2004. 75. Pp. 36- 43.
236. Venero Gutiérrez J. R. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit*. 2002. 31(2). 126-33.
237. Vidal A. Fallarero A. Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006. 42(4). 589-600.
238. Wang J. Analytical Electrochemistry. Second Edition. Wiley-Interscience A John Wiley & Sons, Inc., Publication. New Jersey. 2001. 222.
239. Wang H. Cao G. and Prior R. L. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem*. 1996. 44. 701-705.
240. Weil J. A. Electron paramagnetic resonance. Elementary theory and practical applications. Second Edition. Wiley-Interscience A John Wiley & Sons inc., Publication. Canada. 687.
241. Wegrzyn T.F. Stability of antioxidants in an apple polyphenol-milk model system. *Food Chemistry*. 2008. 109. 310-318.

-
-
242. Wijeratne S. S. K. Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts. *J. Agric. Food Chem.* 2006. 54. 312-318.
243. Yakovleva K. E. Characterization of plant phenolic compounds by cyclic voltammetry. *Appl Biochem Microbiol.* 2007. 43(6). 661–668.
244. Yavlovich A. The reducing antioxidant capacity of *Mycoplasma fermentans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006.259. 195–200.
245. Zettersten C. Electrochemistry electrospray ionization. Mass Spectrometry. Method Development and Applications. Acta Universitatis Upsaliensis Uppsala. 2009. Uppsala, Sweden. 94.
246. Zhao G.R. Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B. *Food Chem Toxicol.* 2008.46. 73-81.
247. Zielinska D. Evaluation of the antioxidant capacity of lupin sprouts germinated in the presence of selenium. *Eur Food Res Technol.* 2008. 227.1711–1720.
248. Zvirappoport. The Chemistry of phenols. Edited by Z. Rappoport-2003 John Wiley & Sons, The Hebrew University, Jerusalem. Parte 1. 1667.
249. Zyrianov V. Application of electron spin resonance for evaluation of the level of free radicals in the myometrium in full-term pregnancy with normal labour and uterine inertia. *J. Biosci.* 2003. 28(1). 19–21.