



**ESPE**

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y  
MECÁNICA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN PETROQUÍMICA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERO EN PETROQUÍMICA**

**TEMA: COMPARACIÓN SIMULTÁNEA DE LA RESPUESTA  
ANALÍTICA A LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE FRENTE A  
DIFERENTES MÉTODOS DE ANÁLISIS. DPPH, ABTS, PCL, FOLIN-  
CIOCALTEU.**

**AUTOR: BEDÓN IPIAL, MAURICIO ALEXANDER**

**DIRECTOR: Ph.D. RODRÍGUEZ MAECKER, RÓMAN NICOLAY**

**LATACUNGA**

**2019**



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN PETROQUÍMICA**

### CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **“Comparación simultanea de la respuesta analítica a la actividad antioxidante frente a diferentes métodos de análisis. DPPH, ABTS, Folin-Ciocalteu, Foto quimioluminiscencia”** fue realizado por el señor **Bedón Ipial, Mauricio Alexander** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Latacunga, 10 de mayo de 2019

Dr. Rer.Nat, PhD Román Rodríguez Maecker

CC:171208212-0



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN PETROQUÍMICA**

**AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**

Yo, **Bedón Ipial, Mauricio Alexander**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Comparación simultanea de la respuesta analítica a la actividad antioxidante frente a diferentes métodos de análisis. DPPH, ABTS, Folin-Ciocalteu, Foto quimioluminiscencia** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas. Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Latacunga, 10 de mayo de 2019

Bedón Ipial, Mauricio Alexander

CC: 172470703-7



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN PETROQUÍMICA**

**AUTORIZACIÓN**

Yo, **Bedón Ipial, Mauricio Alexander**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Comparación simultanea de la respuesta analítica a la actividad antioxidante frente a diferentes métodos de análisis. DPPH, ABTS, Folin-Ciocalteu, Foto quimioluminiscencia** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad

Latacunga, 10 de mayo de 2019

Bedón Ipial, Mauricio Alexander

CC: 172470703-7

## **DEDICATORIA**

*A mis padres...*

## AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a mis padres, por brindarme su apoyo incondicional en esta maravillosa etapa de vida que han procurado para mí. Que sepan que su anhelo más grande ha sido cumplido.

A mi mamá, por su carácter para enfrentar circunstancias difíciles y mostrarme que dentro de mí llevo el mismo espíritu decisivo y lleno de coraje que me llevara a donde quiera ir. Mi gratitud infinita.

A mis hermanas, que después de todo, siempre he podido contar con ellas, les agradezco por asumir sin reproches, el compromiso de ser una guía, un sustento, y una motivación durante toda mi vida.

A mis abuelitas, que siempre han significado la muestra más sincera de cariño y bondad que he podido sentir. Les doy las gracias, porque sin duda sus logros y experiencias de vida, han dotado de sabiduría a la mía.

Agradezco especialmente al Dr. Román Rodríguez por su ímpetu para transmitir sabiduría y conocimiento, con el afán de formar excelentes personas y profesionales. Sus palabras compartidas en su tiempo cambiaron mi forma de pensar, y ayudaron a darme cuenta de hacia dónde quiero ir.

Finalmente, agradezco a todos aquellos que hasta este punto de mi vida han formado parte de ella, y han dejado una enseñanza. Familiares, profesores y amigos. Gracias.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

### CARÁTULA

CERTIFICACIÓN .....	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD .....	ii
AUTORIZACIÓN .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
ÍNDICE DE ECUACIONES .....	xvi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMEN.....	xvix
ABSTRACT.....	xx

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes .....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	5
1.3. Justificación e importacia.....	7
1.4. Objetivos .....	9
1.4.1. Objetivo general .....	9
1.4.2. Objetivos específicos.....	9
1.5. Variables de estudio .....	10

1.5.1. Variables dependientes.....	10
1.5.2. Variables independientes.....	10
1.6. Hipótesis.....	10

## **CAPÍTULO II**

### **FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA**

2.1. Antioxidantes .....	11
2.1.1. Clasificación de Antioxidantes.....	13
A. Antioxidantes Primarios o Rompedores de Cadena .....	13
B. Antioxidantes Secundarios o Preventivos .....	16
2.1.2. Tipos de antioxidantes.....	19
A. Antioxidantes Sintéticos .....	20
B. Antioxidantes Naturales .....	24
2.2. Actividad Antioxidante .....	39
2.3. Métodos generales para cuantificar la actividad antioxidante .....	40
2.3.1. Ensayos basados en la transferencia de átomo de hidrógeno (HAT).....	42
2.3.2. Ensayos basados en la transferencia de electrón (SET) .....	43
2.4. Métodos empleados para el análisis de respuesta a la actividad antioxidante .....	45
2.4.1. Método de Folin-Ciocalteu (FC) .....	45
2.4.2. Método TEAC/ABTS <sup>•+</sup> .....	48
2.4.3. Método de radical estable DPPH <sup>•</sup> .....	51
2.4.4. Método Fotoquimioluminiscencia (PCL)/ Photochem® .....	53
2.5. Curvas de calibrado para comparar métodos analíticos.....	57



2.6. Análisis de varianza .....	61
---------------------------------	----

### **CAPÍTULO III**

#### **METODOLOGÍA**

3.1. Equipos, materiales, y reactivos.....	64
3.1.1. Equipos.....	64
3.1.2. Materiales .....	64
3.1.3. Reactivos .....	65
A. Reactivos empleados para los ensayos.....	65
B. Estándares antioxidantes.....	65
3.2. Obtención de respuesta analítica.....	66
3.2.1. Soluciones Stock .....	66
3.2.2. Respuesta experimental a la actividad antioxidante con Folin Ciocalteu. ....	69
3.2.3. Respuesta experimental a la actividad antioxidante con radical ABTS.....	70
3.2.4. Respuesta experimental a la actividad antioxidante con radical DPPH.....	74
3.2.5. Respuesta experimental a la actividad antioxidante con fotoquimioluminiscencia.....	78

### **CAPÍTULO IV**

#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1. Respuesta analítica a la actividad antioxidante evaluada por el método de Folin-Ciocalteu.....	82
4.2. Respuesta analítica a la actividad antioxidante evaluada por el método de radical ABTS <sup>•+</sup> .....	86

4.3. Respuesta analítica a la actividad antioxidante evaluada por el método de radical DPPH• .....	89
4.4. Respuesta analítica a la actividad antioxidante evaluada por el método de Fotoquimioluminiscencia (PCL). .....	92
4.5. Comparación simultánea de la respuesta analítica a la actividad antioxidante obtenida por los diferentes métodos . .....	97

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

5.1. Conclusiones .....	110
5.2. Recomendaciones.....	113
5.2.1. Recomendaciones para la estandarización general de los métodos de análisis de actividad antioxidante. ....	113

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....115**

### **ANEXOS.....120**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	<i>Tipos de radicales libres y especies reactivas de hidrógeno y oxígeno (RNS/ROS).....</i>	12
<b>Tabla 2</b>	<i>Características relevantes de antioxidantes fenólicos importantes. ....</i>	21
<b>Tabla 3</b>	<i>Sustituyentes de identificación para familia de tocoferoles y tocotrienoles. ....</i>	28
<b>Tabla 4</b>	<i>Nomenclatura de los diferentes ensayos para evaluar la actividad antioxidante. ....</i>	41
<b>Tabla 5</b>	<i>Composición del medio de reacción para análisis de compuestos liposolubles. Photochem. ....</i>	55
<b>Tabla 6</b>	<i>Consideraciones para el análisis de varianza de los resultados. ....</i>	62
<b>Tabla 7</b>	<i>Estándares antioxidantes empleados. ....</i>	65
<b>Tabla 8</b>	<i>Resultados del análisis simultaneo de compuestos antioxidantes frente a Folin Ciocalteu. ....</i>	83
<b>Tabla 9</b>	<i>Resultados del análisis simultaneo de compuestos antioxidantes frente a radical ABTS<sup>•+</sup>. ....</i>	87
<b>Tabla 10</b>	<i>Resultados del análisis simultaneo de compuestos antioxidantes frente a radical DPPH<sup>•</sup>. ....</i>	90
<b>Tabla 11</b>	<i>Evaluación de la variabilidad de coeficiente C de la ecuación de regresión.....</i>	93
<b>Tabla 12</b>	<i>Resultados del análisis simultaneo de compuestos antioxidantes frente a PCL. ....</i>	96
<b>Tabla 13</b>	<i>Actividad antioxidante expresado en TEAC para cada método. ....</i>	97
<b>Tabla 14</b>	<i>Matriz de correlaciones entre métodos con resultados en TEAC.....</i>	98
<b>Tabla 15</b>	<i>Relaciones lineales estimadas utilizando valores TEAC entre métodos.....</i>	99
<b>Tabla 16</b>	<i>Actividad antioxidante expresada en equivalentes del compuesto usual para expresar resultados de cada método.....</i>	99

<b>Tabla 17</b> <i>Relaciones lineales estimadas mediante valores de AO de cada compuesto entre los métodos. ....</i>	100
<b>Tabla 18</b> <i>Actividad antioxidante (TEAC) de diferentes genotipos de Guaba. ....</i>	102
<b>Tabla 19</b> <i>Actividad antioxidante (TEAC) estimada a partir de las relaciones encontradas. ....</i>	102
<b>Tabla 20</b> <i>Actividad antioxidante de diferentes especias encontradas por ABTS<sup>•+</sup> y PCL. ....</i>	103
<b>Tabla 21</b> <i>Valores de AO predichos mediante las estimaciones propuestas a partir de los valores reportados por cada método. ....</i>	104
<b>Tabla 22</b> <i>Actividad representativa de cada compuesto antioxidante para barrer radicales de diferente naturaleza. ....</i>	109

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Reacciones de autooxidación de lípidos. ....	14
<b>Figura 2.</b> Reacciones de interacción Antioxidante-Lípido.....	15
<b>Figura 3.</b> Reacciones de terminación por radical AO. ....	16
<b>Figura 4.</b> Reacciones entre metales de transición- hidroperóxidos.....	17
<b>Figura 5.</b> Estructura química de antioxidantes sintéticos. BHA, BHT. ....	22
<b>Figura 6.</b> Estructura química. a) Resorcinol. b) Hidroquinona. ....	25
<b>Figura 7.</b> Estructura química. Trolox .....	27
<b>Figura 8.</b> Estructura química. Tocoferoles; Tocotrienoles.....	28
<b>Figura 9.</b> Estructura química. Ácido Ascórbico.....	30
<b>Figura 10.</b> Estructura química. Ácido Gálico.....	31
<b>Figura 11.</b> Estructura química. Timol. ....	32
<b>Figura 12.</b> Estructura química. Eugenol.....	33
<b>Figura 13.</b> Estructura química. Capsaicina. ....	34
<b>Figura 14.</b> Estructura química. $\beta$ -Caroteno. ....	35
<b>Figura 15.</b> Principio de reacción del método de Folin Ciocalteu.....	46
<b>Figura 16.</b> Photochem. ....	55
<b>Figura 17.</b> Correlación ideal entre métodos. Fuente: .....	57
<b>Figura 18.</b> Primer caso de correlación entre métodos.....	58
<b>Figura 19.</b> Correlación entre métodos con presencia de error sistemático. ....	58
<b>Figura 20.</b> Correlación entre métodos con estimación errónea del blanco y error sistemático. ..	59
<b>Figura 21.</b> Correlación entre métodos con caso de especiación.....	60

<b>Figura 22.</b> Matriz de organización de resultados para análisis de varianza.....	62
<b>Figura 23.</b> Estándares antioxidantes empleados.....	66
<b>Figura 24.</b> Masa real de ácido gálico pesada.....	67
<b>Figura 25.</b> Soluciones stock de antioxidantes estándar. Concentración 1000 ppm. ....	68
<b>Figura 26.</b> Curvas de calibración preparadas simultáneamente bajo el procedimiento de análisis del método Folin-Ciocalteu. ....	70
<b>Figura 27.</b> Espectro de absorbancia en el rango visible del radical ABTS <sup>•+</sup> . ....	72
<b>Figura 28.</b> Curvas de calibración preparadas simultáneamente bajo el procedimiento de análisis del método con radical ABTS <sup>•+</sup> . ....	73
<b>Figura 29.</b> Orden de las curvas en celdas para medición simultánea en el espectrofotómetro. Método ABTS <sup>•+</sup> . ....	73
<b>Figura 30.</b> Solución 60 uM de radical DPPH <sup>•</sup> . ....	75
<b>Figura 31.</b> Espectro de absorbancia en el rango visible del radical DPPH <sup>•</sup> . ....	76
<b>Figura 32.</b> Orden de las curvas en celdas para medición simultánea en el espectrofotómetro. Método DPPH <sup>•</sup> . ....	77
<b>Figura 33.</b> Parámetros del método de análisis en el quipo Photochem.....	79
<b>Figura 34.</b> Curvas de respuesta del equipo Photochem para la preparación de la curva de calibración de ácido gálico.....	80
<b>Figura 35.</b> Respuesta analítica a la actividad antioxidante de compuestos antioxidantes estándar frente al método de Folin Ciocalteu. ....	82

<b>Figura 36.</b> Resumen de las pruebas de Tukey y Dunnett para las mediciones de actividad antioxidante (coeficientes TEAC) de compuestos antioxidantes estándar frente a Folin-Ciocalteu. ....	84
<b>Figura 37.</b> Respuesta analítica a la actividad antioxidante de compuestos antioxidantes estándar frente al método TEAC/ABTS <sup>•+</sup> .....	86
<b>Figura 38.</b> Resumen de las pruebas de Tukey y Dunnett para las mediciones de actividad antioxidante (coeficientes TEAC) de compuestos antioxidantes estándar frente a radical ABTS <sup>•+</sup> . ....	88
<b>Figura 39.</b> Respuesta analítica a la actividad antioxidante de compuestos antioxidantes estándar frente al método de radical DPPH <sup>•</sup> .....	89
<b>Figura 40.</b> Resumen de las pruebas de Tukey y Dunnett para las mediciones de actividad antioxidante (coeficientes TEAC) de compuestos antioxidantes estándar frente a radical DPPH.....	91
<b>Figura 41.</b> Variación de la curva calibrado de Trolox de múltiples determinaciones independientes frente al método PCL. ....	93
<b>Figura 42.</b> Representación de variación de “C” en diagrama de caja y bigotes.....	93
<b>Figura 43.</b> Comparación de coeficientes TEAC obtenidos de compuestos antioxidantes estándar frente a PCL. Resultados comparados considerando la hidroquinona y en ausencia de esta. ....	95
<b>Figura 44.</b> Respuesta analítica a la actividad antioxidante de compuestos antioxidantes estándar frente al método PCL. Argumentos recíprocos.....	95
<b>Figura 45.</b> Gráficas de correlación entre métodos.....	101

**Figura 46.** Actividad antioxidante de compuestos antioxidante estándar

frente a diferentes métodos. ABTS $\bullet^+$ , PCL, DPPH $\bullet$ , FC.....1045



**ÍNDICE DE ECUACIONES**

<i>Ecuación 1.</i> Reacción con mecanismo HAT. ....	42
<i>Ecuación 2.</i> Reacción con mecanismo SET. ....	44
<i>Ecuación 3.</i> Formación de radical ABTS <sup>•+</sup> .....	49
<i>Ecuación 4.</i> Interacción de AO con el radical ABT <sup>•+</sup> . ....	49
<i>Ecuación 5.</i> Reacción de radical DPPH <sup>•</sup> con AO. ....	51
<i>Ecuación 6.</i> Interacción del compuesto fotosensible con radiación para generar radicales. ....	54
<i>Ecuación 7.</i> Criterio de fase de retraso. ....	56
<i>Ecuación 8.</i> Criterio de Inhibición. ....	56

**INDICE DE ABREVIATURAS**

-

**AOA.** Actividad Antioxidante.**AOC.** Capacidad Antioxidante.**TEAC.** Actividad Antioxidante en equivalentes de Trolox.**AGE.** Actividad Antioxidante en equivalentes de Ácido Gálico.**AAE.** Actividad Antioxidante en equivalentes de Ácido Ascórbico.**HAT.** Transferencia de átomo de Hidrógeno.**SET.** Transferencia de electrón singlete.**ABTS.** Ácido 2,2'-acino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).**DPPH.** 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.**F-C.** Folin-Ciocalteu.**PCL.** Fotoquimioluminiscencia.**THBP.** Trihidroxibutirofenona.**PG.** Galeato de propilo**TBHQ.** Terbutilhidroquinona.**BHA.** Butilhidroxianisol.**BHT.** Butilhidroxitolueno.**AA.** Ácido Ascórbico.

**AG.** Ácido Gálico.

**TX.** Trolox.

**EGN.** Eugenol.

**CPSN.** Capsaicina.

**$\beta$ -C.**  $\beta$ - Caroteno.

**$\alpha$ -T.**  $\alpha$ -Tocoferol.

**TM.** Timol.

**HDQ.** Hidroquinona.

**RSN.** Resorcinol.

**RNS.** Especies reactivas de Nitrógeno.

**ROS.** Especies reactivas de Oxígeno.

**mM.** Milimolar.

**mL.** Mililitros

**$\mu$ M.** Microlitros

**$\mu$ L.** Microlitros.

**P.eb.** Punto de ebullición.

**P.f.** Punto de fusión.

## RESUMEN

En este trabajo se utilizaron diferentes compuestos antioxidantes estándar para evaluar su comportamiento, y comparar la sensibilidad a estos compuestos, de cuatro diferentes métodos de análisis. La evaluación de la actividad de diferentes compuestos individuales es importante porque permite la obtención del perfil antioxidante que proporcionan en conjunto. Se identificaron las diferentes habilidades de estos compuestos para interactuar con distintos radicales libres característicos del principio de cuantificación con el que se rige cada método. Aunque muchos de los aspectos son difíciles de aclarar por los diferentes mecanismos y condiciones experimentales que los restringe, se encontraron resultados importantes para contribuir a la estandarización de métodos de cuantificación de actividad antioxidante. Entre los compuestos evaluados, el ácido gálico permite alcanzar la sensibilidad más alta en todos los métodos sin importar la afinidad de estos con componentes hidrofílicos o lipofílicos. Además, se encontraron correlaciones positivas entre los métodos, siendo la más importante entre PCL y TEAC/ABTS<sup>•+</sup>; los valores son predecibles entre estos métodos y se correlacionan bien con los valores obtenidos en otras investigaciones. Por otro lado, el método de radical DPPH<sup>•</sup> es menos susceptible a factores estéricos o de resonancia, sus resultados son uniformes para la mayoría de los compuestos. Finalmente, la actividad del ácido ascórbico estimada mediante F-C es comparada frente a la de los demás compuestos para obtener una idea de lo representativa que es su respuesta en la sobreestimación de la actividad debida a compuestos fenólicos.

### **PALABRAS CLAVE:**

- **FOTOQUIMIOLUMINISCENCIA (PCL)**
- **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EQUIVALENTES DE TROXOL (TEAC)**
- **FOLIN CIOCALTEU (F-C)**

## ABSTRACT

In this work different standard antioxidant compounds were used to evaluate their behavior, and to compare the sensitivity to these compounds, of four different methods of analysis. The evaluation of the activity of different individual compounds is important because it allows obtaining the antioxidant profile that they provide together. The different abilities of these compounds were identified to interact with different free radicals characteristic of the principle of quantification with which each method is governed. Although many of the aspects are difficult to clarify by the different experimental mechanisms and conditions that restrict them, important results were found to contribute to the standardization of methods of quantification of antioxidant activity. Among the evaluated compounds, the gallic acid allows to reach the highest sensitivity in all the methods regardless of the affinity of these with hydrophilic or lipophilic components. In addition, positive correlations were found among the methods, the most important being between PCL and TEAC/ABTS •<sup>+</sup>; The values are predictable among these methods and correlate well with the values obtained in other investigations. On the other hand, the DPPH radical method • Is less affected by steric or resonance factors, its results are uniform for most compounds. Finally, the activity of ascorbic acid estimated by F-C is compared to that of the other compounds to obtain an idea of what is representative of its response in the overestimation of the activity due to phenolic compounds.

### KEY WORDS:

- **PHOTOCHEMILUMINESCENT (PCL)**
- **TROLOX-EQUIVALENT ANTIOXIDANT CAPACITY (TEAC)**
- **FOLIN-CIOCALTEU (F-C)**

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUCCIÓN

#### 1.1. Antecedentes

El estudio de la actividad antioxidante es de gran importancia en el ámbito científico por el papel que desempeña este tipo de compuestos en la prevención de enfermedades, y en el retraso de los procesos normales degenerativos en los seres vivos. Además, la prevalencia de materiales y alimentos debida a la interacción con compuestos antioxidantes en diferentes entornos involucran diferentes aspectos relacionados con la naturaleza de la reacción que toma lugar entre antioxidantes y radicales libres. Por este motivo, es común encontrar una gran variedad de estudios orientados a elucidar muchas de las propiedades y características que exhiben estos compuestos en diferentes sistemas.

En Ecuador existen investigaciones en esta área enfocada a determinar la actividad antioxidante en extractos de frutas o plantas endémicas del país.(Vasco, Ruales, & Kamal-Eldin, 2008). En la investigación mencionada, además de clasificar ciertas frutas por su actividad antioxidante asociada al contenido fenólico, también se analiza la correlación entre los métodos empleados mediante el análisis de resultados obtenidos por tres diferentes ensayos de esta categoría. Siguiendo el mismo enfoque, también existen investigaciones referentes a la actividad antioxidante y el efecto antiinflamatorio de plantas medicinales tradicionales que son utilizadas de manera convencional por los habitantes del Ecuador (De las Heras et al., 1998). Estas clasificaciones proporcionan una estimación aceptable de la capacidad que tienen determinadas sustancias para interactuar mediante el mecanismo que supone el método de análisis para evaluar la actividad antioxidante.

En investigaciones como la presentada por Thaipong et al. (2006), se analiza la actividad antioxidante en extractos de guaba en diferentes solventes mediante los ensayos más utilizados para llevar a cabo determinaciones de este tipo. Esto indica que es posible obtener correlaciones favorables entre diferentes métodos en base a la respuesta obtenida frente a compuestos antioxidantes específicos como el ácido ascórbico, familias de carotenoides, y algunos compuestos fenólicos. El enfoque de la investigación proporciona información adicional sobre los resultados obtenidos con respecto al uso de diferentes solventes. Esto ayuda a estimar las condiciones experimentales bajo las cuales es posible llevar a cabo determinaciones confiables de actividad antioxidante. La información presentada en investigaciones similares permite entender y complementar aspectos importantes del procedimiento experimental que utiliza cada método.

Resultados importantes también son señalados en el trabajo presentado por Müller, Fröhlich, and Böhm (2011) ,donde se realiza un estudio comparativo de la actividad antioxidante de diferentes carotenoides medido por cuatro diferentes ensayos (Poder Antioxidante Ferro reductor FRAP, ensayos de barrido de radicales libres ABTS, DPPH, y ensayo de barrido de radical peroxil basado en la quimioluminiscencia de luminol LPSC). Con los resultados, se realiza la comparación de la respuesta analítica obtenida a partir de diferentes carotenoides, frente a la respuesta analítica obtenida por antioxidantes referenciales como el  $\alpha$ -tocoferol, Butilhidroxitolueno BHT, y Butilhidroxianisol BHA. De esta forma, se determina que la mayoría de los carotenoides empleados muestran un comportamiento diferente dependiendo del método de análisis. En relación con este trabajo, el objetivo de señalar cuan sensible es la respuesta de cada método a compuestos específicos, se relaciona directamente con este hecho, que como se menciona, puede obtenerse diferentes resultados dependiendo del método utilizado.

Esto quiere decir que, como en el caso de algunos carotenoides, aunque proporcionen resultados comparables entre los métodos, si la mayoría de ellos no manifiestan capacidad de barrido del radical DPPH•, no pueden ser tomados como antioxidantes referenciales para evaluar la capacidad de barrido de radicales similares al DPPH• y, por tanto, su habilidad para interactuar con esta clase de radicales es despreciable. Al final, el aporte de dicha investigación consiste en proporcionar una relación relativa estandarizada de cada método mediante una media ponderada de los valores obtenidos en cada uno, lo cual permite dar mayor importancia a la respuesta obtenida de compuestos específicos que denoten mayor actividad.

La contribución en esta área permite caracterizar claramente el comportamiento de ciertos compuestos antioxidantes frente a radicales libres de diferente procedencia, lo cual también es objeto del presente proyecto de investigación.

En la publicación realizada por Przygodzka et al. (2014), se planteó investigar la actividad antioxidante en diferentes extractos (Agua, Etanol/Agua), de especies comunes que son utilizadas como ingredientes o aromatizantes en alimentos con la finalidad de determinar el tipo de extracto que permite obtener mejores resultados en ensayos de voltametría cíclica VC, y métodos espectrofotométricos (ABTS, DPPH, Folin-Ciocalteu, Fotoquimioluminiscencia PCL). Todos ellos orientados a la determinación de actividad antioxidante. Además, otro de los objetivos del estudio fue determinar si el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides está relacionado con la capacidad antioxidante de las diferentes especies; concluyendo que existe dependencia de la proporción de extracto empleado y que, para el caso, el extracto adecuado para los análisis es la mezcla etanol-agua en proporciones iguales.



El estudio publicado por Mishra, Ojha, and Chaudhury (2012), estima las propiedades inhibitoras de radicales, por parte de antioxidantes, utilizando uno de los ensayos de análisis cuyo mecanismo es gobernado por la interacción del radical libre estable (DPPH•) con compuestos antioxidantes, con el objetivo de poner en contraste la habilidad de determinados compuestos para ser utilizados como estándares de referencia para este tipo de ensayos. En contraste con este trabajo, este tipo de resultados permiten establecer criterios de estandarización para determinados métodos.

También, se encuentran publicaciones científicas en donde la respuesta analítica de diferentes métodos se pone a prueba frente a diferentes muestras realizando trabajo in vitro (Schlesier, Harwat, Böhm, & Bitsch, 2002). Los resultados obtenidos son comparados en base a los antioxidantes utilizados para determinar la utilidad de cada método frente a compuestos específicos, lo cual está muy bien relacionado con los objetivos del presente trabajo de investigación.

Importantes contribuciones sobre la interacción de este tipo de compuestos han permitido elucidar muchas de las características de los ensayos que utilizan los métodos, y algunos radicales que se utilizan para evaluar determinados comportamientos. Reşat Apak et al. (2013), en su estudio sobre algunos de los métodos para evaluar la actividad antioxidante, da a conocer pasos específicos que deben tomar en cuenta los ensayos de esta naturaleza para obtener resultados confiables.

Finalmente, es importante mencionar la existencia de estudios de recopilación de información como el realizado por R. a. Apak, Özyürek, Güçlü, and Çapanoğlu (2016), en este se pretende detallar los avances científicos en el estudio de la actividad antioxidante para mantener la formalidad de los ensayos, proponer nuevos alcances de los métodos, y revisar sus aplicaciones en diferentes ramas de estudio.

## 1.2. Planteamiento del problema

Las primeras investigaciones asociadas a la actividad antioxidante han dado a conocer diferentes métodos para cuantificarla, y aún en la actualidad es objeto de estudio debido a las diferentes fuentes naturales existentes, de las cuales se pueden obtener estos compuestos como, plantas, frutas, y diversos alimentos. A pesar de que gran parte de estos compuestos se encuentran de forma natural y otros han sido desarrollados sintéticamente, las dos categorías son empleadas indistintamente con diferentes finalidades como la preservación de alimentos, o tratamientos médicos. Aun así, la medición cuantitativa o cualitativa del efecto que ocasiona su presencia no se ha establecido rotundamente para dar por sentado protocolos estandarizados que sean aplicables a los diferentes casos de análisis que pueden existir; como en el análisis de alimentos, lípidos, proteínas, ADN (R. a. Apak, Özyürek, Güçlü, Çapanoğlu, & chemistry, 2016).

Además, algunas virtudes fisiológicas que se les atribuye a los diferentes compuestos que contienen son aún más importantes, y sin importar si su origen es sintético, es muy importante la concesión entre los métodos enfocados en estas determinaciones porque de esto depende que los resultados entre análisis sean comparables, predecibles, repetibles, reproducibles, y confiables. En cuyo caso, esto permitiría obtener una estimación general aceptada del efecto antioxidante que se pretende medir en diferentes muestras.

Las complejidades surgen debido a que las diferentes aplicaciones que se les puede dar a los antioxidantes requieren consideraciones de muchos aspectos, como mecanismos de reacción, reactivos específicos, respuesta en diferentes medios de reacción, y más detalladamente la cuantificación precisa de todos los reactivos y productos involucrados. (R. a. Apak, Özyürek, Güçlü, Çapanoğlu, et al., 2016).

Algunos de los mecanismos que son posibles evaluar son los asociados al barrido de radicales libres, secuestro de iones de metales de transición, descomposición de peróxidos de hidrógeno, o los implícitos en la inhabilitación de prooxidantes activos (R. a. Apak, Özyürek, Güçlü, Çapanoğlu, et al., 2016) .Por lo tanto, el análisis de la respuesta analítica, que estos compuestos pueden generar en diferentes métodos, permite identificar cuál de ellos puede interactuar mediante uno o varios de estos mecanismo asociados a las manifestaciones antioxidantes que se busca medir.

Debido a la falta de métodos estandarizados no ha sido posible establecer de forma precisa ningún parámetro de análisis que permita realizar la cuantificación formal de ninguno de estos aspectos relacionados con la evaluación de la actividad antioxidante (R. a. Apak, Özyürek, Güçlü, Çapanoğlu, et al., 2016). En la búsqueda de una guía general para la aplicación de cada ensayo, se continúan realizando investigaciones que permitan elucidar cada uno de los diferentes aspectos que pueden generar incertidumbre en los ensayos que hasta la actualidad son empleados para llevar a cabo dichas determinaciones.

Los puntos más importantes que deben conocerse para llevar a cabo estas determinaciones son, las condiciones de elaboración de los ensayos, estabilidad de equipos y reactivos, parámetros limitantes de trabajo asociado a validaciones intra e inter laboratorio, esto incluye la repetitividad, reproducibilidad y recuperación de datos, además, control de calidad interna, para de esta forma obtener una garantía de calidad analítica que permita obtener resultados comparables del contenido de antioxidantes de una muestra de alimento, farmacéuticos u otro producto comercial. Así también será posible proporcionar mediciones para satisfacer la necesidad de estándares de calidad para asuntos regulatorios y declaraciones de propiedad saludables.(R. a. Apak, Özyürek, Güçlü, Çapanoğlu, et al., 2016).

Eventualmente, es necesario conocer el comportamiento de diferentes antioxidantes, tantos como sean posibles, en los métodos; para identificar su aplicabilidad en función de lo que se quiere evaluar, además se puede conseguir metodologías específicas, para medir implementaciones objetivas de estos compuestos en un sistema o medio específico de reacción.

### **1.3. Justificación e Importancia**

En la actualidad, uno de los principales objetivos es la implantación de un modelo en el sistema de desarrollo productivo que fomente el desarrollo sostenible de las naciones. Dicho propósito solo puede ser logrado mediante la promoción y preservación de los recursos naturales de donde son obtenidas las materias primas. Por tanto, el principal desafío es hallar el máximo potencial que tales recursos pueden ofrecer, y su aprovechamiento en todas las áreas productivas, lo cual es posible mediante la innovación en su uso, funcionalidad, y facilidad de reinserción a la cadena productiva. De esta manera, debido a que los fenómenos oxidantes tanto en la materia orgánica como inorgánica son los principales responsables de la degradación y degeneración que estas sufren a lo largo de su vida útil, es importante el desarrollo de este campo de estudio para la evolución de las áreas antes mencionadas, y los ámbitos científicos que pretenden elucidar el comportamiento de los compuestos antioxidantes. Por tal motivo, el aporte científico de esta investigación se centra en aclarar algunos aspectos importantes que contribuyan a la estandarización de los métodos actuales para el análisis de la actividad antioxidante.

El aspecto principal que se investiga en este trabajo es la habilidad que cada compuesto presenta para interactuar con el reactivo principal de cada método, y aunque la interpretación del mecanismo es ambigua, la capacidad de ejercer estabilización sofocando o barriendo el radical libre, permite estimar la actividad del compuesto frente a radicales de diferente naturaleza.

De este modo, al llevar a cabo el análisis en muestras, se tendrá claro que, al obtener una respuesta representativa, esta podría o no relacionarse con un compuesto específico. Así, la presente investigación lleva a cabo el análisis de doce compuestos antioxidantes conocidos, con lo cual, se pone en manifiesto la respuesta analítica que estos representan en los diferentes métodos estudiados, de esta manera, es posible descartarlos o incluirlos como compuestos que aporten a la señal de respuesta en el análisis rudimentario de cada método, de esta forma es posible vincular su presencia o ausencia, actividad o inactividad, en determinaciones de esta categoría.

Además, ya que los resultados también dan a notar la sensibilidad de los métodos a estos compuestos, es posible realizar una comparación de todas las señales de respuesta obtenida de los diferentes compuestos, frente a la señal producida por los estándares antioxidantes referenciales que utilizan los métodos para reportar resultados. Así, los compuestos que representen una mayor sensibilidad pueden ser tomados también como estándares de referencia, y de ser el caso, una misma señal de respuesta para un mismo compuesto en los diferentes métodos conduce a resultados relevantes para su estandarización.

Es muy importante llegar a un consenso entre los diferentes ensayos que existen para que los resultados entre investigaciones sean comparables. Esto es posible estableciendo criterios fundamentados para la selección de los reactivos, materiales, y ensayos que se deben utilizar en base al tipo de compuesto o muestra que se analiza, además del comportamiento que se pretende evaluar. La discusión apropiada de los resultados encontrados en este trabajo permite llegar a conclusiones y recomendaciones propicias para la estandarización de los métodos estudiados, y a la declaración acreditable del comportamiento de estos compuestos en los diferentes medios de reacción radicalaria que se involucran en cada método.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. Objetivo general**

- Evaluar la respuesta analítica a la actividad antioxidante utilizando los métodos considerados, frente a estándares antioxidantes, para establecer criterios de semejanza, sensibilidad, y metodología experimental.

### **1.4.2. Objetivos Específicos**

- Determinar la respuesta analítica a la actividad antioxidante obtenida por cada método mediante la comparación y desarrollo apropiado y de los procedimientos experimentales para establecer posibles modificaciones en el desarrollo de estos.
- Identificar la correlación entre los métodos a partir de los datos obtenidos del análisis de los estándares antioxidantes considerados a través de la comparación simultánea de los resultados para estimar la predictibilidad de valores entre estos.
- Validar y comparar de manera apropiada los datos obtenidos de cada método, mediante contrastes estadísticos para establecer criterios que aporten a la estandarización de los métodos de cuantificación de actividad antioxidante.
- Relacionar los resultados obtenidos con la información disponible en investigaciones que consideran los métodos estudiados en sus determinaciones, mediante la predicción de valores reportados utilizando las estimaciones de relación encontradas para verificar la relevancia del trabajo desarrollado.

## **1.5. Variables de estudio**

### **1.5.1. Variables Dependientes**

- Respuesta analítica a la actividad antioxidante de cada método.

### **1.5.2. Variables Independientes**

- Concentración de estándar antioxidante

## **1.6. Hipótesis**

La respuesta analítica obtenida por cada método, a la actividad antioxidante de diferentes estándares antioxidantes, se manifiesta por un mismo tipo de interacción y por lo tanto es posible encontrar correlaciones favorables entre métodos que permitan comparar resultados sin importar el comportamiento o propiedades químicas de cada compuesto; implicando que los resultados son predecibles entre los métodos.

## CAPÍTULO II

### 2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

#### 2.1. Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos químicos capaces de estabilizar sucesos continuos de reacciones ocasionadas por la presencia de radicales libres (electrones desapareados).

Halliwell, Gutteridge, and medicine (1995), definen a los antioxidantes como; “cualquier sustancia que, al estar presente en baja concentración, comparada con la de un sustrato oxidable, previene o reduce significativamente la oxidación de ese sustrato” (p.125).

Sin embargo, es adecuado mencionar que lo que realmente busca prevenir o reducir es el daño oxidativo en un sistema biológico sin considerar las particulares aplicaciones que pueden existir con sistemas no biológicos. Una definición más acertada es la propuesta por R. a. Apak, Özyürek, Güçlü, Çapanoğlu, et al. (2016), la cual sostiene que; “los antioxidantes son sustancias naturales o sintéticas que previenen o reducen el daño celular oxidativo causado por oxidantes fisiológicos que poseen potenciales de reducción positivos los cuales incluyen especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) y radicales libres ” (p.10).

Estas definiciones se enfocan en el daño ocasionado por el estrés oxidativo que es generado por procesos normales realizados en los sistemas biológicos, como lo es en el caso de los humanos, la respiración o el movimiento; así, los antioxidantes son apreciados por su capacidad de barrer, estabilizar o sofocar oxidantes como los antes mencionados, además de otros como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radicales hidroxilos ( $\cdot OH$ ), radicales alcóxido ( $RO\cdot$ ), todos ellos categorizados como radicales libres de alta reactividad.



Algunos de los radicales libres más importantes se presentan en la siguiente tabla. El estudio de su influencia en diferentes sistemas continúa motivando diferentes investigaciones; y su presencia se relaciona directamente con las diferentes manifestaciones ocasionadas por el estrés oxidativo. Las especies reactivas de nitrógeno RNS y oxígeno ROS son especies que, a pesar de no encontrarse de forma radicalaria, su alta reactividad e inestabilidad promueven su participación como agentes prooxidantes; que quiere decir que son capaces de inducir la oxidación abstrayendo electrones de sustratos biológicos (Venereo Gutiérrez, 2002).

**Tabla 1**

*Tipos de radicales libres y especies reactivas de hidrógeno y oxígeno (RNS/ROS).*

<b>Radicales</b>	<b>Especies Reactivas (RNS/ROS)</b>
Hidroxilo (HO•)	Peróxidos Orgánicos (ROOH)
Peroxilo (ROO•)	Ácido nitroso (HNO <sub>2</sub> )
Hidroperoxilo (HOO•)	Catión Nitrilo (NO <sub>2</sub> <sup>+</sup> )
Superóxido (O <sub>2</sub> • <sup>-</sup> )	Oxígeno (O <sub>2</sub> )
Óxido Nítrico (NO•)	Alquilperoxinitrilos (ROONO)
Alcoxilo (RO•)	Ácido peroxinitroso (ONOOH)
Dióxido de Nitrógeno (NO <sub>2</sub> •)	Ozono (O <sub>3</sub> )

También es importante dar la correcta interpretación a la definición de estrés oxidativo, la cual refiere al desbalance entre prooxidantes y antioxidantes, dicho de otra forma, representa la incapacidad de antioxidantes endógenos para contrarrestar el daño oxidativo en tejidos, y organismos debido a la sobreproducción de ROS/RNS a nivel celular causando la modificación de macromoléculas biológicas como lípidos, proteínas, AND, etc.

### **2.1.1. Clasificación de antioxidantes**

La clasificación de los diferentes compuestos antioxidantes parte de entender que existen de manera indistinta en muchas de las fuentes reconocidas de alimento como frutas, vegetales, plantas, y que, a nivel biológico, se manifiestan de diversas formas; esto específicamente, hace que sea relativamente difícil separarlos, y clasificarlos de forma adecuada. Aprovechando su mecanismo de acción se identifican dos categorías de estos compuestos que permiten agruparlos como antioxidantes primarios o rompedores de cadena, y antioxidantes secundarios o preventivos. Además, ya que también existen compuestos que pueden exhibir comportamientos diferentes durante el mecanismo con el que se manifiesta su actividad, se considera un grupo adicional denominado antioxidantes multifuncionales (Akoh, 2017).

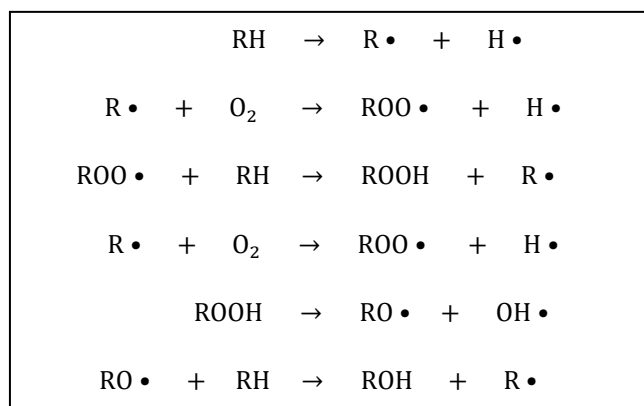
#### **A. Antioxidantes Primarios o Rompedores de Cadena**

Es común que este tipo de antioxidantes se encuentren constituidos por fenoles mono o poli sustituidos con grupos hidroxilo, además de varios sustituyentes diferentes en el anillo bencénico.

La sustitución con grupos donadores de electrones, por los grupos hidroxilo en las posiciones orto y para del fenol, incrementa la actividad antioxidante del compuesto por efecto inductivo; en este caso, la sustitución con grupos butilo o etilo, por el hidroxilo del fenol en la posición para aumenta la actividad antioxidante debido al impedimento estérico; por otro lado, la presencia de grupos alquilo ramificados o cadenas largas de estos en la posición para, reducen la efectividad antioxidante; de otra forma, la sustitución con cadenas largas o ramificadas de grupos alquilo en la posición orto mejora la habilidad antioxidante para formar estructuras de resonancia estable y reducir así la habilidad de los radicales antioxidantes para participar en reacciones de propagación (Akoh, 2017).

Los antioxidantes primarios son receptores de radicales libres, y son capaces de inhibir la etapa de iniciación, o interrumpir la etapa de autooxidación durante las reacciones cíclicas que son ocasionadas por los radicales libres. La autooxidación ocurre al ser abstraída la molécula de hidrógeno de un lípido insaturado (RH), para formar un radical lípido altamente reactivo (R•), dando paso a una serie de reacciones consecutivas detalladas a continuación

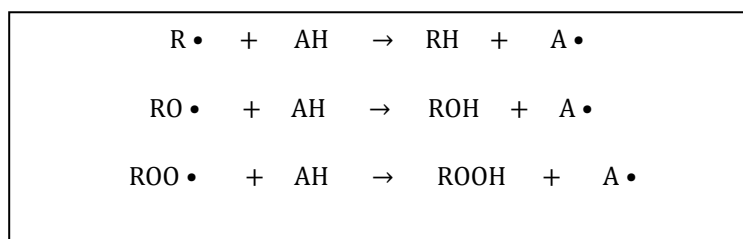
El radical lípido reactivo previamente formado reacciona con oxígeno para formar un radical peróxido (ROO•) en la etapa de propagación. A su vez, el radical peróxido formado en la etapa de propagación reacciona con el lípido para formar hidroperóxido (ROOH) y un nuevo radical lípido inestable el cual reacciona con oxígeno dando lugar a un nuevo radical peróxido. Este proceso oxidativo auto catalítico en condiciones reales también se beneficia de la luz , el calor, trazas de metales de transición, presencia de oxígeno y la degradación de los hidroperóxidos que producen radicales y ventajosamente aceleran las reacciones de propagación (Verhagen, Schilderman, & Kleinjans, 1991). En la siguiente figura se representa el mecanismo revisado teóricamente en el cual ningún antioxidante participa, y se aprecia las etapas de iniciación y propagación de las reacciones radicalarias que dan lugar a la autooxidación del entorno lípido.



**Figura 1.** Reacciones de autooxidación de lípidos.  
Fuente: (Akoh,2017)

Los productos secundarios resultantes del rompimiento de los hidroperóxidos lípidos son aldehídos, cetona, alcoholes, esterés, y cadenas cortas de hidrocarburos. Estos compuestos son los que otorgan las características de degradación organoléptica (rancidez, olor, sabor, color ),y la notable pérdida del valor nutricional en los alimentos que son procesados en la industria (Verhagen et al., 1991).

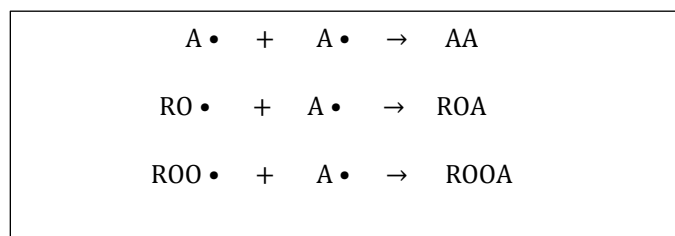
Al considerar la participación de antioxidantes primarios (AH) en el caso anterior, se pone en contraste habilidad de inhibir las reacciones de autooxidación que se generan debido a la etapa de iniciación y propagación. Los antioxidantes primarios reaccionan con los radicales lípidos y peróxidos, convirtiéndolos en productos no radicalarios más estables (Figura 2). La acción se lleva a cabo por la trasferencia del átomo de hidrógeno, del compuesto con la habilidad de donarlo, al radical; lo cual permite producir el correspondiente derivado del lípido y radicales antioxidantes que son más estables, evitando la promoción de la autooxidación (Akoh, 2017).



**Figura 2.** Reacciones de interacción Antioxidante-Lípido.  
Fuente: (Akoh,2017)

Adicional a esto, los radicales antioxidantes ( $A \cdot$ ), son estabilizados por la deslocalización del electrón desapareado alrededor del anillo fenólico, formando híbridos de resonancia estables. Así, se les atribuye también la habilidad de participar en las reacciones de terminación con los radicales lípidos, peróxidos, alcóxidos y otros radicales antioxidantes que presenten la misma característica (Akoh, 2017).

En otras palabras, la presencia de la forma radicalaria de un antioxidante primario detiene el mecanismo auto catalítico de los radicales libres que promueven la autooxidación, de esta forma los radicales se ven fácilmente sometidos a las reacciones de terminación (Figura 3).



**Figura 3.** Reacciones de terminación por radical AO.  
Fuente: (Akoh,2017)

Los antioxidantes primarios más utilizados y conocidos en alimentos son compuestos sintéticos, algunos de ellos son; Butilhidroxianisol (BHA); Butilhidroxitolueno (BHT); Galeato de propilo (PG), y el Terbutilhidroquinona (TBHQ). Sin embargo, también existen componentes naturales de los alimentos que actúan como antioxidantes primarios y son añadidos frecuentemente a estos como los pertenecientes a la familia de los tocoferoles y carotenoides cuyo mecanismo difiere de los que tienen como base un compuesto fenólico (Akoh, 2017).

### **B. Antioxidantes secundarios o Preventivos**

A diferencia de los antioxidantes primarios, estos no convierten los radicales libres en compuestos más estables. Los antioxidantes secundarios cuentan con la habilidad de formar quelatos con metales prooxidantes para desactivarlos, reponen átomos de hidrógeno a los antioxidantes primarios, descomponen hidroperóxidos en especies no radicalarias, desactivan el oxígeno, absorben radiación ultravioleta, o actúan como sofocadores de oxígeno. Como se menciona, este tipo de antioxidantes relaciona su actividad con el sinergismo asociado a todas sus posibles formas de interacción (Akoh, 2017).

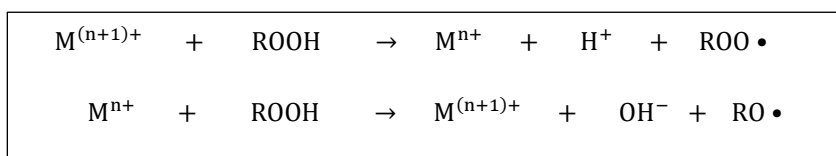
Los mecanismos más importantes de interacción de antioxidantes secundarios son los relacionados con la habilidad de formar complejos metálicos, barrer oxígeno, actuar como agente reductor, y sofocar átomos de oxígeno inestables. A continuación, se mencionan algunas de las formas en las que este tipo de compuestos manifiestan su actividad.

- **Agentes Quelantes**

La formación de quelatos (Complejos metálicos), es una habilidad de ciertos compuestos que permite disminuir el efecto prooxidante que poseen los metales de transición; mediante la reducción de sus potenciales de oxidación, y estabilizando el estado oxidado del metal.

La presencia de metales con diferentes estados de valencia como el hierro, cobre, manganeso, etc. Facilitan la oxidación ya que actúan como catalizadores de las reacciones radicalarias. Esta clase de metales pueden promover la oxidación al reaccionar directamente con moléculas de lípidos o con hidroperóxidos. Sin embargo, debido a restricciones termodinámicas, y velocidades de reacción demasiado lentas este no es el mecanismo principal de interacción (Akoh, 2017).

La presencia de metales como catalizadores permiten a los hidroperóxidos su descomposición acelerada para producir radicales libres, en otras palabras, los metales mejoran la descomposición de los hidroperóxidos y por lo tanto la generación de radicales libres. Se exhiben dos posibles reacciones metal hidroperóxido.



**Figura 4.** Reacciones entre metales de transición- hidroperóxidos.  
Fuente: (Akoh,2017)

En las reacciones anteriores; al ser cíclicas, permiten la regeneración de los estados de oxidación de los metales; dando paso a la transferencia continua de electrones desde los lípidos, o hidroperóxidos; aunque todavía no está claro si estos metales de transición promueven directamente la peroxidación de lípido a través de formación de complejos metal-lípido, o mediante la formación de radicales peróxido (Akoh, 2017).

Los quelatos formados pueden impedir de forma estérica la formación de complejos metal hidroperóxido. Compuestos como el ácido cítrico, ácido fosfórico, y el tan conocido ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), poseen la habilidad de formar quelatos con estos metales, en cuyo caso cada uno de estos es responsable de llevar a cabo su función quelante de diferente manera al entrar en contacto con los metales. En el caso del EDTA, el quelato es formado por la formación termodinámica estable del complejo metálico, lo cual le permite inhibir reacciones de tipo Fenton que produce radicales libres altamente reactivos (Reşat Apak et al., 2013).

- **Agentes Reductores y Barrido de Oxígeno**

Estos compuestos tienen la habilidad de prevenir la oxidación mediante el barrido de oxígeno, y su actuación como agentes reductores. En el caso del ácido ascórbico y los sulfitos reaccionan directamente con el oxígeno para eliminarlo. Además, el ácido ascórbico también posee la capacidad de llegar a su forma oxidada al transferir uno o dos de sus electrones. Este compuesto representa un antioxidante multifuncional, ya que además de las interacciones mencionadas, se han identificado otras reacciones en sistemas no biológicos, como sofocamiento de oxígeno; reducción tanto de radicales libres, como radicales antioxidantes primarios; remoción de oxígeno molecular en la presencia de iones metálicos (Akoh, 2017).

- **Sofocantes de Oxígeno**

El oxígeno es una molécula de alta energía que es responsable de la fotooxidación de las grasas insaturadas y de la subsecuente generación de hidroperóxidos. Los sofocantes de oxígeno reducen el exceso de energía de la molécula, disipándola en forma de calor. Compuestos como el licopeno, beta caroteno, y luteína son sofocantes de oxígeno activos a bajas presiones parciales de oxígeno (Akoh, 2017).

### **2.1.2. Tipos de antioxidantes**

Los antioxidantes se han dado a conocer por su uso en diferentes alimentos, productos farmacéuticos, y otros productos comerciales. Generalizando, su aplicación está relacionada con el objetivo de generar de forma directa o indirecta valor agregado mediante la preservación viable de alimentos, retraso en el envejecimiento en la piel, prevención del daño de tejidos importantes, etc. Además, con el objeto de aprovechar sus potenciales efectos, se desarrollan antioxidantes sintéticos con mayor eficacia, bajo costo, y alta estabilidad. Sin embargo, en la actualidad se han visto vinculados varios de estos compuestos sintéticos con efectos carcinogénicos, que promueven la evolución de esta condición en el ser humano, por lo cual su uso ha sido restringido y, por lo tanto, es más relevante la búsqueda de antioxidantes naturales que puedan ser utilizados en las diferentes industrias.

Los diferentes tipos de antioxidantes que se conocen se pueden resumir de forma concisa según su origen. Esto lleva a tipificar los compuestos como naturales y sintéticos. Por otro lado, es importante mencionar que ciertos compuestos de esta naturaleza se forman espontáneamente como resultado de las reacciones que toman lugar durante etapas de procesado de alimentos, y otras familias de compuestos que son muy importantes por sus aplicaciones particulares.



### **A. Antioxidantes Sintéticos**

Este tipo de antioxidantes en general son desarrollados para ser utilizados como inhibidores de la oxidación de lípidos en alimentos. La síntesis de estos compuestos es limitada debido a costos de investigación, desarrollo, costos asociados con la evaluación de seguridad y el tiempo requerido para obtener una aprobación regulatoria del compuesto como aditivo (Akoh, 2017). Sin embargo, como se mencionó antes, el hecho de que algunos de estos compuestos se hayan visto asociados a la promoción de enfermedades carcinogénicas ha llevado a que los consumidores prefieran productos tratados con preservantes de origen natural, por tal motivo, en la actualidad se realiza una búsqueda permanente de compuestos antioxidantes que provengan de fuentes naturales.

Estas contrariedades surgen debido a que su presencia en alta concentración los lleva a interactuar como compuestos, esto refiere una alta reactividad, llevando a su participación en los procesos de iniciación radicalaria. A pesar de ello, no ocurre lo mismo en todos los casos, por eso las regulaciones de su uso varían de país a país.

Los antioxidantes más utilizados en alimentos son compuestos fenólicos, y esto se debe a que su actividad antioxidante depende las variaciones en su estructura que directamente influyen en las propiedades físicas, es decir, compuestos fenólicos cuyo anillo aromático se encuentre sustituido con grupos alquilo presentan mejor efectividad antioxidante, aunque eso no se cumple en todos los casos ya que depende del tipo de sustituyente que esté vinculado al anillo. Sin embargo, si es común que estos compuestos fenólicos también actúen como agentes antimicrobianos, lo cual es ventajoso para su uso en alimentos. Para aplicar estos compuestos con una finalidad concreta se debe también tomar en cuenta sus propiedades físicas, ya que de ser el caso pueden descomponerse a altas temperaturas o sufrir un cambio debido a presiones de operación.

La siguiente tabla presenta un resumen de propiedades físicas y aplicaciones de antioxidantes fenólicos de origen sintético que son de uso común.

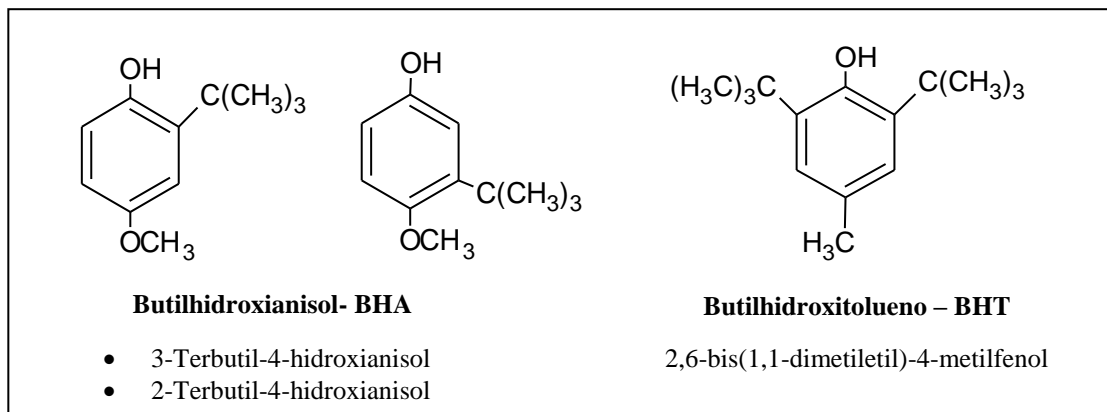
**Tabla 2**

*Características relevantes de antioxidantes fenólicos importantes.*

Compuesto	Solubilidad	Funcionalidad
<b>Butilhidroxianisol (BHA)</b> Peso Molecular: 180.25 Apariencia: Cera sólida P. Eb. 264-270 °C P. F. 48-63 °C	Insoluble en Agua. Solubilidad moderada en Glicerol y aceite mineral. Soluble en grasas, alcohol, propilenglicol, éter de petróleo, parafina.	Utilizado en materiales para empaques. Efectivo en grasas animales. Sinergia con BHA en mezcla. Resistente en productos horneados o fritos.
<b>Butilhidroxitolueno (BHT)</b> Peso Molecular: 220.356 Apariencia: Cristales blancos P. eb. 265 °C P.f. 70 °C	Insoluble en agua, glicerol y propilenglicol. Solubilidad moderada en aceite mineral. Soluble en grasas, parafina, alcohol, en la mayoría de los solventes orgánicos.	Menos usado en productos horneados o fritos que el BHA. Esteáricamente más impedido que el BHA. Se descompone a temperaturas moderadas.
<b>Galeato de Propilo (PG)</b> <b>Peso Molecular: 212.20</b> Apariencia: Cristales blancos P. eb. Se descompone sobre 148 °C P. f. 150 °C	Solubilidad leve en agua, grasas, y aceite mineral. Soluble en alcohol, glicerol, propilenglicol	Incoloro en presencia de metales. Siempre usado en combinación con un agente quelante. Más efectivo en aceite vegetal que el BHA y BHT Sinérgico con otros antioxidantes.
<b>Terbutilhidroquinona (TBHQ)</b> Peso Molecular: 166.22 Apariencia: Cristales blancos P. eb. 300 °C P.f. 126.5 – 128.5 °C	Solubilidad leve en agua. Solubilidad moderada en grasas, propilenglicol. Soluble en Alcohol.	Excelente antioxidante en aceite vegetal. No presenta descoloración en presencia de metales.
<b>Trihidroxibutirofenona (THBP)</b> Peso Molecular: 196 Apariencia: polvo coloreado P. eb. n/a °C P.f. 149-153 °C	Solubilidad leve en agua. Solubilidad moderada en grasas, propilenglicol. Soluble en Alcohol, propilenglicol, parafina.	Sinérgico con otros antioxidantes. Usado en materiales de empaque. Adquiere color marrón en presencia de metales. Usado en raciones animales.
<b>Etoxiquinona</b> Peso Molecular: 217.31 Apariencia: Líquido amarillo P. eb. 123-125 °C	Insoluble en agua. Soluble en la mayoría de solventes orgánicos.	Efectivo en la retención de pigmentos.

Fuente: (Akoh, 2017).

A continuación, la siguiente figura muestra las estructuras químicas de los antioxidantes sintéticos empleados en el actual proyecto de investigación.



**Figura 5.** Estructura química de antioxidantes sintéticos. BHA, BHT.

**Butilhidroxianisol BHA.** Es un compuesto lipofílico de origen sintético que es utilizado como antioxidante en la mayoría de los casos. Presenta la habilidad de barrer especies reactivas de oxígeno (ROS), mediante la donación de un átomo de hidrógeno dispuesto a radicales de oxígeno derivados de sustratos oxidables como los ácidos grasos. El radical antioxidante formado después de realizar la donación es estabilizado por resonancia del anillo de benceno (Figura 5), y puede regenerarse al antioxidante original por interacción con una especie reductora, también puede ser oxidado fuertemente hasta convertirse en una quinona estable, o combinarse con otros radicales fenoxil o peroxil lipídico para formar varias moléculas no radicales (Verhagen et al., 1991).

Las propiedades antioxidantes del BHA también están relacionadas con la capacidad de incrementar los niveles de glutatión en el hígado; además de otros complejos importantes para combatir el estrés oxidativo generado por diversos factores biológicos. De forma puntual, se ha descubierto que el BHA; además de poseer la capacidad de realizar el barrido de ROS, también posee actividad antinecrótica que ha sido atribuida a su afinidad con los lípidos, y al hecho de que esteáricamente en relación con el BHT se encuentra menos impedido (Festjens et al., 2006).

El BHA también mejora la estabilidad de fármacos, vitaminas liposolubles, y cosméticos. Se ha comprobado que al adicionar BHA al caucho, elastómeros, y plásticos, su tiempo de vida útil incrementa y evita la degradación toxica de estos materiales. Por otro lado, su principal aplicación como aditivo para alimentos ha sido cuestionada por atribuírsele características genotóxicas, y carcinogénicas, y aunque no existe estudios que aseguren estos problemas en humanos, los sucesos en animales han sido motivo de la controversia en este ámbito (Williams, Iatropoulos, Whysner, & toxicology, 1999).

**Butilhidroxitolueno BHT.** Al igual que el BHA, este compuesto también es de origen sintético y su uso es reevaluado de manera usual en estudios que buscan descartar el riesgo que puede generar en la promoción de afecciones serias en los humanos. Comparado con el BHA, es menos estable, sin embargo, al combinarse entre ellos, la actividad antioxidante es mayor que la generada de forma individual, por eso es común encontrarlos en los alimentos en diferentes proporciones, pero siempre combinados. En ciertos países existen regulaciones para su uso como aditivo en alimentos.

El BHT no existe de forma natural, es preparado a partir del p-cresol y el isobutileno, algunas de sus propiedades y usos son mencionadas en la tabla 2. El mecanismo sinérgico postulado del BHA y BHT, sugiere que el BHA interactúa con radicales peróxidos, lo cual genera el radical fenóxido BHA y se abre paso a la abstracción del átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo del BHT. Entonces, el BHT restituye el átomo de hidrógeno del BHA permitiéndole así regenerar su efectividad, por otro lado el radical BHT formado reacciona con radicales peróxido para dar paso a la terminación de las reacciones radicalarias (Akoh, 2017).

Además del uso en alimentos, también es utilizado en aditivos sensibles a la presión, lubricantes con contacto incidental de alimentos, en la elaboración de materiales para empaquetar alimentos, como agente antiespumante en la fabricación de papel, resinas, y revestimientos poliméricos, en plásticos acrílicos rígidos y semirrígidos usados en filtros, materiales de caucho, resinas de formaldehído, sellado de contenedores de alimentos, etc. (Babich, 1982).

### **B. Antioxidantes Naturales**

Los grupos más importantes de antioxidantes naturales son carotenoides, flavonoides, aminoácidos, hidrolizados de proteína, productos de reacción de Maillard (MRPs), fosfolípidos, y esteroides. Se continúan realizando investigaciones para identificar esta clase de antioxidantes en fuentes naturales, y por el momento, la mayoría de los antioxidantes naturales fenólicos han sido hallados en plantas y vegetales.

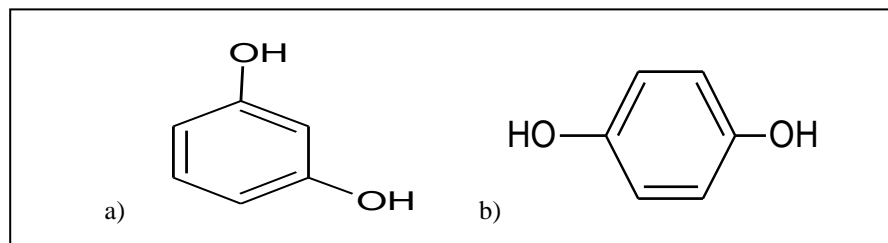
Durante el procesamiento de alimentos, las etapas abarcan tiempos de reposo o curación en las cuales ocurren de forma espontánea MRPs, hidrolizados de proteína, productos de la fermentación y otros compuestos. Es decir, se induce a la formación de antioxidantes y eso permite que los procesos trabajen de forma estable para obtener etiquetas de calidad (Akoh, 2017).

También es necesario mencionar que los antioxidantes naturales presentan algunos inconvenientes, como el hecho de que su uso puede resultar en un sabor, olor, o color indeseable, debido a la ineficiencia antioxidante. Por otro lado, la seguridad de su uso tampoco ha sido reafirmada, puesto que muchos de estos compuestos poseen un potencial carcinogénico, mutagénico, o teratógeno. Por tanto, los consumidores prefieren aditivos naturales en los productos, y las políticas para su restricción son menos severas que las establecidas en componentes de origen sintético (Akoh, 2017).

A continuación, se revisan ciertas características de las familias de antioxidantes naturales mencionadas y de los compuestos antioxidantes estudiados en este trabajo.

**Resorcinol.** Este compuesto químico es obtenido a partir del m-fenildibencensulfónico fundiéndolo con soda cáustica, es un producto utilizado en fotografía, en la fabricación de llantas, y otros productos de caucho; también en componentes de adhesivos, tintes de cabello, cosméticos y en menor proporción en aplicaciones médicas como en el tratamiento de condiciones dermatológicas. Se ha encontrado resorcinol en cebada tostada, melaza en conserva, café, humo de cigarrillo, efluentes de la producción de carbón, productos de alquitrán, y aguas de acuíferos ricos en carbón y depósitos de esquisto (Lynch, Delzell, Bechtel, & pharmacology, 2002).

Aunque sea posible obtenerlo de manera sintética, no es posible clasificarlo como tal debido a que su obtención también es posible a partir de resinas como el galbanum (Gomorresina obtenida de la raíz de la planta de mismo nombre), o mediante destilación del extracto de madera de Brasil. Por otro lado, también son reconocidas diversas formas de obtención sintética a partir de compuestos orto y para de la serie aromática como bromofenoles, ácido benceno-p-disulfónico, que alcanzan altos rendimientos en la síntesis de resorcinol por fusión con hidróxido de sodio (Suresh, Srivastava, Mishra, & Engineering, 2012). La forma de obtención está sometida a restricciones capitales de las empresas que utilizan este compuesto, por lo que es mucho más viable la obtención sintética del compuesto.



**Figura 6.** Estructura química. a) Resorcinol. b) Hidroquinona.

La estructura química de este compuesto puede ser apreciada en la figura 6, y como se puede notar, es un anillo aromático sustituido con dos grupos hidroxilo en posición meta, lo cual sugiere que cualquier diferencia en la respuesta obtenida de su isómero en posición para (hidroquinona) se debe a las posiciones que ocupan estos sustituyentes con lo cual, en base al resultado obtenido, se puede inferir cuestiones relacionadas con su reactividad. Sus propiedades más importantes son la gran solubilidad en agua que posee (1000 gr/L), el punto de ebullición a condiciones normales (277°C), la longitud de onda de máxima absorción (273 nm), y su densidad (1.28 gr/cm<sup>3</sup>) (Suresh et al., 2012).

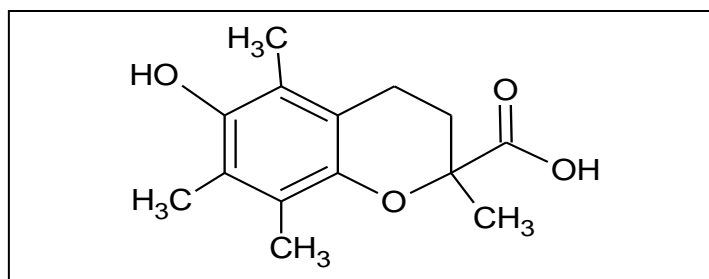
**Hidroquinona.** La hidroquinona es un isómero de posición del resorcinol y su obtención es posible por tres diferentes métodos. El primero consiste en la oxidación de anilina con dióxido de manganeso y ácido sulfúrico, seguido por la reducción con polvo de hierro y agua, el segundo consiste en la alquilación de benceno con propileno para producir una mezcla de isómeros de diisopropilbenceno, de los cuales, los isómeros para son aislados y oxidados con oxígeno para producir el correspondiente dihidroperóxido, el cual se trata con un ácido para producir hidroquinona y acetona. El tercer método consiste en la oxidación del benceno con peróxido de hidrógeno para producir una mezcla de productos de los cuales es posible aislar hidroquinona y catecol (Suresh et al., 2012).

Este compuesto es uno de los productos más efectivos para el tratamiento de desórdenes de hiperpigmentación. Se han realizado gran cantidad de estudios referentes a la seguridad de este compuesto debido a que es un derivado neto del benceno, y existen algunos efectos a largo plazo observados en cosméticos que contienen gran cantidad de hidroquinona (Nordlund, Grimes, Ortonne, & Venereology, 2006).

A pesar los diferentes métodos expuestos de obtención tampoco puede ser considerado un componente propiamente sintético ya que existe de forma natural en la hojas de pera y como glucósido (Arbutin), en las cortezas y brotes de algunas plantas como la Ericaceae, sus propiedades fisicoquímicas son similares a las del resorcinol (Suresh et al., 2012).

**Trolox.** Es un compuesto análogo de la vitamina E, debido a que al igual que este, su estructura principal también posee un anillo cromanol (Figura 8), con los grupos metilo en posiciones idénticas al del  $\alpha$ -tocoferol, es decir posee una estructura similar, pero sin presencia de cadenas isoprenoide o de fitilio (Figura 8). Este compuesto es famoso por ser utilizado en algunos de los principales métodos de cuantificación de actividad antioxidante ya que, se lo utiliza como estándar de referencia para la expresión de resultados (Actividad antioxidante en equivalentes de Trolox TEAC). Algunos de los ensayos de colorimetría como, ABTS y DPPH lo utilizan para expresar resultados y muchas investigaciones están orientadas al manejo y aplicabilidad de este compuestos en diferentes casos de análisis de actividad antioxidantes (Arts, Haenen, Voss, Bast, & Toxicology, 2004).

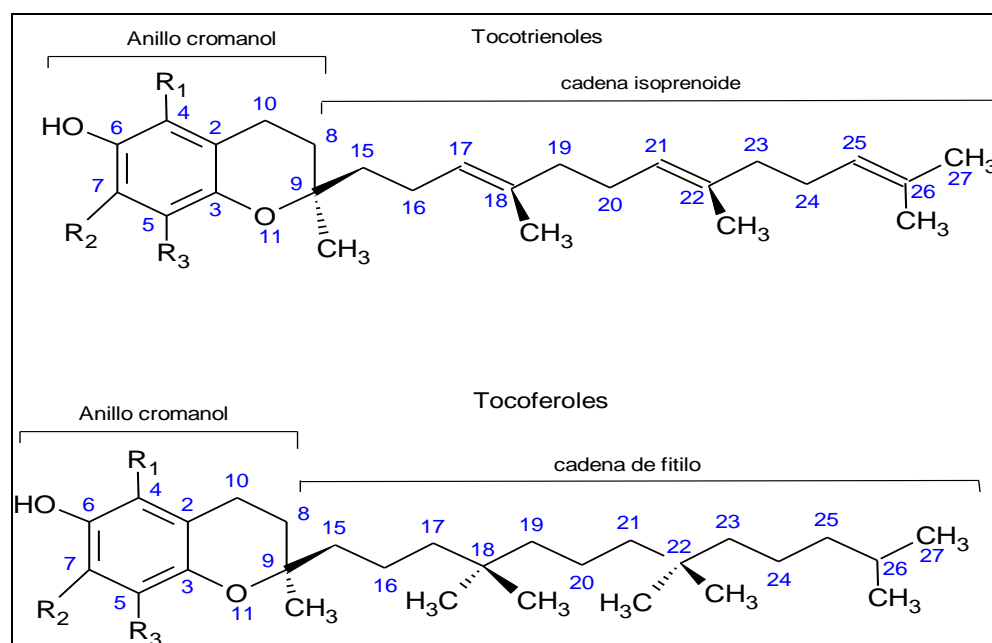
Este compuesto es soluble en agua, normalmente se lo encuentra como cristales sólidos y es utilizado de manera formal para evaluar el daño oxidativo en procesos de muerte celular neuronal, envejecimiento y en tratamientos contra el cáncer. Su nombre IUPAC establecido es 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico.



*Figura 7.* Estructura química. Trolox



**Tocoferoles y Tocotrienoles.** Este tipo de compuestos está conformado por los estereoisómeros de la vitamina E, es decir los tocoferoles y tocotrienoles poseen estructuras definidas por la cantidad y posición de grupos metilo unidos a las posiciones, alfa, beta o gamma del anillo de cromanol.



**Figura 8.** Estructura química. Tocoferoles; Tocotrienoles.

**Tabla 3**

*Sustituyentes de identificación para familia de tocoferoles y tocotrienoles.*

Tocoferol o tocotrienol	R1	R2	R3
$\alpha$ -4,7,5-trimetil	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\beta$ -4,5-dimetil	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
$\gamma$ -7,5-dimetil	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\delta$ -5-metil	H	H	CH <sub>3</sub>

Fuente: (Akoh, 2017)

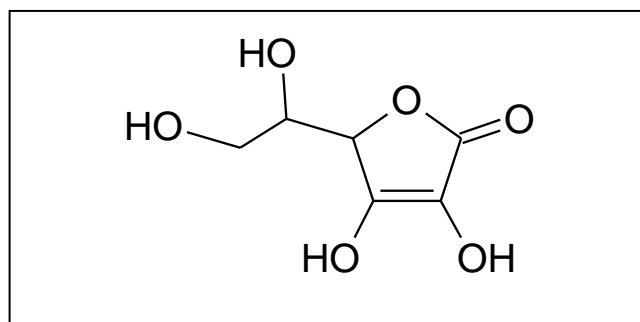
El homólogo más activo de la vitamina E, es el  $\alpha$ -tocoferol, y al igual que este se encuentran naturalmente en plantas, y aún más concentrados en aceites vegetales, por lo cual son considerados fuentes concentradas de vitamina E.

Los tocotrienoles son menos comunes, pero se pueden encontrar en el aceite de palma, cereal, y legumbres. Estos compuestos son utilizados como fuente antioxidante natural en alimentos puesto que son permitidos por los organismos reguladores. Sin embargo, los tocoferoles naturales tienen limitaciones en su uso debido a que la alta concentración de vitamina E, puede causar un efecto de actividad prooxidante (Akoh, 2017).

En el mecanismo del  $\alpha$ -tocoferol, el átomo de hidrógeno es donado por este compuesto hacia un radical peróxido, resultando un radical  $\alpha$ -tocoferol semiquinona el cual es capaz de donar otro átomo de hidrógeno y de esta forma el antioxidante inicial se convierte en metiltocoferilquinona, la otra opción es que la semiquinona reaccione con otra igual para formar un dímero de  $\alpha$ -tocoferol, el cual posee actividad antioxidante, en otras palabras la oxidación de los tocoferoles resulta en la formación de diferentes subproductos que poseen diferentes grados de actividad antioxidante (Akoh, 2017).

**Ácido ascórbico y sales de ascorbato.** El ácido ascórbico es un antioxidante reconocido de forma general como seguro y se encuentra de forma prominente en plantas, frutos y otros alimentos, además es producido de manera sintética en grandes cantidades porque su uso no está limitado y es considerado como un nutriente antioxidante. En algunos productos se lo utiliza como saborizante o acidulante, sin embargo en productos que son tratados con calor, el ácido ascórbico puede participar en la coloración no enzimática y ser degradado por reacciones de reducción (Akoh, 2017). Este antioxidante puede actuar como antioxidante primario o secundario, por lo cual es muy utilizado en diferentes aplicaciones que van desde tratamientos médicos hasta la construcción de membranas antioxidantes.

En sistemas in vivo, dona átomos de hidrógeno como un antioxidante primario, también es capaz de barrer radicales directamente mediante la conversión de hidroperóxidos en productos estables, es decir, evita el daño celular oxidativo causado por peróxidos de hidrógeno.



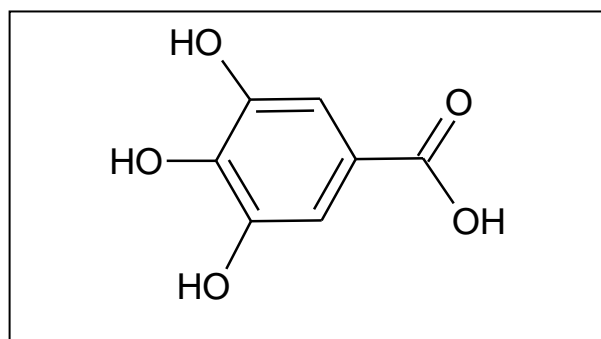
**Figura 9.** Estructura química. Ácido Ascórbico

En alimentos, el ácido ascórbico es un antioxidante secundario que tiene múltiples funciones como barrer oxígeno, cambiar el potencial redox de sistemas de alimentos a un rango reducido, actuar de manera sinérgica con compuestos quelantes, y regenerar antioxidantes primarios (Akoh, 2017). El ácido ascórbico se oxida a través de una o dos transferencias de electrones que son ocasionadas por su estructura enediol. Las sales de ácido ascórbico (ascorbato de sodio y ascorbato de calcio) son hidrosolubles y no es posible utilizarlas en aceites o grasas así que por lo general se utilizan para estabilizar bebidas. (Akoh, 2017).

**Ácido Gálico.** Este es un compuesto orgánico antioxidante que se lo encuentra de forma natural en algunas frutas, y es parte de los compuestos fenólicos que otorgan propiedades antioxidantes a varias plantas junto con los flavonoides. Es conocido también por ser un tanino hidrolizable lo cual hace referencia a su fácil obtención a partir de cubierta de plantas o arboles como el roble.

Es un derivado hidrogenado ampliamente usado en la industria alimenticia y farmacéutica debido a su capacidad para proteger contra el daño oxidativo ocasionado por radicales libres.

Diversos estudios confirman las propiedades antioxidantes que posee por su participación contra desórdenes cardiovasculares, cáncer, y problemas de la piel (Fiuza et al., 2004).

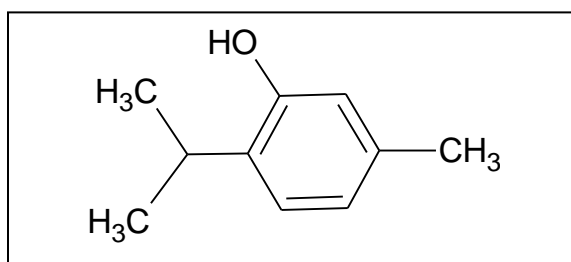


*Figura 10.* Estructura química. Ácido Gálico.

Al igual que el Trolox y el ácido ascórbico, este compuesto fenólico también es utilizado como estándar de referencia para expresar el contenido fenólico total de alimentos, bebidas y plantas mediante el método de análisis de Folin-Ciocalteu. Usualmente, al igual que en los otros casos, los resultados se expresan en equivalente de ácido gálico por unidad de masa de muestra empleada.

**Timol.** Este compuesto puede ser obtenido de manera natural a partir del aceite esencial de tomillo o de monarda punctata ya que se encuentra como principal mono terpeno fenólico de estas plantas. Se obtiene de forma sintética usando p-cresol o m-cresol, haciendolos reaccionar con propeno o alcohol isopropílico. Es efectivo para destruir el moho y parásitos herbarios, también se usa en la preservación de especímenes anatómicos y como antiséptico interno u/o externo (Aeschbach et al., 1994).

Además, se ha demostrado que al ser combinado con carvacrol o eugenol desempeña una importante actividad antimicrobiana que previene la proliferación de placa bacteriana en tratamientos orales (Didry, Dubreuil, & Pinkas, 1994).

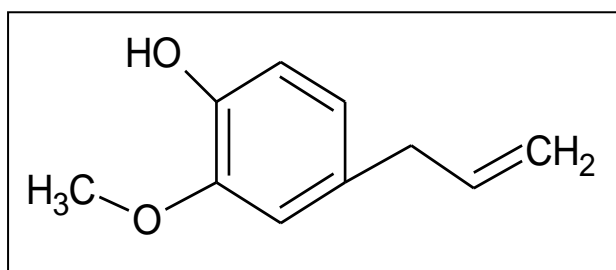


*Figura 11.* Estructura química. Timol.

El timol también es usado en formulaciones de repelente de mosquitos, y debido a origen natural se lo intenta vincular con tratamientos naturales para el dolor de cabeza y otras dolencias comunes, por lo cual también se le atribuyen excelentes características farmacológicas. Algunas de sus más importantes propiedades investigadas con resultados favorables son, su desempeño como antioxidante, cicatrizante, antiséptico, antibacterial, antiinflamatorio, anestésico, y algunos beneficios sobre el sistema cardiovascular (Marchese et al., 2016).

**Eugenol.** El eugenol se encuentra formando parte, como componente mayoritario del aceite esencial de clavo. Este compuesto le atribuye el agradable aroma que lo caracteriza. También se lo puede encontrar en algunas plantas como la canela, cedro, y aquellas que mantienen un carácter leñoso. Además, es uno de los compuestos más importantes en las investigaciones referentes a tratamientos médicos para tratar muchas afecciones importantes como cáncer y trastornos neurológicos (Pavithra & Research, 2014).

Debido a su aroma y actividad antioxidante es común encontrarlo en perfumes, y otros productos estéticos, además, es utilizado como antiséptico y anestésico por lo cual es utilizado en procedimiento de restauración oral. A pesar de sus variadas propiedades, usarlo de manera inapropiada puede provocar daños al sistema inmune y dar paso a mutaciones carcinógenas (Pavithra & Research, 2014).



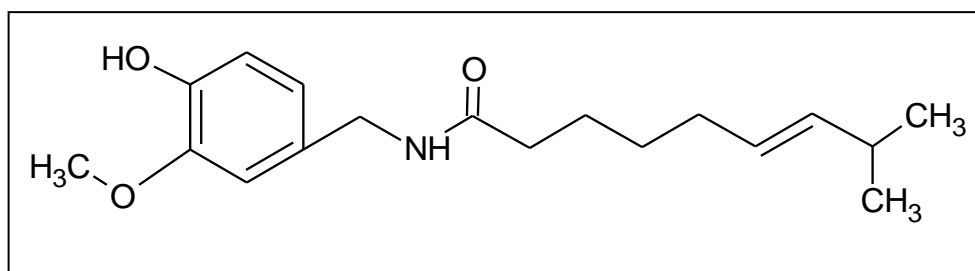
*Figura 12.* Estructura química. Eugenol.

En la actualidad, a pesar de su presencia de manera natural, también puede ser sintetizado por alquilación del guaiacol con cloruro de alilo para obtener un producto de iguales propiedades funcionales (Barceloux, 2008).

Este compuesto pertenece a la familia de los fenilpropanoides, el grupo fenólico (Figura 12), le confiere propiedades antioxidantes, es parcialmente soluble en agua e incrementa con solventes orgánicos. Se han encontrado diferentes resultados sobre su actividad antibacterial, fungicida, anticancerígena y antiparasitaria, lo cual lo convierte en un componente muy importante para el desarrollo de fármacos e investigaciones para la cura de diferentes enfermedades (Raja, Srinivasan, Selvaraj, & Mahapatra, 2015).

**Capsaicina.** Este compuesto es el componente activo que le da el carácter picante a frutos como el ají, pimiento y todas las variedades de ellos como el chile y todas sus derivaciones. Estos frutos pertenecen al género de los capsicum porque producen la sustancia conocida como capsaicina, por lo tanto, se encuentra de manera natural en ellos (Cedrón, 2013).

Es considerado un alcaloide natural por las modificaciones que causa en los neuropéptidos de la función cerebral, aunque el efecto es reversible, se continúa investigando algunas de sus propiedades farmacológicas. Hasta la actualidad se han demostrado capacidades analgésicas y aplicaciones neurológicas.

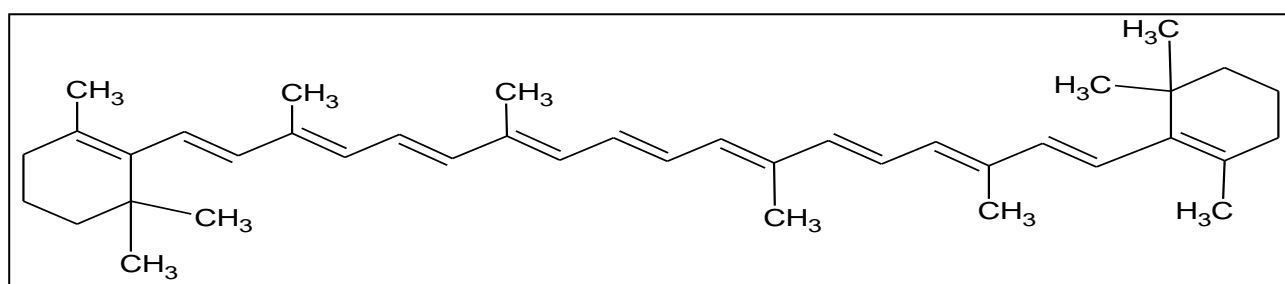


*Figura 13.* Estructura química. Capsaicina.

Este compuesto al contacto con la piel produce una sensación de ardor, y al ser un compuesto apolar, se debe evitar disolverlo con agua y más bien utilizar solventes grasos como la leche. Se cree que ha sido utilizada durante muchos años como medicina natural para tratar afecciones comunes. Al inicio, la extracción de este compuesto se la realizaba con solventes orgánicos, también existieron inferencias sobre la relación con los homólogos de este compuesto que se encontraban en menor proporción de manera natural y se descubrió que la hidrólisis de estos compuestos producía productos con las mismas propiedades físico químicas de las capsaicina natural (Cordell & Araujo, 1993).

**Carotenoides.** Esa familia de compuestos posee un color amarillento-anaranjado que los definen como pigmentos liposolubles. Se encuentran de forma natural en plantas, frutas y vegetales.

Los carotenos son hidrocarburos polienos con grados de insaturación variante, por lo cual al sufrir reacciones de hidroalquilación o epoxidación dan lugar a las xantofilas que son derivados de carotenos que contienen grupos de oxígeno.



*Figura 14.* Estructura química.  $\beta$ -Caroteno.

Existen alrededor de 600 carotenoides identificados, y el diez por ciento de ellos poseen la actividad biológica de la vitamina A, por este motivo son referidos como compuestos de provitamina A. El  $\beta$ -Caroteno (Figura 14) es el carotenoide de provitamina A más abundante encontrado en alimentos, y también posee la mayor actividad como vitamina A. Es sintetizado a partir de ocho unidades isoprenoides (Madhavi, Deshpande, & Salunkhe, 1995).

Además, los carotenoides pueden actuar como antioxidantes primarios o secundarios. La habilidad de estos compuestos para sofocar átomos de oxígeno está relacionada con el número de carbonos con doble enlace que presenta en su estructura. Son muy inestables y se debe tener precaución al añadirlos en alimentos. Su uso como antioxidante es limitado debido a que no es solubilizado fácilmente por solventes comunes y su estabilidad depende del calor, pH, y la presencia de metales (Akoh, 2017).



Los antioxidantes endógenos son aquellos que se originan naturalmente en el cuerpo humano y están presente de diferentes formas como las enzimas, las cuales desempeñan un papel muy importante en la restauración de células y tejidos. Por otro lado, los exógenos son aquellos que ya se han revisado, y proceden de fuentes ajenas a medios biológicos.

**Antioxidantes enzimáticos.** Los compuestos enzimáticos exhiben propiedades antioxidantes mediante la remoción de átomos de oxígeno o especies oxidantes del medio lípido, así se mantienen bajas concentraciones de estas especies. También actúan de forma biológica para eliminar radicales libres celulares. Las principales encimas que presentan este comportamiento son glucosa oxidasa, superóxido dismutasa (SOD), catalasa, y el glutatión peroxidasa.

La enzima de glucosa oxidasa remueve el oxígeno utilizándolo para producir ácido glucónico y peróxido de hidrogeno. El superóxido dismutasa (SOD) remueve los radicales superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ ) convirtiéndolo en oxígeno triplete. La catalasa convierte los peróxidos de hidrógeno en agua. Todos estas encimas se utilizan de forma comercial en muchos alimentos. (Akoh, 2017). Estudiar este tipo de antioxidantes es muy importante por su procedencia endógena. Las estimaciones de la actividad de estas encimas es difícil de llevar a cabo por las implicaciones que toma reproducir las condiciones en las que actúan (Sistemas biológicos).

**Proteínas y sustancias relacionadas.** Compuestos como aminas, aminoácidos e hidrolizados de proteínas poseen actividad antioxidante. Ha sido posible aislar algunos de estos compuestos a partir de recursos marinos. Los aminoácidos poseen habilidades quelantes, aunque también poseen actividad antioxidante representativa. Las proteínas y los hidrolizados de estas, poseen efectos antioxidantes. Péptidos obtenidos de forma sintética o como resultado de proteínas hidrolizadas, también poseen actividad antioxidante. (Akoh, 2017).

**Productos de reacción de Maillard.** Este tipo de compuestos son inhibidores de oxidación naturales que son obtenidos como resultado del procesamiento de ciertos productos comerciales.

Los productos de reacción de Maillard se forman durante la preparación de alimentos de baja humedad a temperaturas sobre los 80°C. Se producen como resultado de la reacción de aminos y reducción de azúcares. En las reacciones de Maillard también participan algunos lípidos, vitaminas y demás constituyentes de los alimentos.

Son considerados como productos seguros ya que se originan naturalmente en los alimentos y es común utilizarlos como saborizantes o en salsas. El uso de estos productos como antioxidantes ha sido estudiado por mucho tiempo. Sin embargo, todavía no se dispone de un entendimiento claro de los compuestos responsables de este comportamiento, y aún menos del mecanismo de acción con él se procede (Akoh, 2017).

Estos antioxidantes son muy importantes en el ámbito industrial, porque su evolución durante los procesos que conllevan el procesamiento de diversos productos ayuda que estos sean viables, seguros, y efectivos con respecto a la obtención de productos de calidad que satisfagan regulaciones de perdurabilidad.

**Fosfolípidos.** Al igual que en caso anterior, la acción de los fosfolípidos aún no es bien entendida. Se cree que los resultados obtenidos de actividad antioxidante entre diferentes fosfolípidos se deben a la variedad de estructuras y grupos funcionales que poseen. Las posibles acciones son actuar como antioxidantes primarios, quelación de metales, y la descomposición de hidroperóxidos. Los fosfolípidos han demostrado ser sinérgicos ya que su habilidad antioxidante está relacionada con el poder quelante que poseen (Akoh, 2017).

**Esteroles.** Investigaciones demuestran que los esteroles poseen actividad antioxidante. Se piensa que los esteroles interactúan con las superficies de aceite e inhiben la oxidación mediante la donación de átomos de hidrógeno. Este hecho, los incluiría dentro del grupo de antioxidantes cuya actividad es representada por un mecanismo (HAT), lo cual pone en duda si su comportamiento presenta alguna dificultad en diferentes condiciones de pH y temperatura.

**Dióxido de azufre y otros Sulfitos.** Los sulfitos son agentes reductores que poseen baja actividad antioxidante en alimentos, reaccionan con el oxígeno para formar sulfatos y promueven la formación de fenoles a partir de quinonas previniendo las reacciones de pardeamiento. Dióxido de azufre, sulfito de sodio, potasio, y metabisulfitos son los principales compuestos de esta categoría utilizados para preservar el sabor y color en bebidas y frutas (Akoh, 2017).

**Gomas.** Las gomas son usadas prioritariamente para mejorar efectos de textura, sin embargo, también poseen actividad antioxidante debida a quelación de metales, consumo de oxígeno e incremento del efecto viscoso. Muchos de estos compuestos se obtienen a partir de resinas de polisacáridos obtenidas de cortezas de árboles.

**Flavonoides y ácidos fenólicos.** Los componentes antioxidantes en plantas incluyen los homólogos de la vitamina E, carotenoides, proteínas, y una gran variedad de compuestos de carácter fenólico. Las plantas producen una gran variedad de metabolitos fenólicos que fácilmente se oxidan y tienen el potencial de minimizar la autooxidación. Los antioxidantes fenólicos más comunes en plantas son el ácido gálico, fenilpropanoides, ácidos dihidroxibenzoicos, y una mezcla de metabolitos como los flavonoides, ferulatos de alquilo, y suberinas.

Los flavonoides son los productos secundarios del metabolismo de las plantas y consisten en antocianinas, catequinas, flavonas, flavonoles, y proantocianidinas. Las estructuras polivalentes de los fenoles en los flavonoides pueden formar complejos con iones metálicos. También actúan como antioxidantes primarios y barredores de aniones superóxido (Rajalakshmi, Marasimhan, & Perspectives, 1995).

Los ácidos fenólicos están estructuralmente relacionados con los flavonoides y sirven como precursores de la biosíntesis de estos. La actividad antioxidante que desempeñan depende del sistema en el que se encuentran. Los esteres de ácido hidroxicianímico son más activos que los ácidos libres en sistemas que involucran al ácido linoleico (Foti, Piattelli, Baratta, Ruberto, & Chemistry, 1996). Flavonas y flavonoles se encuentran presentes en frutas en forma de glicósidos, también forman parte de vegetales, té, y vino. El contenido de compuestos fenólicos específicos puede ser bajo, lo cual hace necesario gran cantidad de material para obtener cantidades significantes de estos antioxidantes. Su uso puede ser limitado por el hecho de encontrarse en forma de glicósidos y su escasa solubilidad en aceites, además, algunos de estos compuestos son tóxicos (Akoh, 2017).

## **2.2. Actividad antioxidante**

El concepto de actividad antioxidante tiene su origen en la ciencia de los alimentos, la biología, medicina y epidemiología nutricional. Durante muchos años se han utilizado diferentes términos para referirse al comportamiento de los antioxidantes, es común encontrarse con términos como actividad antioxidante (AOA), capacidad antioxidante (AOC), poder antioxidante, potencial antioxidante y todos refieren a la habilidad de ciertos compuestos para prevenir o detener reacciones oxidativas que ocurren en las moléculas (Resat Apak, Capanoglu, & Shahidi, 2017).

Aunque los términos se utilizan indistintamente, cada uno refiere a dos cuestiones específicas según lo señalado por Reşat Apak et al. (2013). La actividad antioxidante involucra la cinética de las reacciones entre un antioxidante y un prooxidante o radical libre en cuanto a su reducción o barrido, por otro lado, la capacidad antioxidante cuantifica la eficiencia de conversión termodinámica de un oxidante frente a la reacción con un antioxidante.

La cuantificación de los niveles de actividad/capacidad antioxidante en alimentos y fluidos biológicos es llevada a cabo para realizar comparaciones representativas del contenido de antioxidantes de productos alimenticios y para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades asociadas al daño ocasionado por el estrés oxidativo (Reşat Apak et al., 2013).

### **2.3. Métodos generales para cuantificar la actividad antioxidante**

Las diferentes terminologías utilizadas para referirse a la actividad antioxidante también han dado paso a una gran variedad de términos utilizados para referirse a los diferentes métodos que se emplean para cuantificar la actividad antioxidante.

Muchos de los métodos que se conocen han sido desarrollado con el paso de los años, en tanto que otros, son resultado de experimentos derivados del mismo principio que rige en la mayoría de los métodos. Para cada caso, los resultados son mostrados con respecto a un compuesto de referencia, de esta manera, se estima la actividad antioxidante de una muestra equivalente al compuesto referencial empleado. Normalmente entre los métodos, se emplean antioxidantes de uso comercial como Trolox, ácido gálico, ácido ascórbico, como estándares de calibración. Su uso está acreditado por su estabilidad, rango lineal de concentración y la sensibilidad de los métodos a estos compuestos.

La mayoría de los métodos actuales son limitados por el hecho de que excluyen su aplicación ha condiciones in vivo. Por tal razón es importante ser cuidadoso con la terminología utilizada para referirse a ellos. La mayoría de los ensayos son nombrados en base a los reactantes que se utilizan, el mecanismo de reacción o la técnica de análisis empleada. La siguiente tabla resume la mayoría de los métodos empleados con las respectivas abreviaciones para referirse a ellos.

**Tabla 4**

*Nomenclatura de los diferentes ensayos para evaluar la actividad antioxidante.*

<b>Nombre de los ensayos</b>	<b>Abreviaciones</b>
Ensayo de capacidad de absorbancia de radical de oxígeno.	<b>ORAC</b>
Ensayo de parámetro de captura de radicales libres.	<b>TRAP</b>
Ensayo de capacidad de barrido de oxoradicales totales.	<b>TOSC</b>
Ensayo de poder antioxidante ferro reductor.	<b>FRAP</b>
Ensayo de capacidad antioxidante reductora de cobre.	<b>CUPRAC</b>
Ensayo de capacidad antioxidante reductora de Ce (IV).	<b>CERAC</b>
Ensayo de capacidad antioxidante reductor de Cr (VI).	<b>CHROMAC</b>
Ensayo basado en voltametría cíclica.	<b>CV</b>
Ensayo basado en pulso diferencial.	<b>DPV</b>
Ensayo basado en voltametría de onda cuadrada.	<b>SWV</b>
Ensayo basado en electrodo de mercurio.	<b>DME</b>
Ensayo basado en nanopartículas de plata.	<b>SNPAC</b>
Ensayo basado en nanopartículas de oro.	<b>Au NPs</b>
Ensayo de capacidad antioxidante en equivalente de Trolox empleando radical ABTS.	<b>ABTS</b>
Ensayo de capacidad de barrido de radicales empleando el radical DPPH.	<b>DPPH</b>
Ensayo de capacidad de barrido de radicales empleando el radical DMPD.	<b>DMPD</b>
Ensayo basado en quimioluminiscencia de luminol.	<b>PCL</b>
Ensayo de sustancias reactivas del ácido ti barbitúrico.	<b>TBARS</b>
Método de evaluación en tiempo real.	<b>RT-PCR</b>
Ensayo inmunosorbente de enzimas.	<b>ELISA</b>
Cromatografía líquida de alta resolución.	<b>HPLC</b>
cromatografía de gases.	<b>GC</b>
Espectrometría de masas.	<b>MS</b>

Fuente: (Resat Apak et al., 2017)

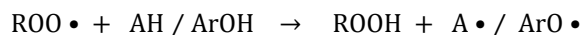
Otro modo de clasificarlos es de acuerdo a su aplicación in vivo o in vitro, de esta forma es posible enfocar estudios sobre actividad antioxidante en sistemas biológicos.

Los diferentes criterios de clasificación son útiles para campos de estudio específicos, aunque con fines prácticos se puede encontrar que la clasificación por el tipo de interacción que sucede entre los compuestos de esta naturaleza y los compuestos radicalarios es la más apropiada para diferenciar los métodos de cuantificación. Tal como se menciona en Sahu and Saxena (2013), una clasificación básica de los ensayos para determinar la actividad antioxidante se puede dar por el mecanismo de acción.

- Ensayos basados en transferencia de átomos de hidrógeno (HAT).
- Ensayos basados en la transferencia de un electrón (SET).

### 2.3.1. Ensayos basados en la transferencia de átomo de hidrógeno (HAT)

Este tipo de ensayos cuantifican la capacidad de un antioxidante para sofocar radicales libres mediante la donación de un átomo de hidrógeno. En especial se refiere a radicales peroxil puesto que son más relevantes por su manifestación en sistemas biológicos. El mecanismo consiste en la transferencia del átomo de hidrógeno del antioxidante hacia el radical peroxil.



***Ecuación 1.*** Reacción con mecanismo HAT.

El radical aromático formado es estabilizado por resonancia. Los antioxidantes efectivos deben reaccionar más rápido que las biomoléculas con los radicales libres para protegerlas de la oxidación (Resat Apak et al., 2017). Los ensayos más utilizados que se involucran este tipo de mecanismo son ORAC, TRAP, y TOSC (tabla 4).

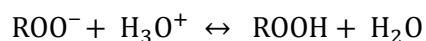
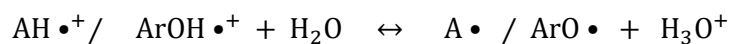
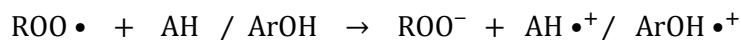
Los ensayos basados en el mecanismo HAT poseen un enfoque de fase de retardo, lo cual se refiere a la medición del tiempo de retardo para la iniciación de la conversión oxidativa, de esta forma se cuantifica la actividad antioxidante. Sin embargo, se pueden obtener resultados erróneos si se utiliza este criterio para todos los casos debido a que no todos los antioxidantes poseen una fase de retardo. Los antioxidantes que poseen esta característica deberían tener una velocidad constante, frente al radical analizado, mayor que la velocidad con la que el radical promueve la oxidación de tal forma que cuando la oxidación sea observable el antioxidante se haya consumido en su totalidad (R. a. Apak, Özyürek, Güçlü, Çapanoğlu, et al., 2016).

Algunas ambigüedades también pueden generarse debido a la observación del punto final reportada por diferentes estudios. En ensayos que utilizan una sonda fluorescente basados en HAT para determinar la actividad antioxidante se realiza por la evaluación de cinéticas competitivas debido a que tanto la sonda como el antioxidante reaccionan con el radical libre (ROO•). Se mide el decaimiento fluorescente de la curva de la sonda en ausencia y presencia de antioxidantes e integrando el área bajo estas curvas. La diferencia del área bajo la curva entre la muestra y un blanco se relaciona con la concentración de antioxidantes en la muestra. (R. a. Apak, Özyürek, Güçlü, Çapanoğlu, et al., 2016).

### **2.3.2. Ensayos basados en la transferencia de electrón (SET)**

En este tipo de ensayos la acción antioxidante en contra de radicales peroxil es simulada con un medio sutil de potencial redox, la cual puede tratarse de un medio fluorescente o coloreado que actúa como agente oxidante. Los ensayos que se basan en este mecanismo determinan la capacidad de un antioxidante para transferir un electro para reducir iones metálicos, carbonilos, y radicales. El mecanismo de estas reacciones se explica a continuación.





***Ecuación 2.*** Reacción con mecanismo SET.

Las reacciones en este caso son relativamente más lentas que las que se presentan con mecanismos HAT, además, dependen del pH y el tipo de solvente que se utiliza.

En las reacciones anteriores el radical ariloxil ( $\text{ArO}\cdot$ ), es oxidado a la correspondiente quinona ( $\text{Ar}=\text{O}$ ) y mientras más estabilizado se encuentre el radical, más fácil es oxidarlo debido a su bajo potencial redox (Resat Apak et al., 2017).

Los compuestos fenólicos poseen grupos OH débilmente ácidos que se disocian fácilmente a valores altos de pH, por lo tanto, son más susceptibles a la oxidación. La mayoría de las reacciones de transferencia de electrones ocurren con mayor velocidad a valores altos de pH.

Los ensayos de esta naturaleza se pueden entender mejor por el hecho de que los antioxidantes son buenos agentes reductores capaces de realizar la sofocación reductiva de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno (ROS/RNS), aunque los ensayos que manejan este tipo de mecanismo no se los realiza con relevancia biológica como los radicales peroxil ( $\text{ROO}\cdot$ ), en lugar de ellos se utilizan medios artificiales que cambian de color.

## **2.4. Métodos empleados para el análisis de respuesta a la actividad antioxidante**

Los ensayos más conocidos para determinaciones in vitro utilizan la técnica de espectrofotometría basada en colorimetría de soluciones, en donde el monitoreo del cambio de color a una longitud de onda característica permite obtener curvas de regresión que relacionan la concentración del compuesto de interés con la absorbancia medida. El rango del espectro electromagnético utilizado para la mayoría de estos ensayos va desde 400 nm hasta 800 nm, lo cual incluye parte de la región infrarroja y visible. Este tipo de ensayos determinan la capacidad de un antioxidante para reducir un oxidante, cuya reducción es cuantificable por el cambio de color.

La concentración de antioxidantes en la muestra está relacionada con el grado en el que cambia de color el sistema simulado y es cuantificable dependiendo de si la absorbancia incrementa o reduce a longitudes de onda específicas.

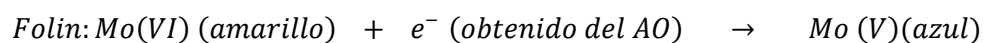
Este fenómeno sucede para ambos mecanismos revisados en las secciones previas. A pesar de existir varios ensayos que se basan en mediciones espectrofotométricas, solo se revisaran los utilizados en este proyecto.

### **2.4.1. Método de Folin-Ciocalteu (F-C)**

Este método fue inicialmente desarrollado para el análisis de proteínas; en donde la reactividad del compuesto hacía que el residuo de proteína de tirosina (contiene un grupo fenol) manifestara un cambio de color relacionado con la concentración de esta en el sistema (R. a. Apak, Özyürek, Güçlü, Çapanoğlu, et al., 2016).

El ensayo se basa en la oxidación de compuestos fenólicos en solución alcalina mediante el reactivo de heteropolianión de fosfotungstato y fosfomolibdato ( $P_2 Mo_5 W_{13} O_{62}^{6-}$ ) conocido como reactivo de Folin -Ciocalteu, que da paso a un producto oxidado de color azul que absorbe a longitudes de onda máxima entre 750 – 765 nm. Este método es utilizado para realizar análisis que permiten estimar el contenido total de compuestos fenólicos en una muestra y es común clasificarlo como un método cuyo ensayo está basado en mecanismo (SET) (Resat Apak et al., 2017).

El agente oxidante es el heteropolianión cuyo centro activo hipotético del reactivo es el Mo (VI) cuya reducción a Mo (V) provoca la coloración azul de la solución. La reacción conocida es la siguiente.



**Figura 15.** Principio de reacción del método de Folin Ciocalteu.

Este método a pesar de ser el más empleado todavía no desconoce la naturaleza química y el potencial redox del reactivo. Está claro hasta el momento que es un agente oxidante y que puede oxidar otros compuestos además de los fenólicos. El reactivo de FC convencionalmente solo es aplicable con antioxidantes hidrosolubles, y opera en condición estricta de pH alto.

Algunas limitaciones de este método se deben al hecho de que algunos compuestos fenólicos se encuentran en formas disociativas, es decir como bases conjugadas, principalmente aniones fenólicos y al trabajar a un valor de pH elevado, estos compuestos se oxidan fácilmente con el reactivo de FC y por lo tanto puede existir un valor de actividad antioxidante sobrestimado (R. a. Apak, Özyürek, Güçlü, Çapanoğlu, et al., 2016).

El método utilizado en esta investigación se basa en los resultados presentados por Prior, Wu, Schaich, and chemistry (2005), en donde se proporciona el enfoque sobre la estandarización de los métodos utilizados para determinar la capacidad antioxidante en alimentos y suplementos dietéticos.

El ensayo de FC presentado en dicha investigación se basa en el método mejorado propuesto por Singleton, Rossi, and Viticulture (1965), donde se señalan condiciones explícitas bajo las cuales el ensayo proporciona resultados confiables y comparables. Estas condiciones fueron consideradas para llevar a cabo el ensayo respectivo en esta investigación con la inclusión de ciertas modificaciones debido al manejo de volúmenes y propósitos del proyecto. Las consideraciones por tomar indiscutiblemente son las siguientes.

- La relación reactivo FC / solución alcalina debe ser adecuada.
- Se debe procurar una temperatura adecuada y control del tiempo de reacción para el desarrollo del color.
- El monitoreo de la densidad óptica se la realiza a 765 nm.
- Se debe utilizar ácido gálico como estándar de referencia para la cuantificación.

Los pasos explícitos a seguir durante el desarrollo del ensayo para disminuir variaciones y evitar errores según lo expuesto en Singleton et al. (1965), se describen a continuación.

Se mezcla 1 mL de muestra diluida apropiadamente con al menos 60 mL de agua y 5 mL de reactivo FC, después de 30 segundos y antes de 8 minutos, añadir 15 mL de solución alcalina de carbonato de sodio, mezclar y llevar a un volumen final de 100 mL con agua. Incubar por 2 horas a 75° F y llevar a cabo la medición de absorbancia.

En la metodología explicada para este ensayo, en esta investigación se maneja la relación de volúmenes pertinente para cumplir con lo antes expuesto.

#### **2.4.2. Método TEAC/ABTS•<sup>+</sup>**

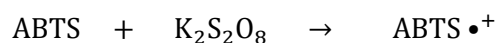
Este ensayo también conocido como TEAC/ ABTS utiliza el intenso color que caracteriza al radical ABTS•<sup>+</sup> formado a partir del compuesto ABTS (ácido 2,2'-acino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) como recurso colorimétrico. El radical presente en el medio manifiesta su interacción con el compuesto antioxidante por ambos mecanismos SET y HAT, por eso al igual que en el caso de ensayo con radical estable DPPH, son métodos basados en mecanismos mixtos.

Los métodos de análisis que utilizan el Trolox como reactivo de referencia para presentar la concentración de antioxidantes encontrada usualmente son denominados métodos TEAC que hacen referencia a la actividad antioxidante reportada en unidades equivalentes al Trolox (ug Trolox/ 100 gr de muestra, mol Trolox / ml de sustancia, etc.).

El radical recibe tanto el electrón como el átomo de hidrógeno del compuesto antioxidante dando paso a su existencia como forma reducida ABTS lo cual a su vez ocasiona una disminución en la intensidad del color que es cuantificable mediante valores de absorbancia a la longitud de onda característica. La actividad antioxidante en este caso se interpreta en este caso como la habilidad que tiene el compuesto para disminuir el color del radical ABTS•<sup>+</sup> mediante la interrupción de la oxidación inicial evitando la producción del radical o reaccionando directamente con el radical catión ya formado. Se ha demostrado que los resultados pueden cambiar dependiendo del tipo del agente oxidante utilizado para formar el radical catiónico del color característico (R. a. Apak, Özyürek, Güçlü, Çapanoğlu, et al., 2016).

La preformación del mono catión (ABTS $\bullet^+$ ) es generada por la oxidación del ABTS con persulfato de potasio para luego ser reducido en presencia de un antioxidante capaz de donar un electrón o un átomo de hidrógeno.

La solución de trabajo donde se forma el radical se prepara en base a la siguiente reacción.



**Ecuación 3.** Formación de radical ABTS $\bullet^+$

La interacción con los compuestos antioxidantes toma lugar como se muestra a continuación. Como se puede notar en la ecuación 4, este método involucra tanto la transferencia de electrones como la de átomo de hidrogeno, por lo que también es conocido como un método que emplea ambos mecanismos en su principio de reacción.



**Ecuación 4.** Interacción de AO con el radical ABT $\bullet^+$ .

De acuerdo a la contribución presentada por Re et al. (1999), este ensayo basado en decoloración, es aplicable tanto a antioxidantes liposolubles como hidrosolubles por lo tanto puede ser utilizado para el análisis de flavonoides, hidroxicinamatos, carotenoides, y antioxidantes en plasma. Además, el estudio señala notables mejoras al procedimiento experimental que permiten obtener resultados confiables, por este motivo se considera la metodología propuesta en este estudio para obtener la respuesta experimental de los diferentes antioxidantes empleados en este proyecto. Conforme a lo expuesto, el ensayo revisado se describe a continuación.

Para iniciar, el compuesto inicial ABTS es disuelto en agua a una concentración 7 mM. La generación del radical se realiza mezclando la solución anterior con una solución de persulfato de sodio a una concentración final 2.45 mM y permitiéndole reaccionar en la oscuridad por al menos 16 horas. El radical formado es estable en esta forma por dos días. Para realizar el ensayo de cuantificación, la solución de radical  $ABTS^{\bullet+}$  se diluye con etanol hasta alcanzar una absorbancia de 0.7 ( $\pm 0.2$ ) a 734 nm. La preparación de las muestras a analizar utiliza etanol como diluyente. Para llevar a cabo las mediciones, se añade 1 mL de solución  $ABTS^{\bullet+}$  diluida a 10 uL de solución antioxidante cubriendo un rango de concentraciones entre 0-15uM. La absorbancia se registra después de 1 min de la mezcla inicial y después de 6 minutos de haber dejado reaccionar la mezcla (Re et al., 1999).

El procedimiento descrito en el párrafo anterior es utilizado para la obtención de las diferentes respuestas experimentales de cada estándar antioxidante. La metodología descrita para el desarrollo de este ensayo considera ciertas modificaciones con respecto al rango de concentración analizado para cada estándar debido a unos reaccionan más rápido que otros y se puede no cumplir los pasos mencionados para la obtención de resultados apropiados.

### 2.4.3. Método de radical estable DPPH•

El radical estable DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) presenta un color púrpura intenso en solución con metanol, y el cambio en la intensidad de este se debe a la reacción con compuestos capaces de transferir un átomo de hidrógeno (HAT) y al igual que en el caso anterior con el radical ABTS•<sup>+</sup>, el radical DPPH• también interactúa mediante los mecanismos SET y HAT.

Este ensayo es conocido por ser muy accesible por su simplicidad, por lo cual también es el más empleado en las determinaciones in vitro (Alam, Bristi, & Rafiquzzaman, 2013).

La reducción del radical, como se indica en la siguiente reacción, es analizada mediante el monitoreo de la absorbancia a la longitud de onda característica (515nm).



**Ecuación 5.** Reacción de radical DPPH• con AO.

Normalmente, se conoce que el ensayo se realiza disolviendo una cantidad de DPPH en metanol o etanol para luego registrar la absorbancia inicial del radical formado DPPH•, después una alícuota del antioxidante o muestra a probar es añadida y la mezcla es incubada por 30 minutos en la oscuridad para finalmente registrar la absorbancia medida. Sin embargo, de acuerdo con lo señalado en Reşat Apak et al. (2013), los protocolos que intentan que las reacciones de este tipo se completen en su totalidad considerando largos periodos de incubación enfatizan la estequiometría a expensas de la velocidad de reacción. Este enfoque no es útil para realizar una evaluación efectiva de la actividad antioxidante porque si la velocidad de reacción de un compuesto antioxidante no es comparable con la velocidad conocida o el tiempo de vida del radical de referencia sea DPPH• u HO•, o radicales lípidos, la sofocación de los radicales no ocurrirá.



Velocidades de reacción lenta con el radical estable DPPH• se pueden detectar experimentalmente. Sin embargo, el hecho de que ocurra de ese modo hace que la capacidad de sofocar de radicales de vida corta como los lipídicos o radicales hidroxilo en alimentos sea cuestionable. Así el ensayo DPPH debe ser enfocado en determinar procesos próximos que son más probables de ser activados con radicales inestables como HO•, HOO•, LO(O)•, y NO•. Esto quiere decir que las mediciones deben llevarse a cabo preferiblemente después de 4 minutos de haber completado la mezcla y no más de 6 – 10 minutos (Reşat Apak et al., 2013).

El método utilizando este radical presentado por Brand-Williams, Cuvelier, Berset, and Technology (1995) es aceptado para la evaluación en alimentos y bebidas. Además, el procedimiento descrito en el estudio ha sido corroborado por colaboraciones adicionales, las mismas que han sido utilizadas para realizar algunas modificaciones al ensayo empleado en este proyecto. Las consideraciones por tomar en cuenta para el desarrollo del ensayo son las siguientes.

Puesto a que el rango de precisión de las mediciones espectrofotométricas está dentro del rango de 0.221 – 0.698 (20-60% transmitancia), la correspondiente solución purpura de radical DPPH• debe poseer una concentración entre 25 – 70 uM. El solvente preciso para este método es el metanol tanto para el radical como para las muestras a analizar (Sharma & Bhat, 2009). Como se mencionó antes el tiempo para llevar a cabo el registro de la absorbancia debe ser entre 4 y 10 minutos. Y las soluciones de trabajo de radical DPPH deben prepararse antes de cada análisis. Además, durante las mediciones es importante dejar que la reacción proceda en ausencia de luz para evitar sesgos en las mediciones, y un control correcto del tiempo y la muestra de control es recomendable para controlar la veracidad de los resultados.

#### **2.4.4. Método Fotoquimioluminiscencia (PCL)/ Photochem®**

Este método de análisis es uno de los más importantes que existen para evaluar la actividad antioxidante porque el principio que utiliza considera los principios biológicos de los antioxidantes.

Las determinaciones de algunos de los antioxidantes más relevantes como el ácido ascórbico, vitamina E, o aquellos de origen endógeno se ha investigado de diversas formas. Sin embargo, estas determinaciones solo pueden ser interpretadas con dificultad debido a que se generan ambigüedades por la actividad biológica y bioquímica, y el hecho de que las causas incontrolables de la naturaleza no oxidativa influencia en la síntesis endógena, absorción, y excreción de los compuestos antioxidantes (Popov & Lewin, 1999).

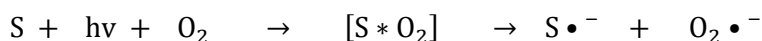
La medición del efecto antioxidante en un sistema de prueba especial puede servir como alternativa relevante para determinaciones selectivas de compuestos individuales presentes en sustratos biológicos. Un sistema de este tipo debe estar formado por dos componentes. El generador de radicales libres, y un sistema de detección para radicales que permita su cuantificación mediante una señal de respuesta. Se pueden utilizar diferentes medios físicos de generación de radicales como radiólisis, fotólisis, electrólisis, etc. Medios fisicoquímicos como la descomposición térmica de compuestos nitrogenados, generación fotosensible), o medios químicos o bioquímicos de diferente complejidad para las diferentes enzimas. El efecto de los antioxidantes puede ser detectado mediante la medición del consumo de oxígeno ( $O_2$ ), absorción de la luz, conductividad eléctrica, fluorescencia, y quimioluminiscencia (Popov & Lewin, 1999).

Entonces, desde el punto de vista biológico los radicales libres más importantes deben ser analizados y generados bajo condiciones biológicas para llevar a cabo la determinación de los antioxidantes biológicos.

Ahora bien, ninguna de esas condiciones se conoce con absoluta precisión a excepción del proceso de oxidación iniciador del radical. La reactividad de estos radicales con los antioxidantes depende de los parámetros fisicoquímicos del medio.

Por el momento, las determinaciones antioxidantes en medios biológicos son solo posible en casos excepcionales. Entonces, se pone en práctica un enfoque que combina la actividad antioxidante con respecto al grado de daño oxidativo. Esto es realizado mediante la generación fotoquímica de radicales libres que se realiza en el ensayo de quimioluminometria, mejor conocido como ensayo de quimioluminiscencia foto inducida o por sus siglas en inglés PCL.

Este ensayo se basa en la aceleración de al menos 1000 veces las reacciones de oxidación que se analizan en sistemas in vitro en condiciones normales, lo cual es logrado por excitación óptica de un sutil compuesto fotosensible (S) que de forma exclusiva genera el radical superóxido ( $O_2\cdot^-$ ) y no genera la forma reactiva del Oxígeno molecular ( $O_2$ ). La interacción procede de la siguiente manera



**Ecuación 6.** Interacción del compuesto fotosensible con radiación para generar radicales.

Fuente:(Popov & Lewin, 1999).

Los radicales libres son visualizados con un reactivo de detección quimioluminiscente que para este caso se utiliza el compuesto conocido como Luminol que desempeña un doble papel como compuesto fotosensible y como reactivo de detección de radicales de oxígeno.

El equipo empleado en este proyecto para la realización de este ensayo se denomina Photochem (Figura 18), y su funcionamiento se centra en el principio quimioluminiscente ya mencionado.



**Figura 16.** Photochem.

Fuente: Petke, Maggiora, Shipman, and Christoffersen (1979)

En la investigación presentada por Popov and Lewin (1999), se proporciona los tipos de reactivos dependiendo del tipo de compuestos que se van a analizar (liposolubles, hidrosolubles) y volúmenes necesarios de cada uno para el desarrollo del ensayo en este equipo. También se puede encontrar la misma información en el manual del usuario del equipo. La siguiente tabla muestra el manejo de volúmenes para la determinación de actividad antioxidante de compuestos liposolubles.

**Tabla 5**

*Composición del medio de reacción para análisis de compuestos liposolubles. Photochem.*

	Rx1(Metanol)	Rx2 (Buffer)	Rx3 (Luminol)	Rx4 (estándar)	Muestra
<b>Blanco</b>	2300	200	25	-	
<b>Calibración</b>	2300 - X	200	25	X	
<b>Medición</b>	2300- Y	200	25	-	Y

Fuente: (Popov & Lewin, 1999)

Durante las mediciones, la solución irradiada es transferida a la cámara de medición donde se determina la quimioluminiscencia. Inmediatamente después de iniciar la irradiación, la intensidad de lo quimioluminiscencia foto inducida incrementa y aproximadamente un minuto después alcanza su valor máximo para luego disminuir lentamente, así, el cambio de la señal en presencia de antioxidantes permite la cuantificación. El parámetro de evaluación para compuestos hidrosoluble se basa en la fase de retraso (L). Lo y L1 representan los parámetros para el blanco y la muestra respectivamente.

$$L = L_0 - L_1$$

**Ecuación 7.** Criterio de fase de retraso.

Fuente:(Popov & Lewin, 1999)

Por otro lado, el parámetro de evaluación para compuestos liposolubles es el grado de inhibición PCL, denotado por I, el cual es calculado a partir de la siguiente ecuación.

$$I = 1 - \frac{S}{S_0}$$

**Ecuación 8.** Criterio de Inhibición.

Fuente: (Popov & Lewin, 1999)

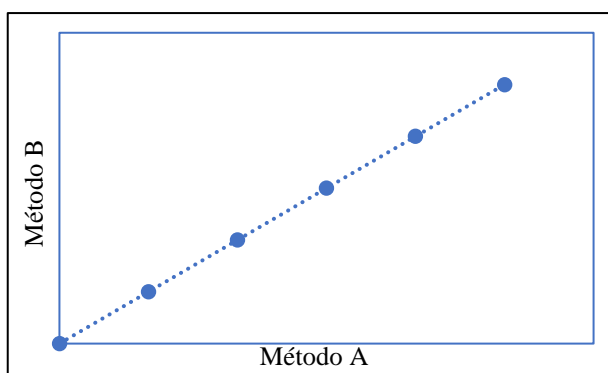
Así,  $S_0$  representa la integral bajo la curva de la señal del blanco y S la integral bajo la curva de la señal de la muestra. La curva de calibración para compuestos hidrosolubles es lineal, en tanto que para compuestos liposolubles se puede linealizar representándola mediante argumentos recíprocos (Popov & Lewin, 1999).

### 2.5. Curvas de calibrado para comparar métodos analíticos.

Los resultados de diferentes métodos analíticos pueden ser comparados con los resultados obtenidos por otro método analítico, lo cual es particularmente útil cuando se requiere identificar errores sistemáticos para validar métodos analíticos (James N Miller & Miller, 2002).

Al comparar dos métodos analíticos, los resultados obtenidos por uno de los métodos se usan para uno del eje del gráfico de regresión por otra parte, los resultados obtenidos por el otro método se ajustan al eje opuesto para completar la gráfica. Los resultados comparados son obtenidos de las mismas muestras o sustancias de referencia para ambos métodos. Cada punto de la gráfica obtenida representa una muestra única analizada por dos métodos distintos, para este caso correspondería a cada estándar antioxidante cuyos valores de actividad antioxidante obtenidos por dos diferentes métodos son comparables.

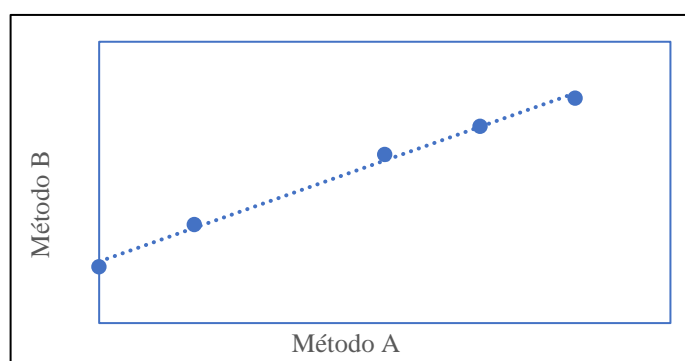
Las siguientes circunstancias son posibles. Si cada muestra coincide con resultados idénticos obtenidos por ambos métodos, la gráfica de regresión tendrá el valor inicial de ordenada en el origen (Cero), una pendiente respectiva con el coeficiente de correlación igual a 1. La figura que se muestra a continuación es una representación de lo mencionado, aunque en la realidad sería poco probable obtener un resultado tan exacto.



**Figura 17.** Correlación ideal entre métodos.

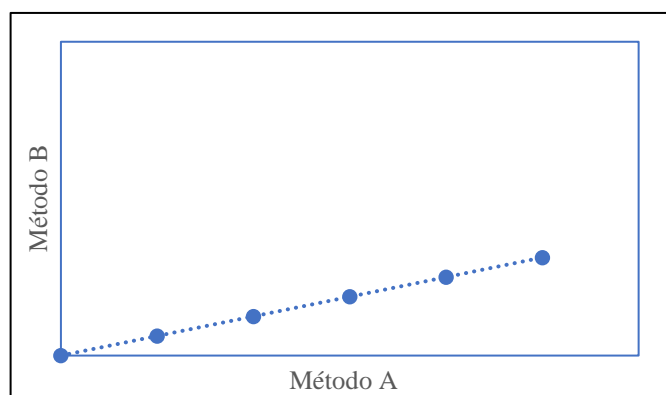
Fuente: (James N Miller & Miller, 2002)

Si se presentase el hecho de que, se tiene certeza de la ausencia de error sistemático, los errores aleatorios dan fe de que los resultados no darán una concordancia exacta para todas las muestras. Uno de estos casos sería que, aunque la recta posea una pendiente igual a uno, la ordenada no parta del origen, lo cual sugiere que uno de los métodos puede dar resultados más altos o más bajos uno con respecto al otro en una cantidad determinada (Figura 18). Este error está relacionado con el hecho de que la señal del blanco de uno de los métodos se estimó de forma equivocada.



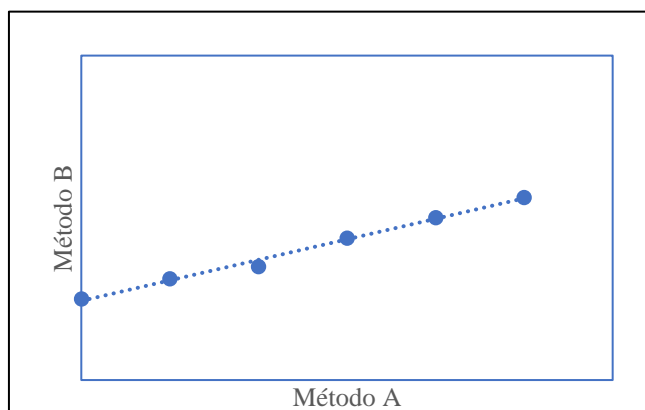
**Figura 18.** Primer caso de correlación entre métodos  
Fuente: (James N Miller & Miller, 2002)

Otro análisis, considera el hecho de que la pendiente de regresión de la recta sea mayor a 1 o menor a uno, en este caso es señal de error sistemático en la pendiente de una de las gráficas.



**Figura 19.** Correlación entre métodos con presencia de error sistemático.  
Fuente: (James N Miller & Miller, 2002)

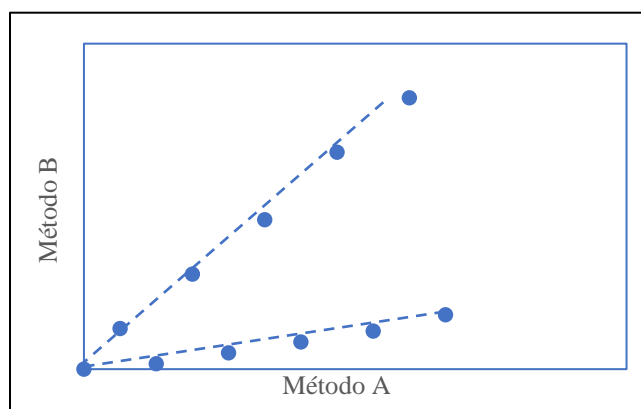
Si los errores anteriores suceden al mismo tiempo, como resultado se obtiene la gráfica mostrada en la figura 20.



**Figura 20.** Correlación entre métodos con estimación errónea del blanco y error sistemático.  
Fuente: (James N Miller & Miller, 2002)

Dos eventualidades adicionales también pueden ser identificadas con el análisis de estas gráficas. La primera, es que se dé el caso de estar tratando con un error de especiación, es decir un analito se encuentra en dos formas químicas diferentes en proporciones que varían de muestra a muestra. Aunque este no podría ser el caso en este proyecto puesto que tiene la certeza de que los compuestos analizados son estándares analíticos de calidad. Pero en cuyo caso, una gráfica de este tipo indicaría que uno de los métodos detecta una de las formas en las que se encuentra presente el compuesto de interés y el otro método otra de las formas en las que se puede presentar en la misma muestra.





**Figura 21.** Correlación entre métodos con caso de especiación.

Fuente: (James N Miller & Miller, 2002)

La validación estadística incluye contrastar si la ordenada que se supone en el origen difiere significativamente de cero y si la pendiente difiere significativamente de 1, como es habitual en estos casos se tienen pocos puntos para comparar por lo cual es recomendable utilizar contrastes al 95% de significancia. Los cálculos son reducidos utilizando un software para análisis de datos. (James N Miller & Miller, 2002).

Puede darse el caso de que el valor del coeficiente de correlación ( $r$ ) no se acerca 1, a pesar de que la pendiente no sea significativamente diferente de 1 y la ordenada de 0. Esto conduce a que existe poca precisión en uno o ambos métodos. Por tal razón, antes de realizar la comparación de los métodos es indispensable revisar la precisión de estos; que puede llevarse a cabo mediante el análisis de desviaciones estándar, límites de confianza o contrastes simples como para comparación de medias experimentales o datos emparejados (James N Miller & Miller, 2002).

## **2.6. Análisis de varianza**

La base del trabajo experimental llevado a cabo en este proyecto es obtener el valor de la pendiente correspondiente a la respuesta característica de cada estándar antioxidante en una curva de calibrado. El punto de interés radica en el contraste estadístico que se utiliza para comparar los resultados y realizar las comparaciones respectivas entre métodos.

A pesar del hecho de que existen programas para análisis de datos para realizar este trabajo, es importante mencionar como se analiza la variable de estudio para ser llevada a los programas de análisis, así, se revisan algunos detalles del análisis de la varianza para entender el modelo de análisis de varias medidas con respecto a una variable de respuesta (actividad antioxidante).

El análisis de la varianza (ANOVA) es una herramienta estadística ampliamente utilizada para separar y estimar posibles causas de variación, dicho de otro modo, permite separar la variación debida al error aleatorio de cualquier otra variación que sea provocada por el factor de control, de esta manera se puede contrastar si la un cambio en el factor de control produce diferencias significativas entre los valores medios obtenidos (James N Miller & Miller, 2002).

En este caso se emplea un ANOVA para contrastar comparaciones entre varias medias con respecto a un factor, es decir los valores obtenidos de cada estándar con respecto a la actividad antioxidante de estos. Al realizar este análisis se conocerá si la diferencia entre los diferentes valores obtenidos para cada compuesto es demasiado grande para explicarse mediante error aleatorio. Es necesario realizar las siguientes operaciones para hallar el estadístico F, y compararlo con el valor tabulado a determinado nivel de significancia (95%). El siguiente esquema se plantea para entender las fórmulas del ANOVA.

<b>Estandares</b>	<b>valores obtenidos de las diferentes replicas</b>	<b>Media (AOA)</b>
<i>Muestra 1(BHT)</i>	$X_{11} \quad X_{12} \quad \dots \quad X_{1j} \quad \dots \quad X_{1n}$	$\bar{X}_1$
<i>Muestra 2 (BHA)</i>	$X_{21} \quad X_{22} \quad \dots \quad X_{2j} \quad \dots \quad X_{2n}$	$\bar{X}_2$
<i>Muestra i (etc)</i>	$X_{i1} \quad X_{i2} \quad \dots \quad X_{ij} \quad \dots \quad X_{in}$	$\bar{X}_i$
<i>Muestra n (12 AO)</i>	$X_{h1} \quad X_{h2} \quad \dots \quad X_{hj} \quad \dots \quad X_{hn}$	$\bar{X}_h$
<i>Media Global. Gran total = T</i>		

**Figura 22.** Matriz de organización de resultados para análisis de varianza

El ANOVA de un factor contrasta la existencia de diferencias significativas entre medias cuando están presentes más de dos muestras. Las fórmulas que se utilizan son las siguientes.

### Tabla 6

*Consideraciones para el análisis de varianza de los resultados.*

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>
<b>Entre muestras</b> (Valores entre compuestos)	$\sum_i \frac{T_i^2}{n} - \frac{T^2}{N}$	$h - 1$
<b>Dentro de Muestras</b> (Valores del mismo compuesto)	$\sum_i \frac{X_i - \bar{X}}{n - 1}$	$(n - 1)$
<b>Total</b>	$\sum_i \sum_j X_{ij}^2 - \frac{T^2}{N}$	$N - 1$

N= n h = número total de medidas

Ti = Suma de las medidas en la i-ésima muestra.

T= Suma total de las medidas. Gran total.

Estadístico F se calcula según lo siguiente.

$$F = \frac{\text{Cuadrado medio entre muestras}}{\text{Cuadrado medio dentro de muestras}}$$

El valor crítico de F corresponde al valor tabulado utilizando los grados de libertad  $F_{h-1, N-h}$ . Como es de suponerse si el valor calculado de F es mayor que el valor crítico encontrado en tablas, se rechaza la hipótesis nula, que para el caso supondría que las medias muestrales no difieren significativamente. El software empleado para llevar a cabo de manera rápida el anterior análisis de varianza se conoce como XLSTAT donde además es posible realizar otros contrastes importantes para comparar entre pares de medias. Los métodos empleados para dar significancia estadística a los resultados son los siguientes y fueron desarrollados en el programa ya mencionado.

- ANOVA unifactorial para comparaciones múltiples.
- Comparaciones múltiples por pares para ANOVA unifactorial.

## CAPÍTULO III

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Equipos, materiales, y reactivos

Los diferentes materiales y equipos utilizados durante el desarrollo del proyecto son instrumentos y dispositivos de alta calidad que forman parte del inventario de los laboratorios de Petroquímica. La manipulación de estos involucra la instrucción previa sobre su funcionamiento y consideraciones de operación que deben ser tomadas en cuenta para la adquisición de datos.

Por otro lado, los diferentes reactivos empleados son de grado analítico y son empleados para la elaboración de los diferentes ensayos. Los compuestos antioxidantes de estudio son de grado estándar analítico de Sigma-Aldrich®.

#### 3.1.1. Equipos

- Espectrofotómetro UV-VIS BOECO S-220
- Balanza Semi micro analítica BOECO BBY 21
- Agitador BOECO Vortex V2H
- Purificador de Agua milli-Q BOECOpure
- Analizador de actividad Antioxidante PHOTOCHEM analytikjena®

#### 3.1.2. Materiales

- Micro espátula de acero inoxidable.
- Balones volumétricos de aforo. (250 mL, 100 mL, 50mL, 25mL, 10 mL)
- Vasos de precipitación. (25 mL, 50mL, 100mL, 400mL, 500mL)
- Cubetas transparentes de 1 cm.
- Micropipetas. (0.5-10 uL, 10 – 100 uL, 100-1000 uL, 1000-5000 uL)

### 3.1.3. Reactivos

#### A. Reactivos empleados para los ensayos

- Etanol
- Metanol
- Carbonato de Sodio
- Persulfato de Potasio
- Reactivo de Folin Ciocalteu
- ABTS
- Radical DPPH
- Reactivo 2. Photochem. Buffer.
- Reactivo 3. Photochem. Reactivo Foto sensible. Luminol

#### B. Estándares antioxidantes

La siguiente tabla muestra los diferentes estándares antioxidantes utilizados.

**Tabla 7**

*Estándares antioxidantes empleados.*

<b>Estándar</b>	<b>Número CAS</b>
<b>Ácido Gálico</b>	149-91-7
<b>Ácido Ascórbico</b>	50-81-7
<b>Trolox</b>	53188-07-1
<b><math>\beta</math>-Caroteno</b>	7235-40-7
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol</b>	10191-41-0
<b>Eugenol</b>	97-53-0
<b>Timol</b>	89-83-8
<b>Capsaicina</b>	404-86-4
<b>Hidroquinona</b>	123-31-9
<b>Resorcinol</b>	108-46-3
<b>BHA</b>	25013-16-5
<b>BHT</b>	128-37-0

## 3.2. Obtención de respuesta analítica.

### 3.2.1. Soluciones Stock

Se preparó 50 mL de solución stock para cada estándar antioxidante a excepción de capsaicina y eugenol cuyo volumen de solución stock fue de 25 mL. El solvente utilizado para todos los casos es el etanol 96%, y los cálculos están basados en la obtención de soluciones stock de 1000 ppm de concentración de estándar antioxidante, excepto para el caso de la capsaicina cuyo calculo fue realizado para la obtención de una solución de 500 ppm de concentración. Tomar en cuenta la rotulación correcta del material y el almacenamiento apropiado de las soluciones preparadas.

Es propicio señalar que los estándares antioxidantes deben ser manipulados con mucho cuidado y es muy importante que se encuentren almacenados a una temperatura adecuada (4°C) para minimizar los errores aleatorios y sistemáticos tanto como sea posible.

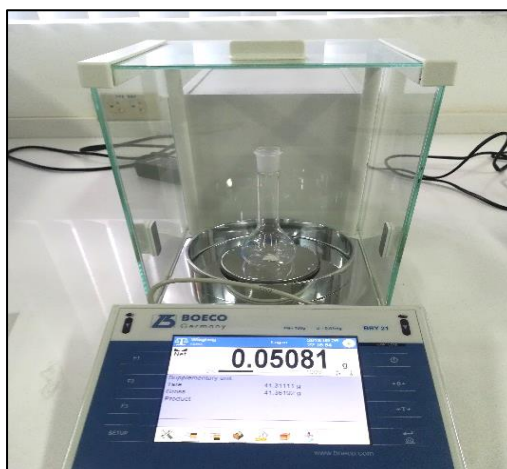
Se utilizaron micro espátulas optimizadas con etanol y aire comprimido para tomar las cantidades necesarias de estándar.



**Figura 23.** Estándares antioxidantes empleados.

El procedimiento empleado para preparar dichas soluciones se detalla a continuación.

- Se inicia preparando la balanza semi micro analítica cuya sensibilidad es de 0.01mg, se revisa la nivelación, las unidades, y el número de dígitos que muestra en la pantalla.
- A continuación, se procede a colocar un balón volumétrico de 50 mL en la balanza y se espera cierto tiempo hasta que el valor se estabilice.
- Una vez confirmado el valor, se encera la balanza y se toma la cantidad requerida de estándar con la ayuda de una micro espátula. Se requiere de minuciosidad para que el valor pesado sea muy próximo a 0.05 gr puesto que las soluciones deben ser de 1000 ppm de concentración. En la siguiente figura se muestra la cantidad pesada de ácido gálico. Como se puede notar, el peso difiere del deseado en la cuarta cifra significativa. Los valores reales son los utilizados para los demás cálculos.



**Figura 24.** Masa real de ácido gálico pesada.

- Se retira el balón de la balanza y se procede llenarlo con el solvente (etanol) hasta la marca de aforo.



- Tapar el balón y agitar de forma vigorosa por un minuto.
- Una vez realizado esto y después de verificar que no existen trazas sin disolver en la solución, etiquetar el balón, y almacenarlo a 4 °C.

Considerar lo siguiente para el estándar del  $\alpha$ -Tocoferol, y eugenol puesto que se encuentran en estado líquido.

- Las soluciones stock de estos estándares se preparan considerando las densidades de cada uno. Es decir, en el caso del  $\alpha$ -Tocoferol ( $\delta=0.950$  gr/mL) se toma el volumen necesario para alcanzar una masa de reactivo próximo a 0.05 gr. Por lo tanto, si se toman 53 uL (0.053 mL), se tienen 0.05035 gr de reactivo estándar que al ser diluido en 50 mL se obtiene una concentración de 1007 ppm.
- Para el caso del eugenol se utilizaron 25 uL de estándar de eugenol ( $\delta= 1.067$  gr/mL) ya que se prepararon 25 mL de solución stock con una concentración próxima a 1000 ppm.

En la siguiente figura se muestran las diferentes soluciones Stock preparadas a partir de los estándares antioxidantes. Estas son las únicas soluciones empleadas en los diferentes ensayos y fueron almacenadas a 4° C para mantener su estabilidad.



**Figura 25.** Soluciones stock de antioxidantes estándar. Concentración 1000 ppm.

### **3.2.2. Respuesta experimental a la actividad antioxidante con Folin Ciocalteu.**

El ensayo para evaluar la respuesta a la actividad antioxidante mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu se describe a continuación tomando como referencia el procedimiento descrito por Singleton et al. (1965), donde se establecen condiciones explícitas para obtener resultados aceptables.

- El reactivo de Folin-Ciocalteu está listo para ser usado. Se comprueba su espectro de absorbancia para verificar la longitud de onda donde se registra el mayor valor de absorbancia. Para esto es, es necesario realizar los siguientes pasos, y antes de realizar las mediciones se debe registrar el espectro de absorbancia de la solución azul formada para comprobar sus bandas de absorción. En este caso a 765nm, se aprecia el mayor pico de absorción.
- Preparar una solución de carbonato de sodio (7.5%). 37.5 gr de carbonato de sodio se disuelven en 500 mL de agua destilada.
- Para preparar la curva de calibración, se realiza en primer lugar una disolución previa de diferentes alícuotas de solución stock. El rango de concentración a obtener con esta dilución previa es de (0 – 40 ppm), en balones de 25 mL utilizando como diluyente agua mili Q.
- A continuación, se toman balones volumétricos de 10 mL para iniciar el ensayo y se los coloca al frente de cada balón de dilución previa preparada en el punto anterior.
- Se toma 2.5 mL de disolución previa para depositarse en cada balón de 10 mL respectivamente. El objetivo es que la concentración final este dentro del rango de (0-10 ppm) de cada estándar.

- Se procede a añadir a cada balón 1 mL de reactivo Folin- Ciocalteu. Se deja que reaccionen por una hora.
- Al cabo de una hora, añadir 5 mL de solución de carbonato de sodio (7.5 %) y completar el volumen con agua mili Q. Agitar la solución. Dejar reaccionar por una hora.



**Figura 26.** Curvas de calibración preparadas simultáneamente bajo el procedimiento de análisis del método Folin-Ciocalteu.

- Realizar las mediciones en celdas de 1 cm. Registrar los datos de absorbancia

### **3.2.3. Respuesta experimental a la actividad antioxidante con radical ABTS**

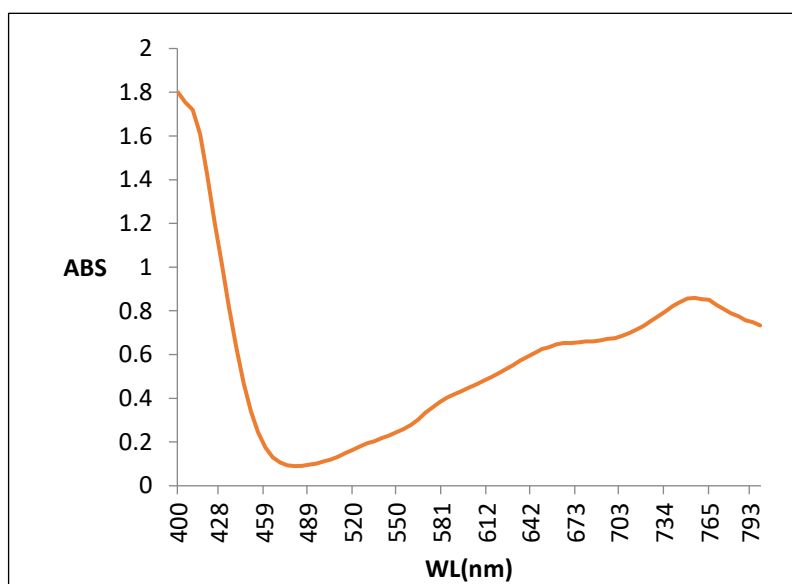
El siguiente procedimiento está basado en el descrito por Re et al. (1999). El ensayo supone un uso mejorado del radical ABTS para mediciones colorimétricas. Además, ciertas modificaciones han sido tomadas en cuenta ya que la investigación presentada por Reşat Apak et al. (2013) manifiesta argumentos razonables que permiten tomar en cuenta variaciones en la metodología del experimento.

El ensayo requiere además considerar el efecto que puede causar la exposición prolongada a una fuente de iluminación intensa, por lo cual es necesario disponer de espacio restringido de luz para almacenar las celdas durante el desarrollo del ensayo.

Las celdas utilizadas son de 1 cm, con capacidad de 3 mL, y el volumen de disolución final es de 2.5 mL, el cual es considerado para los cálculos. Además, es necesario contar con un cronómetro digital puesto que el registro de datos se lo realiza en intervalos específicos de tiempo.

- Para preparar la solución de trabajo de radical ABTS. Un día antes del ensayo, se prepara una solución 7 mM de ABTS disuelto en agua y se lo mezcla con una solución 2.45 mM (concentración final) de persulfato de potasio. Para un volumen de 50 mL de solución ABTS inicial, se requieren 0.192038 gr que debe ser mezclado con 50 mL de solución de persulfato de potasio que se obtiene disolviendo 0.0662 gr de dicho compuesto en agua. Almacenar la solución de radical preparado en la oscuridad al menos 16 h antes de iniciar el ensayo.
- Se disponen balones de 10 mL para realizar una predilución de deferentes alícuotas de solución stock de tal forma que se cubra un determinado rango de concentraciones. Por ejemplo, puesto a que se realizaron pruebas, se conoce que bajo el procedimiento descrito el rango de concentración final adecuado para el estándar de ácido gálico, hidroquinona, Eugenol, y BHA es de 0 a 1 ppm. El resto proporciona mediciones aceptables dentro del rango de 1 a 4 ppm de concentración final en la celda de medición.
- Una vez preparadas las diluciones a diferentes concentraciones, se sitúa en frente de cada balón una celda de medición en donde tomara lugar la reacción.

- Antes de manipular la solución de radical que se preparo es necesario identificar la longitud de onda donde se registra el mayor valor de absorbancia. La siguiente figura muestra el espectro de la solución de radical ABTS<sup>•+</sup> de trabajo empleado en el ensayo, se puede apreciar que el valor más alto ocurre a 740 nm.



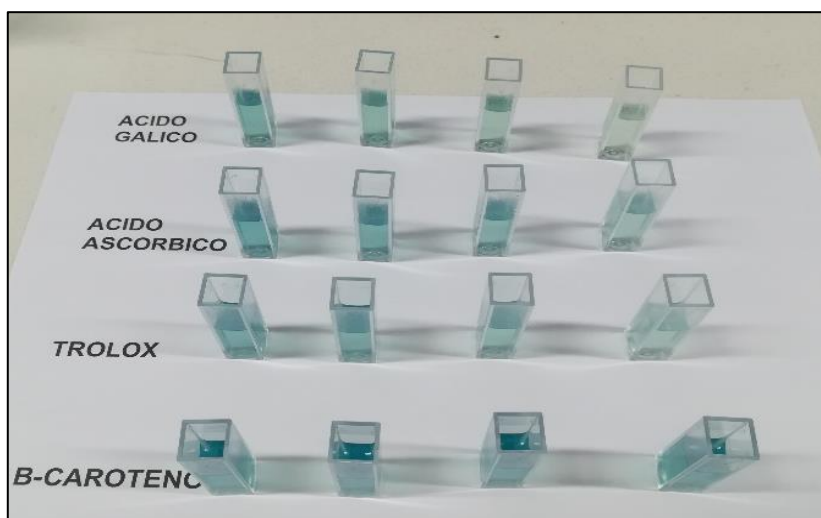
**Figura 27.** Espectro de absorción en el rango visible del radical ABTS<sup>•+</sup>.

- Antes de cada ejecución continua, se debe verificar que la absorbancia de la solución de trabajo de radical ABTS de un valor de  $0.7 \pm 0.02$ . La dilución, de ser necesaria, se la realiza con etanol.
- Utilizando micropipetas, añadir 2400 uL de solución de radical ABTS a cada celda e inmediatamente añadir 100 uL de cada balón respectivamente. Las soluciones finales cubren diferente rango de concentraciones como se mencionó antes.



**Figura 28.** Curvas de calibración preparadas simultáneamente bajo el procedimiento de análisis del método con radical  $ABTS^{\bullet+}$ .

- Ahora bien, esta parte es la más importante y requiere de precisión al momento de realizar las mediciones. Una vez añadido los primeros 100 uL a la primera celda se agita de forma leve en el vortex y se mide la absorbancia exactamente un minuto y seis minutos después. Los datos deben ser registrados.



**Figura 29.** Orden de las curvas en celdas para medición simultánea en el espectrofotómetro. Método  $ABTS^{\bullet+}$ .

- Registrar los datos, y verificar el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), obtenido para las diferentes curvas. Esto ayudara a identificar si la interacción es continua desde que inicia hasta los 6 minutos aproximadamente.

#### **3.2.4. Respuesta experimental a la actividad antioxidante con radical DPPH**

El procedimiento empleado para evaluar la respuesta a la actividad antioxidante de los reactivos estándar, mediante el uso del radical libre estable DPPH, se describe a continuación y está basado en la metodología descrita por Brand-Williams, Cuvelier, Berset, & Technology, (1995). Tomando en cuenta ciertas modificaciones que se han considerado como adecuadas, basados en investigaciones similares que seran mencionadas en los casos pertinentes.

Antes de iniciar con el procedimiento experimental que involucra el ensayo, es necesario conocer cual es el rango de concentración con el que se trabajará para cada reactivo estandar a ser evaluado, de esta manera se obtienen valores coherentes que pueden ser analizados ya que estan dentro de los parámetros propicios que satisfacen los requerimientos de exactitud y precisión en los análisis espectrofotométricos de esta categoría (Ayres, 1949).

Para el desarrollo del ensayo se debe considerar la concentración final medida, la cual se refiere a la concentración del estandar en la cubeta donde se prepara el entorno de reaccion cuyo cambio en la tonalidad del color va a ser medido con en el espectrofotómetro. Aclarado esto, es propicio mencionar que el volúmen de dilucion final utilizado en este ensayo es de 2.974 mL ( volumen constante al que siempre se llega en la cubetas individuales). Los volúmenes son manipulados con micropipetas BOECO con previa calibración.

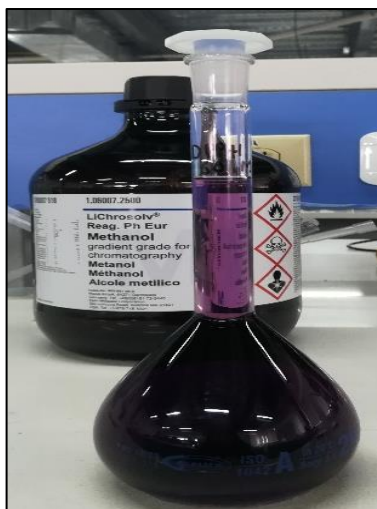
## Procedimiento

- Preparar las diferentes diluciones de concentración conocida a partir de las soluciones Stock para cada reactivo estandar. Se utilizan 4 balones volumetricos de 10 mL para cada reactivo estandar a evaluar.

Diferentes alicuotas de solución stock son llevadas a 10 mL con metanol en cada balon.

Los calculos son realizados siguiendo la clasica ecuación de dilucion.

- A continuación, se procede a preparar la solución de DPPH, cuya absorbancia inicial sea aproximadamente 0.6. Para este caso, la masa de radical pesada se fija de tal forma que la solución posea una concentración 60  $\mu\text{M}$  de radical DPPH. La solución es llevada a 250 mL con metanol y agitada de forma vigorosa.

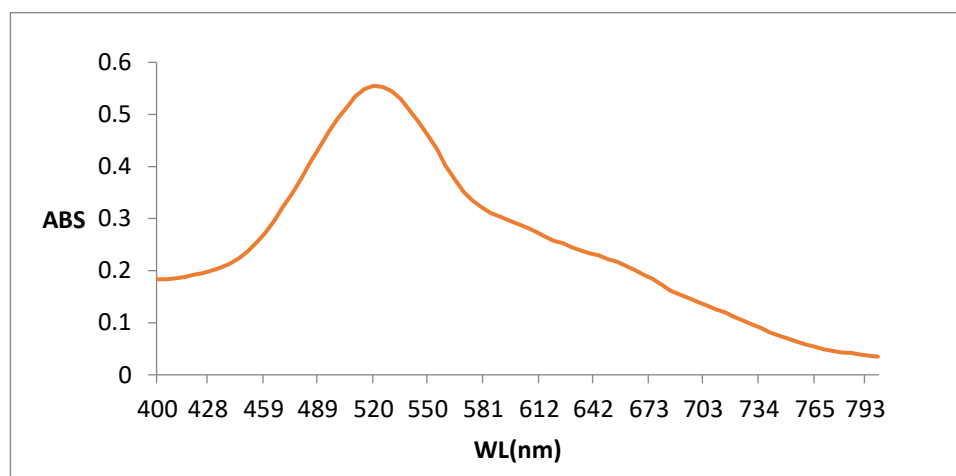


**Figura 30.** Solución 60  $\mu\text{M}$  de radical DPPH•.



- Una vez lista la solución de trabajo de DPPH y los balones de diferentes concentraciones de estándar se procede a la evaluación de la actividad antioxidante. Se utiliza cubetas transparentes de 3mL no sensibles a metanol. Se coloca 3 mL de solución de DPPH 60 uM en una cubeta para registrar su absorbancia inicial. El valor de absorbancia registrado debería dar un valor aproximado de 0.6.

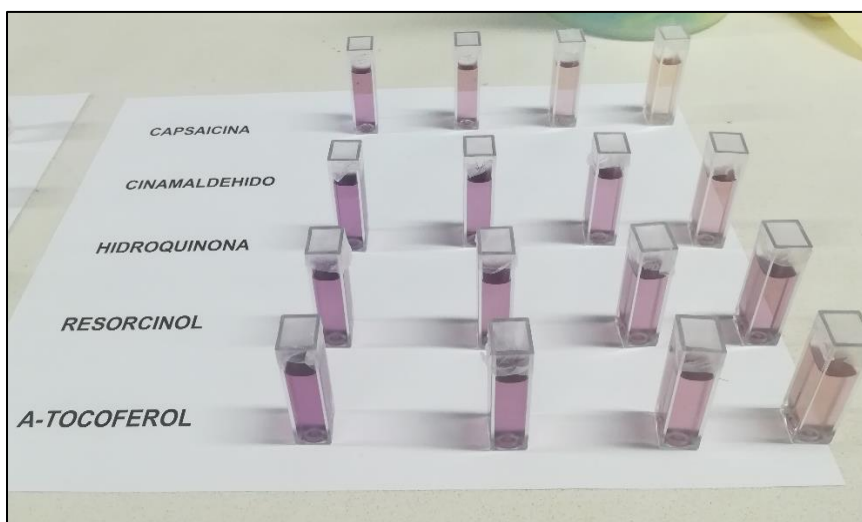
La siguiente figura muestra el espectro de absorbancia de la solución de trabajo DPPH, en él se puede apreciar que el pico de mayor absorbancia es a 520 nm, correspondiente a un valor de absorbancia próximo a 0.6.



**Figura 31.** Espectro de absorbancia en el rango visible del radical DPPH•.

- Se coloca una cubeta al frente de cada balón de 10 mL de concentración conocida y se coloca 2900 uL de solución DPPH en cada cubeta. Tener a disposición un cronometro digital para tomar el tiempo entre medidas.

- Se procede entonces a colocar siempre el mismo volumen de alícuota de cada balón (74 uL) en la cubeta correspondiente. La concentración final correspondiente es diferente para todos los casos. El tiempo se mide desde el instante que se añade las alícuotas hasta cuando se realiza las mediciones correspondientes. Para la primera medición se deja reaccionar por 5 minutos y para la segunda medición 30 minutos en cada una de las cubetas.



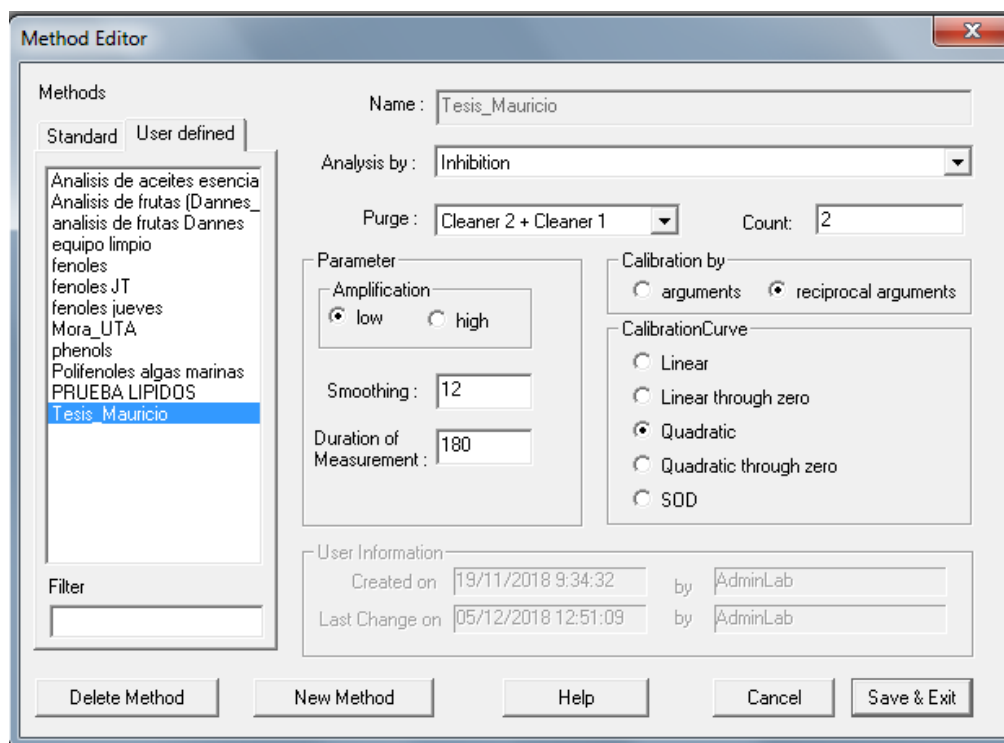
**Figura 32.** Orden de las curvas en celdas para medición simultánea en el espectrofotómetro. Método DPPH•.

### 3.2.5. Respuesta experimental a la actividad antioxidante con foto quimioluminiscencia

EL procedimiento empleado para este ensayo está basado en el procedimiento de cuantificación de actividad antioxidante para compuestos liposolubles que se propuesto por Popov and Lewin (1999). El mismo es utilizado en el protocolo de cuantificación proporcionado por el fabricante del equipo (Photochem), y se utilizó para llevar a cabo las determinaciones. El procedimiento se describe a continuación.

- Revisar los depósitos de reactivos de limpieza y desecho del equipo. Se deben tomar en cuenta todas las consideraciones del caso para evitar una parada repentina en el equipo durante el análisis. Encenderlo y continuar con los siguientes pasos.
- Partiendo de la solución Stock de cada estándar, se inicia preparando la solución de trabajo de cada estándar, es decir, se debe preparar el reactivo 4 que utiliza el protocolo normal de análisis. Para esto, con la ayuda de micropipetas se toman volúmenes correspondientes para obtener 4 mL de dilución (Viales), de concentración 1 mM de cada compuesto antioxidante. A continuación, se realiza otra dilución adicional, partiendo de la anterior. En un vial de 1 mL se realiza la dilución hasta alcanzar una concentración 0.1 mM de cada compuesto, excepto en el caso de la hidroquinona, cuya dilución fue requerida hasta obtener una concentración 0.01 mM. La solución de trabajo para la calibración esta lista y se debe almacenar a 4° centígrados hasta su uso.
- Para iniciar con la apropiada manipulación de volúmenes de los diferentes reactivos, disponer los reactivos sobre el mesón de trabajo en el siguiente orden. Metanol, Reactivo 2 (Buffer), reactivo 3 (Luminol). En la tabla 5, se aprecia cómo se debe manipular los volúmenes en uL para la preparar las cubetas del blanco, y calibración.

- Antes de iniciar, se estableció el método de análisis en el equipo. En la siguiente figura se pueden apreciar los aspectos establecidos para llevar a cabo el análisis de todos los compuestos.

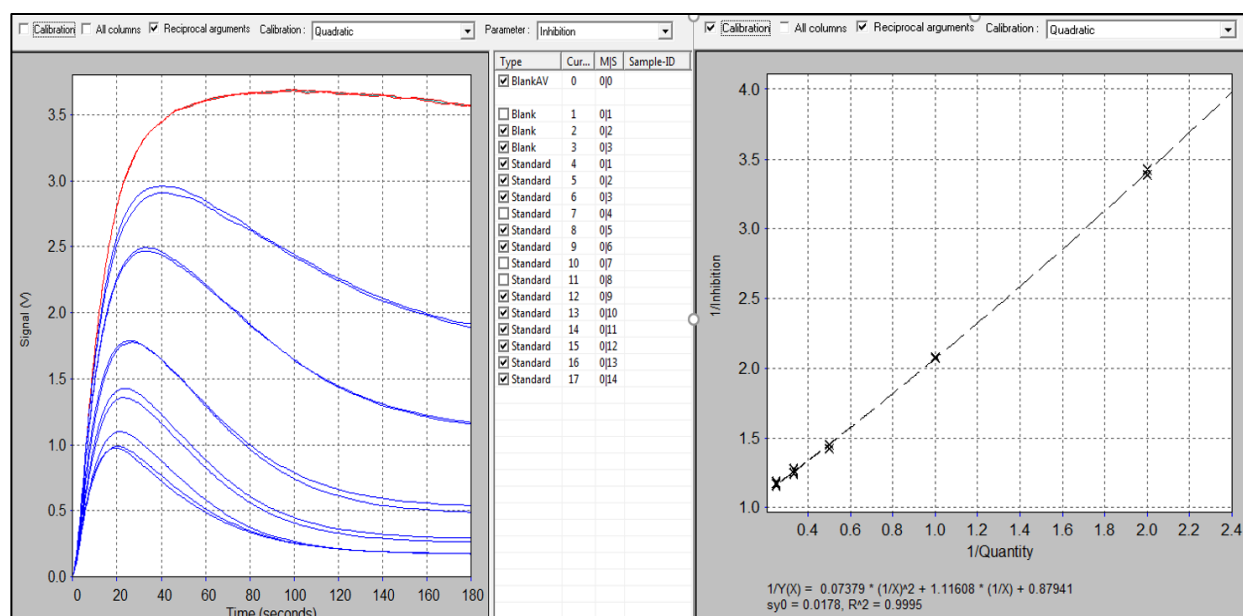


**Figura 33.** Parámetros del método de análisis en el equipo Photochem

- Se inicia con el análisis. Rudimentariamente después de preparar cada tubo de blanco, estándar, o muestra, se debe colocar y retirar los tubos, únicamente cuando el equipo haya terminado el análisis y la limpieza después de cada medición. Siguiendo la tabla 5. Se preparan tantos tubos de medición de blanco como sea necesario, hasta que la señal sea estable. El luminol (reactivo 3) se añade antes de realizar la medición. Durante las mediciones, es necesario volver a medir blancos para considerar las fluctuaciones ocasionada por diversos factores a lo largo del tiempo que dura el análisis.

- A continuación, siguiendo la tabla 5 se prepara los tubos necesarios para llevar a cabo la calibración con al menos cinco puntos. Se utiliza la solución de trabajo preparada inicialmente para realizar las mediciones respectivas de los diferentes compuestos antioxidantes y así preparar sus curvas de calibración. También, es necesario realizar varias mediciones de las mismas concentraciones durante el tiempo que dure el ensayo. Como se mencionó antes, esto ayuda a considerar las fluctuaciones ocasionadas por diferentes factores y permite obtener una estimación más precisa de las curvas de calibración.

La siguiente figura muestra el resultado del análisis para el ácido gálico, como se puede notar se pueden manipular las diferentes mediciones con la finalidad de obtener una curva de calibrado con alto coeficiente de determinación.



**Figura 34.** Curvas de respuesta del equipo Photochem para la preparación de la curva de calibración de ácido gálico.

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

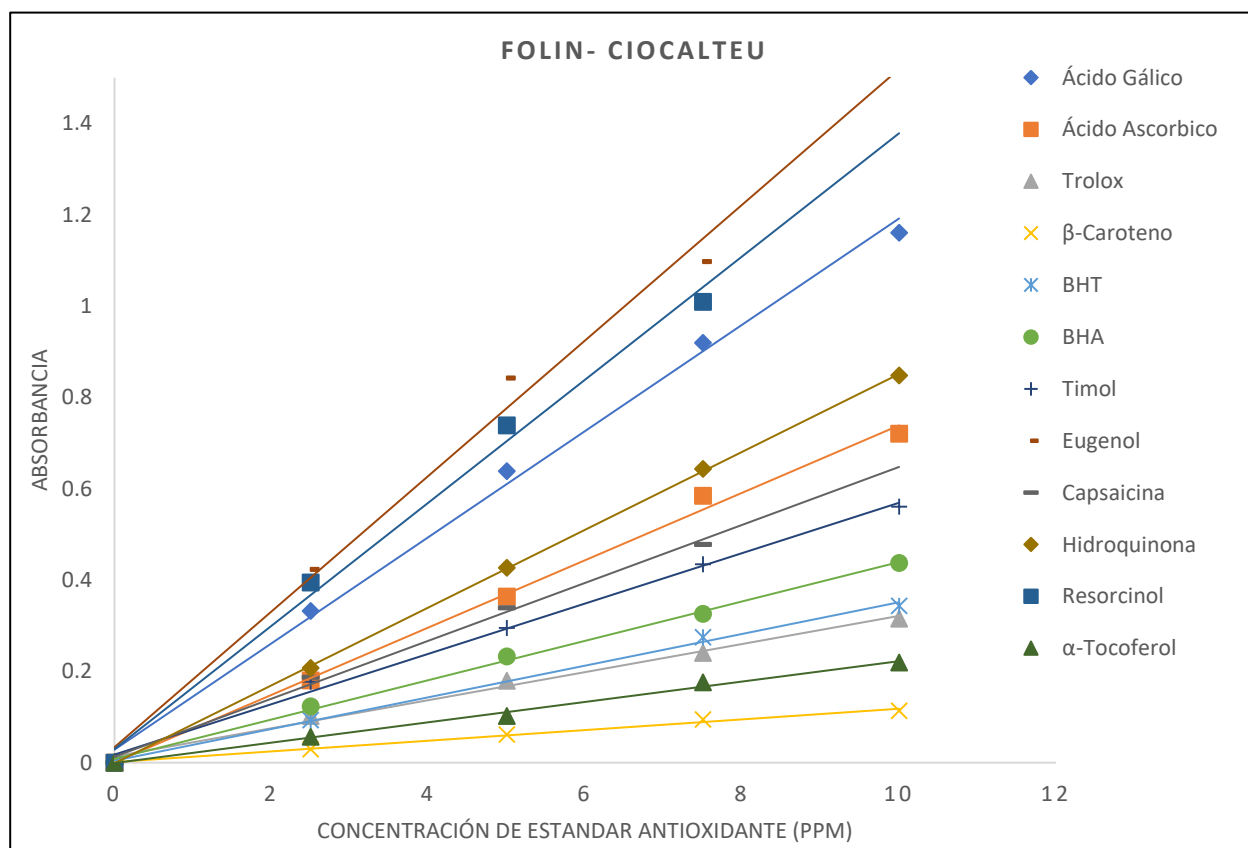
Se emplearon diferentes estándares antioxidantes para evaluar y comparar la sensibilidad de diferentes métodos de análisis. Los estándares considerados en esta investigación fueron seleccionados por la importancia a la que se han hecho acreedores por su uso en diferentes aplicaciones en el ámbito industrial, comercial y científico.

Las diferentes técnicas de análisis muestran diferentes respuestas a cada uno de los estándares utilizados. Sin embargo, lo señalado no pone en evidencia diferencias significativas en todos los casos, entre las diferentes respuestas. Las siguientes gráficas serán empleadas para aclarar esto y realizar una discusión apropiada de los resultados.

Como se revisó en la fundamentación teórica, la sensibilidad de una técnica de análisis se define apropiadamente como la pendiente de la recta de calibración que es posible obtener y siempre que la representación sea lineal puede ser medida en cualquier punto de ella (J.N. Miller, Miller, Jiménez, & Hornillos, 2002). La determinación de actividad antioxidante mediante los métodos analíticos estudiados, como se revisó en el capítulo dos, se lleva a cabo con el uso de curvas de calibración que son construidas a partir de diferentes disoluciones de compuestos antioxidante de grado analítico (estándares de calibración). Sin embargo, la finalidad del trabajo es comparar los métodos empleados, por lo cual, antes de discutir los resultados comparativos es importante revisar con detalle el valor de la pendiente y la precisión de los valores obtenidos con los diferentes estándares utilizados en cada método. Las siguientes tablas muestran estos valores obtenidos con cada método de análisis.

#### 4.1. Respuesta analítica a la actividad antioxidante evaluada por el método de Folin Ciocalteu.

La respuesta experimental obtenida frente al método de Folin-Ciocalteu se representa en el siguiente gráfico, donde se muestran las diferentes curvas de calibrado obtenidas para los diferentes compuestos.



**Figura 35.** Respuesta analítica a la actividad antioxidante de compuestos antioxidantes estándar frente al método de Folin Ciocalteu.

Como es posible apreciar la mayoría de los compuestos antioxidantes proporcionan una respuesta experimental notablemente menor al estándar que de forma usual es empleado como referencia para la expresión de resultados en este ensayo (Ácido gálico).

Esto señala que, para los compuestos estudiados, no se encuentra ninguno que sea representativamente más sensible que el estándar usual.

Considerando el hecho de que el eugenol presenta una mayor pendiente que el ácido gálico se podría suponer que la sensibilidad es mayor frente a este compuesto, sin embargo, el análisis de varianza con respecto al coeficiente TEAC muestra que la diferencia entre los resultados no es significativa. La siguiente tabla presenta los resultados característicos de las diferentes curvas de regresión.

**Tabla 8**

*Resultados del análisis simultáneo de compuestos antioxidantes frente a Folin-Ciocalteu.*

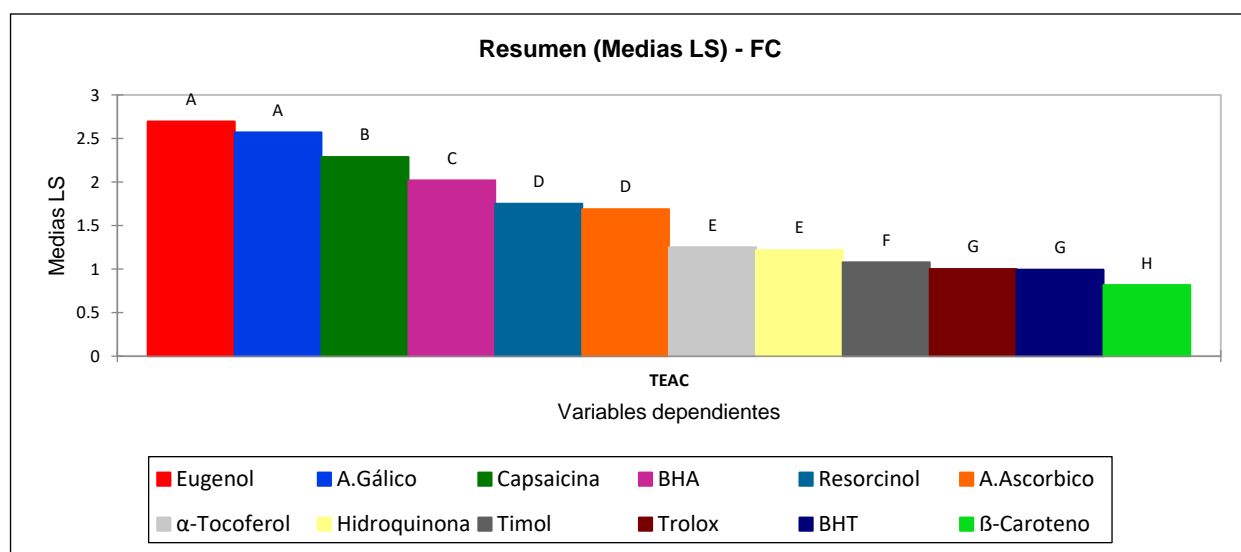
Compuesto	Ecuación de calibrado lineal	Coefficiente de regresión	Coefficiente de absorptividad ( $L\ mol^{-1}\ cm^{-1}$ )	Rango de concentración lineal (uM)	TEAC
<b>A. Gálico</b>	A=19785 [AG] + 0.0285	0.99631	1.98E+04	14 - 58	2.57
<b>A. Ascórbico</b>	A=13001.2 [AA]+0.00075	0.9962	1.30E+04	14 - 56	1.69
<b>Trolox</b>	A= 7699 [TX] + 0.0137	0.99144	7.70E+03	9 - 40	1
<b><math>\beta</math>-Caroteno</b>	A= 6270.9[ $\beta$ -C] + 0.001294	0.99335	6.27E+03	4 - 18	0.815
<b>BHT</b>	A= 7644.1[BHT] + 0.004316	0.99749	7.64E+03	11 - 45	0.994
<b>BHA</b>	A= 15537.3[BHA] + 0.0082	0.9989	1.55E+04	6 - 27	2.02
<b>Timol</b>	A= 8283.2[TM] + 0.0177	0.99549	8.28E+03	16 - 66	1.076
<b>Eugenol</b>	A= 20728.1[EGN] +0.034009	0.98802	2.07E+04	15 - 60	2.694
<b>Capsaicina</b>	A= 17579.5[CPS] + 0.0131	0.99525	1.76E+04	8 - 32	2.285
<b>Hidroquinona</b>	A= 9383.6 [ HDQ] - 0.0012	0.99987	9.38E+03	22 - 90	1.219
<b>Resorcinol</b>	A= 13462[ RSL] + 0.0299	0.99322	1.35E+04	22 - 90	1.75
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol</b>	A= 9605[ $\alpha$ -TF] - 0.0008	0.99424	9.61E+03	5 - 23	1.249



En la tabla se puede notar que la hidroquinona y el resorcinol cubren el mayor rango de concentración lineal, sin embargo, el coeficiente de determinación obtenido de la hidroquinona es mejor ( $R^2=0.99987$ ). La última columna muestra los coeficientes TEAC para cada estándar que son considerados para estimar la correlación entre los métodos.

El valor de TEAC obtenido para el eugenol es mayor que el correspondiente para el ácido gálico, sin embargo, el análisis de diferencias entre categorías con intervalo de confianza de 95% estima que tal diferencia no es significativa. Además, mediante la prueba bilateral de Dunnett se contrasta la diferencia de los valores TEAC, así, se estima que el coeficiente TEAC del BHA no es significativamente diferente del Coeficiente TEAC unitario (Trolox).

La siguiente grafica muestra un resumen de los resultados estimados por la prueba de Tukey HSD y la prueba bilateral de Dunnett para una categoría de control, los subíndices indican las diferencias significativas a un nivel de significancia del 95 %.



**Figura 36.** Resumen de las pruebas de Tukey y Dunnett para las mediciones de actividad antioxidante (coeficientes TEAC) de compuestos antioxidantes estándar frente a Folin-Ciocalteu.

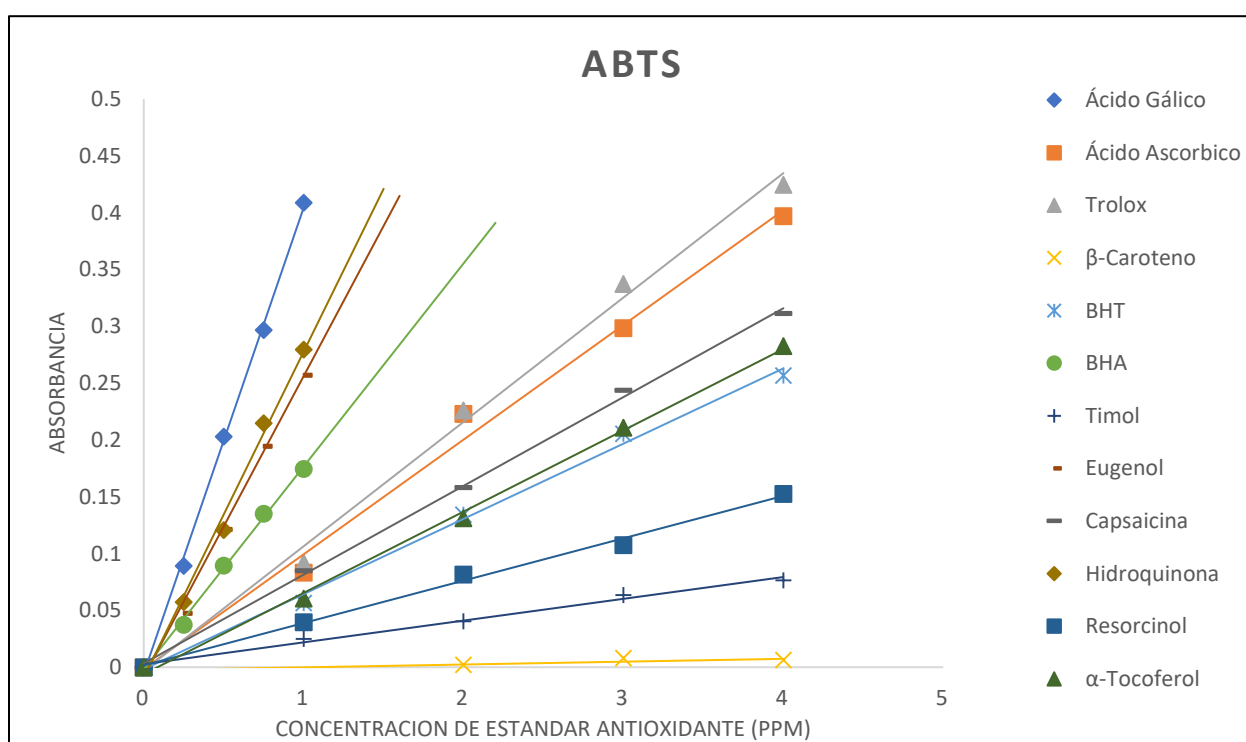
El análisis de varianza realizado (Figura 36), para establecer diferencias significativas entre categorías, se realizó para los valores obtenidos de tres determinaciones y mediciones independientes de cada compuesto antioxidante en este y todos los métodos.

Los resultados encontrados en Berker et al. (2013), estiman los coeficientes TEAC para el ensayo de Folin Ciocalteu adaptado para la estimar la actividad antioxidante tanto de compuestos hidrosolubles y liposolubles utilizando isobutanol como solvente del reactivo F-C, peróxido como diluyente de los antioxidantes estándar, y NaOH para regular el pH del medio de reacción. Los coeficientes encontrados para ácido gálico, BHT, BHA, ácido ascórbico y  $\beta$ -Caroteno son 1.78, 0.82, 0.99, 1.60, y 0.34 respectivamente.

A pesar de las modificaciones realizadas, en el estudio mencionado, los coeficientes son comparables con los obtenidos bajo el procedimiento utilizado en esta investigación. Esto sugiere que la sensibilidad del método frente a compuestos hidrosolubles o liposolubles no se ve afectada considerablemente por el uso de hidróxido de sodio como solución alcalina para elevar el pH del medio de reacción, y que utilizar etanol para diluir los antioxidantes es una modificación aceptable frente al uso de peróxido empleado para el mismo propósito, además, en este caso se utilizó agua para preparar el reactivo de Folin Ciocalteu y los resultados no difieren en gran medida de los obtenidos con el reactivo preparado en isobutanol. El hecho de las variaciones en estos resultados podría estar relacionado con las proporciones de reactivos empleados, lo cual no es objeto de este estudio. Además, el ácido ascórbico conocido porque su presencia puede significar una sobrestimación de la actividad antioxidante debida al contenido total fenólico empleando este ensayo, es el valor que presenta mayor similitud entre la investigación mencionada y el actual proyecto. Los valores difieren en la tercera cifra significativa por 0.09.

## 4.2. Respuesta analítica a la actividad antioxidante evaluada por el método de radical $ABTS^{\bullet+}$

La respuesta experimental obtenida de los diferentes antioxidantes bajo estudio, frente al radical  $ABTS^{\bullet+}$ , muestra que el compuesto que presenta mayor sensibilidad al radical es el ácido gálico, seguido por la hidroquinona, eugenol, y BHA. El resto de los compuestos estudiados representan una menor sensibilidad en el método con respecto al Trolox.



**Figura 37.** Respuesta analítica a la actividad antioxidante de compuestos antioxidantes estándar frente al método TEAC/ $ABTS^{\bullet+}$

Los parámetros característicos de cada curva de regresión se muestran en la siguiente tabla. Como se puede notar la bondad del ajuste para los datos obtenidos es alto y para este caso el resorcinol maneja el rango de concentración lineal más amplio entre todos los compuestos estudiados.

En el caso del  $\beta$ -Caroteno, su bajo coeficiente de regresión pone en evidencia el hecho de que este compuesto no puede ser estudiado por este método, si se utiliza alcoholes como diluyente y solo es aplicable para este ensayo si se utilizan hexano como solvente (Reşat Apak et al., 2013).

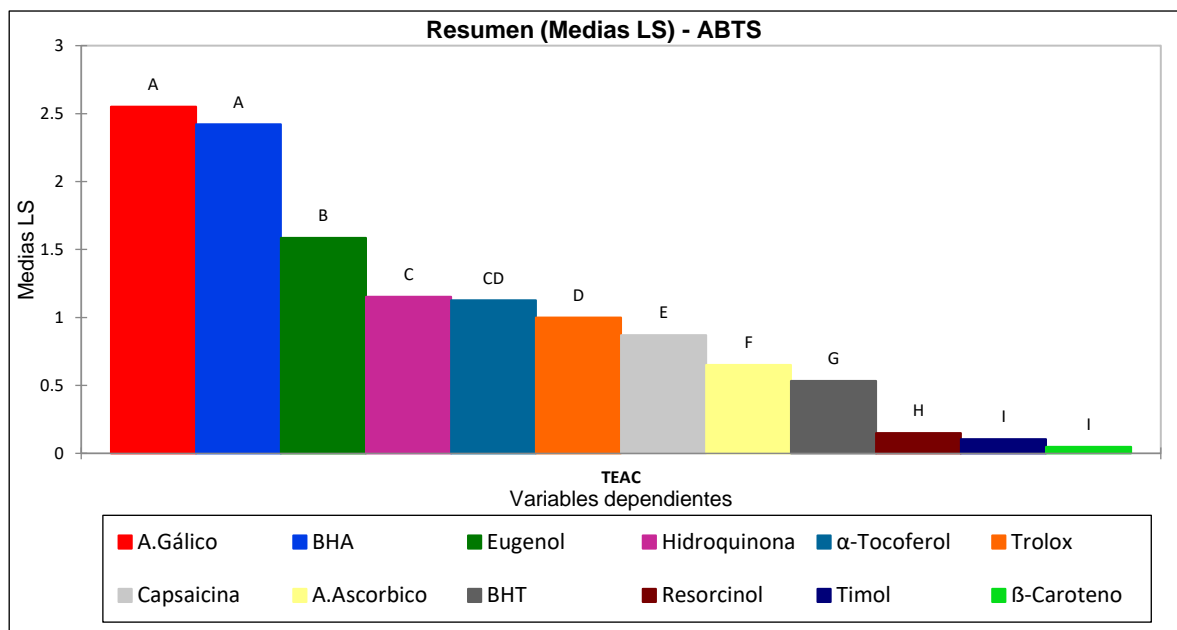
**Tabla 9**

*Resultados del análisis simultáneo de compuestos antioxidantes frente a radical ABTS<sup>•+</sup>.*

Compuesto	Ecuación de calibrado lineal	Coefficiente de regresión	Coefficiente de absorptividad ( $L mol^{-1} cm^{-1}$ )	Rango de concentración lineal ( $\mu M$ )	TEAC
<b>A. Gálico</b>	A= 69749.2[AG] - 0.0056	0.9986	6.97E+04	1- 6	2.546
<b>A. Ascórbico</b>	A= 17787.51[AA] - 0.0015	0.9922	1.78E+04	5-22	0.649
<b>Trolox</b>	A= 27395.14[ TX] - 0.003	0.9953	2.74E+04	4-15	1.000
<b><math>\beta</math>-Caroteno</b>	A= 1342.22[ $\beta$ -C] - 0.003	0.6372	1.34E+03	1-7	0.049
<b>BHT</b>	A = 14587.29[BHT] - 0.0018	0.9956	1.46E+04	4-18	0.532
<b>BHA</b>	A= 64432.29[BHA] - 0.0021	0.9974	6.44E+04	1-3	2.352
<b>Timol</b>	A= 2877.06[TM] + 0.0275	0.9905	2.88E+03	6-26	0.105
<b>Eugenol</b>	A= 43417.97[EGN] - 0.0082	0.9953	4.34E+04	1-6	1.585
<b>Capsaicina</b>	A= 23862.06[CPS] +0.0033	0.9986	2.39E+04	3-14	0.871
<b>Hidroquinona</b>	A= 31558.34[HDQ] - 0.0089	0.9927	3.16E+04	2-9	1.152
<b>Resorcinol</b>	A = 4105.88[RSN] +0.0016	0.9948	4.11E+03	9-36	0.150
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol</b>	A= 30810.62[ $\alpha$ -T] - 0.0061	0.9979	3.08E+04	2-10	1.125

De los compuestos estudiados, los coeficientes TEAC del ácido gálico y BHA son los más altos y entre ellos no presentan diferencias significativas, por lo tanto, la actividad antioxidante de estos compuestos con respecto al Trolox es mayor, lo cual significa que la interacción entre estos compuestos y el radical ABTS<sup>•+</sup> es notablemente mejor que la existente con Trolox, ya sea debido a la donación electrónica (SET) o a la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT).

Este hecho revela la afinidad del eugenol por interactuar con radicales catiónicos puesto que, como se verá más adelante la sensibilidad con respecto al radical estable DPPH•, es mucho menor que en este caso. El resumen de las pruebas de Tukey y Dunnett se muestran a continuación. Los subíndices indican la existencia de diferencia significativa a un nivel de significancia del 95%.

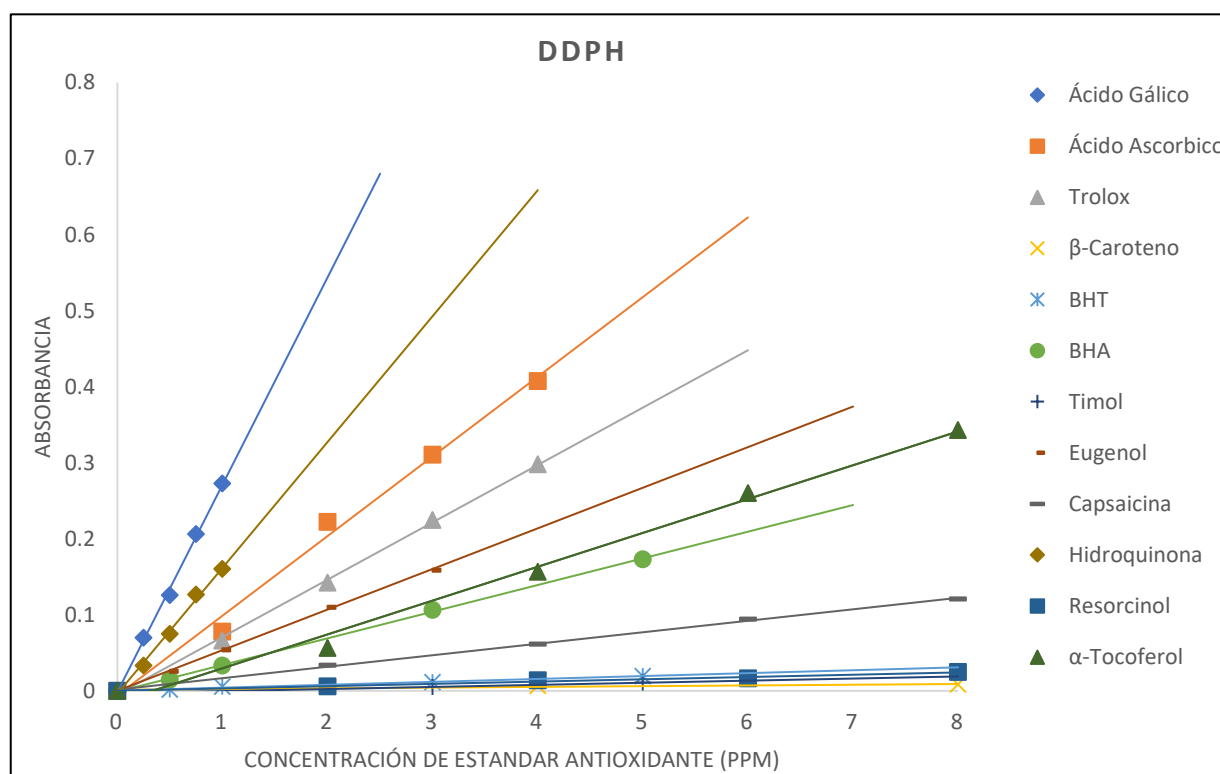


**Figura 38.** Resumen de las pruebas de Tukey y Dunnett para las mediciones de actividad antioxidante de compuestos antioxidantes estándar frente a radical ABTS•<sup>+</sup>

Se puede notar que el  $\alpha$ -Tocoferol presenta una respuesta similar a la del Trolox lo cual explica el hecho de que los resultados obtenidos mediante este método también son reportados en equivalentes de este compuesto. Sin embargo, dejando a un lado el ácido gálico, es claro que el BHA, es el compuesto cuya respuesta en el método es la más sensible bajo las condiciones experimentales empleadas en esta investigación, y se comprueba según los resultados encontrados en Berker et al. (2013), donde los resultados para ácido gálico, BHT, BHA, ácido ascórbico, y  $\beta$ -caroteno muestran una correlación de 0.508 con los resultados obtenidos en esta investigación.

### 4.3. Respuesta analítica a la actividad antioxidante evaluada por el método de radical DPPH•

El método convencional utiliza al ácido ascórbico como estándar de referencia para reportar resultados obtenidos por este método. Sin embargo, la siguiente gráfica muestra que el método presenta mayor sensibilidad al ácido gálico e hidroquinona. Entonces, la interacción del radical estable DPPH• es más significativa con compuestos fenólicos que poseen sus grupos principales en posición para, lo cual se relaciona con la habilidad de estabilizar el electrón desapareado una vez reaccionado con el radical.



**Figura 39.** Respuesta analítica a la actividad antioxidante de compuestos antioxidantes estándar frente al método de radical DPPH•.

En la figura 39 se aprecia que el ácido gálico posee la pendiente más alta de todos los compuestos estudiados. Este suceso es similar en casi todos los métodos a excepción de PCL.

También, el resorcinol cuya estructura molecular es un isómero de posición de la hidroquinona, presenta una sensibilidad en el método muy escasa, al igual que el BHT y el  $\beta$ -Caroteno. En el caso del resorcinol y el BHT, la escasa sensibilidad del método a estos compuestos confirma que el mecanismo de interacción entre radical y antioxidante está limitado por la posición que ocupan los sustituyentes en el compuesto fenólico, los efectos de la resonancia no son objeto de este estudio, pero es claro que está relacionado con la habilidad de interacción del radical con el medio.

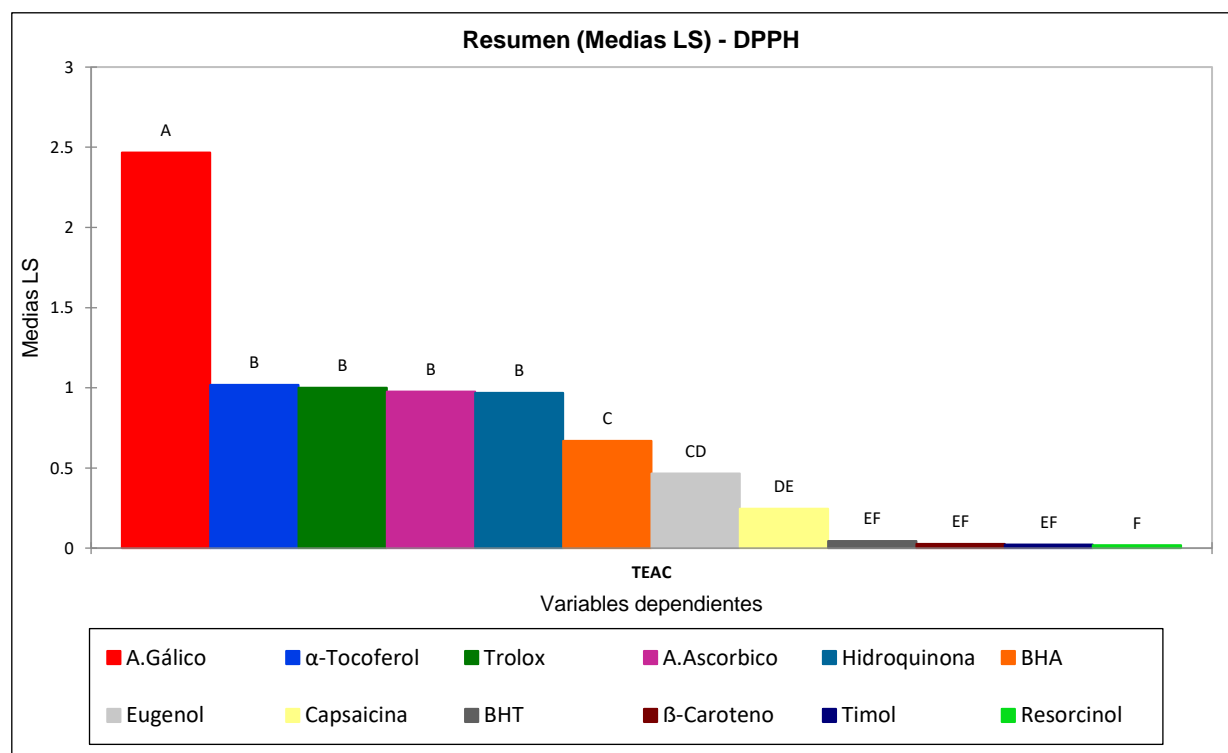
**Tabla 10**

*Resultados del análisis simultáneo de compuestos antioxidantes frente a radical DPPH•.*

Compuesto	Ecuación de calibrado lineal	Coefficiente de regresión	Coefficiente de absorptividad ( $L mol^{-1} cm^{-1}$ )	Rango de concentración lineal ( $\mu M$ )	TEAC
<b>A. Gálico</b>	$A = 46386.03[AG] - 0.001533$	0.9970	$4.64E+04$	1 – 6	2.457
<b>A. Ascórbico</b>	$A = 18462.77[AA] - 0.004622$	0.9923	$1.85E+04$	5 – 22	0.978
<b>Trolox</b>	$A = 18877.72[TX] - 0.004622$	0.9988	$1.89E+04$	3 - 16	1
<b><math>\beta</math>-Caroteno</b>	$A = 508.95[\beta-C] + 0.001392$	0.9269	$5.09E+02$	7 – 30	0.026
<b>BHT</b>	$A = 841.38[BHT] + 0.00034$	0.9879	$8.41E+02$	2 - 23	0.044
<b>BHA</b>	$A = 12640.34[BHA] - 0.00108$	0.9994	$1.26E+04$	1 – 14	0.669
<b>Timol</b>	$A = 414.58[TM] - 0.003169$	0.8590	$4.15E+02$	3 – 33	0.021
<b>Eugenol</b>	$A = 8767.92[EGN] + 0.00011$	0.9992	$8.77E+03$	3 - 18	0.464
<b>Capsaicina</b>	$A = 4611.69[CPS] + 0.004611$	0.9987	$4.61E+03$	6 – 26	0.244
<b>Hidroquinona</b>	$A = 18228.77[HDQ] + 0.0182$	0.9947	$1.82E+04$	2 – 10	0.965
<b>Resorcinol</b>	$A = 331.60[RSN] + 0.00033$	0.9812	$3.32E+02$	18 – 72	0.017
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol</b>	$A = 19166.90[\alpha-T] - 0.0148$	0.9918	$1.92E+04$	4 -18	1.015

En la siguiente grafica se muestra el resumen de la prueba de Tukey y Dunnett para los valores TEAC medios de tres determinaciones independientes a un nivel de significancia del 95%.

La sensibilidad del método es significativamente mayor con respecto al ácido gálico, sin embargo, los compuestos que usualmente son utilizados como referencia en los diferentes métodos, no presentan para este caso diferencia significativa entre los coeficientes TEAC respectivos. Es decir, el ácido ascórbico,  $\alpha$ -Tocoferol, Trolox, hidroquinona, presentan respuestas analíticas que conducen a coeficientes TEAC que no son significativamente diferentes entre ellos. Y particularmente en este caso la sensibilidad del eugenol no es significativamente menor que la del BHA ni significativamente mayor que la capsaicina.



**Figura 40.** Resumen de las pruebas de Tukey y Dunnett para las mediciones de actividad antioxidante (coeficientes TEAC) de compuestos antioxidantes estándar frente a radical DPPH.



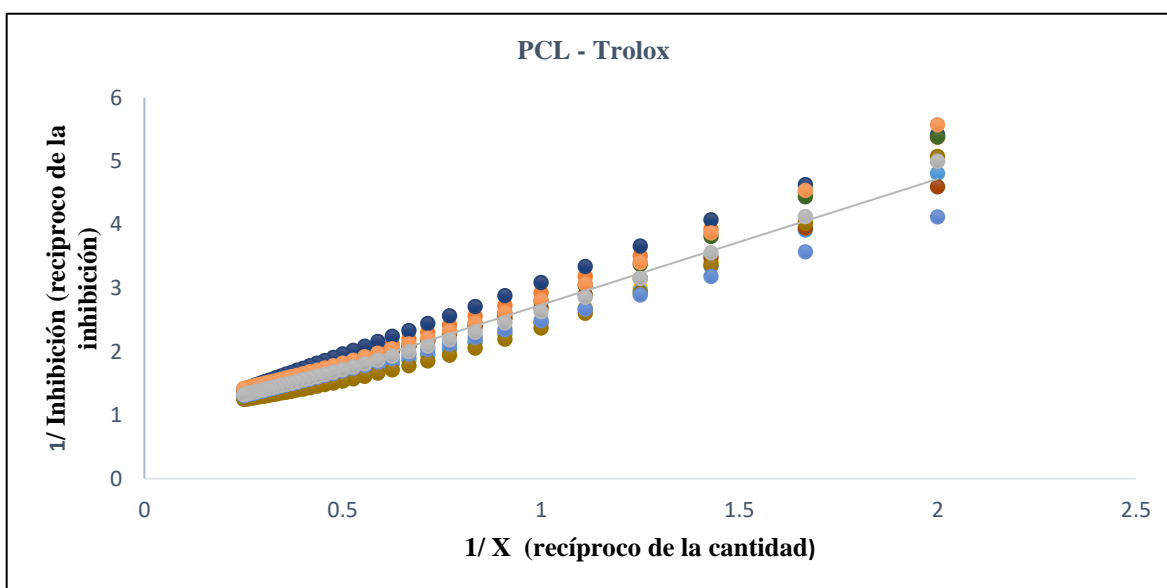
Este método es el que muestra mayor uniformidad de resultados para varios resultados, como se puede notar en la gráfica anterior, cuatro compuestos presentan coeficientes TEAC semejantes, y excluye al ácido gálico como el compuesto de mayor respuesta en el método.

En el caso del  $\beta$ - Caroteno, no es posible identificar bajo las condiciones experimentales empleadas, cuán sensible es este método a este compuesto; debido a que el bajo coeficiente de regresión mostrado en la siguiente tabla es explicado por la superposición entre los espectros de absorción del radical y el antioxidante, por lo tanto este ensayo como se menciona en Reşat Apak et al. (2013), no es sutil para carotenoides.

Por último, los compuestos de escasa sensibilidad en el método son el BHT,  $\beta$ - Caroteno, Timol, y resorcinol. Como se mencionó antes el  $\beta$ -caroteno manifiesta una interferencia porque su espectro de absorción se superpone al del DPPH.

#### **4.4.Respuesta analítica a la actividad antioxidante evaluada por el método de Foto quimioluminiscencia PCL.**

Para llevar a cabo las determinaciones de este método se consideró una medición individual para cada caso; debido al excesivo uso de luminol que se requiere para realizar las réplicas. Sin embargo, para validar el procedimiento empleado se revisó en primera instancia la estabilidad del método realizando 10 réplicas para el estándar empleado como referencia para compuestos lipofílicos. Como se puede notar en la Figura 41, donde se muestra la pendiente de los valores medios de las diferentes réplicas, no existe gran variabilidad la pendiente como tal, sin embargo, las diferencias radican en cómo la línea se desplaza en el sentido de las ordenadas por lo cual es importante el análisis del valor de “C”, considerando que las ecuaciones de regresión tienen la forma  $Y = m * X + C$ .



**Figura 41.** Variación de la curva de calibrado de Trolox de múltiples determinaciones independientes frente al método PCL.

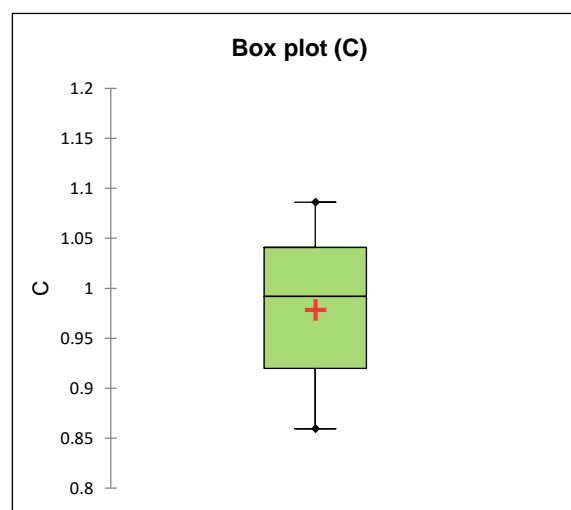
La figura 42, es una representación caja y bigotes de los diferentes valores “C” encontrados.

Los estadísticos descriptivos de esta estimación se indican en la tabla 11, y a partir de ellos se puede comprobar que la estabilidad de las mediciones mediante este método.

**Tabla 11**

*Evaluación de la variabilidad de coeficiente C de la ecuación de regresión.*

Estadístico	C
No. de observaciones	10
Mínimo	0.859
Máximo	1.086
1° Cuartil	0.920
Mediana	0.992
3° Cuartil	1.041
Media	0.978
Varianza (n-1)	0.006
Desviación típica (n-1)	0.079

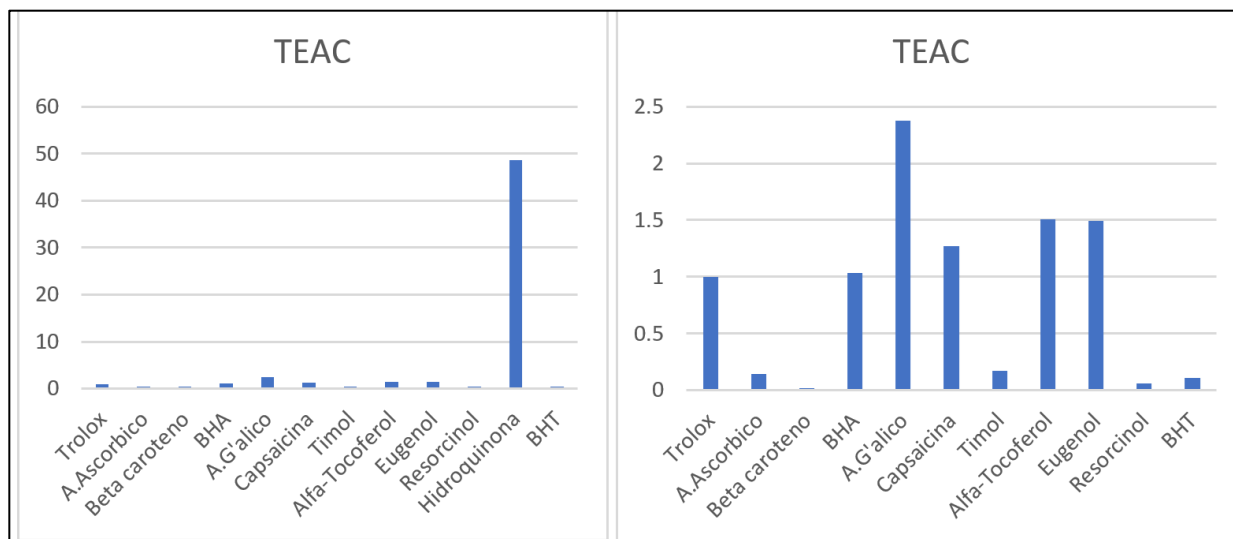


**Figura 42.** Representación de variación de “C” en diagrama de caja y bigotes.

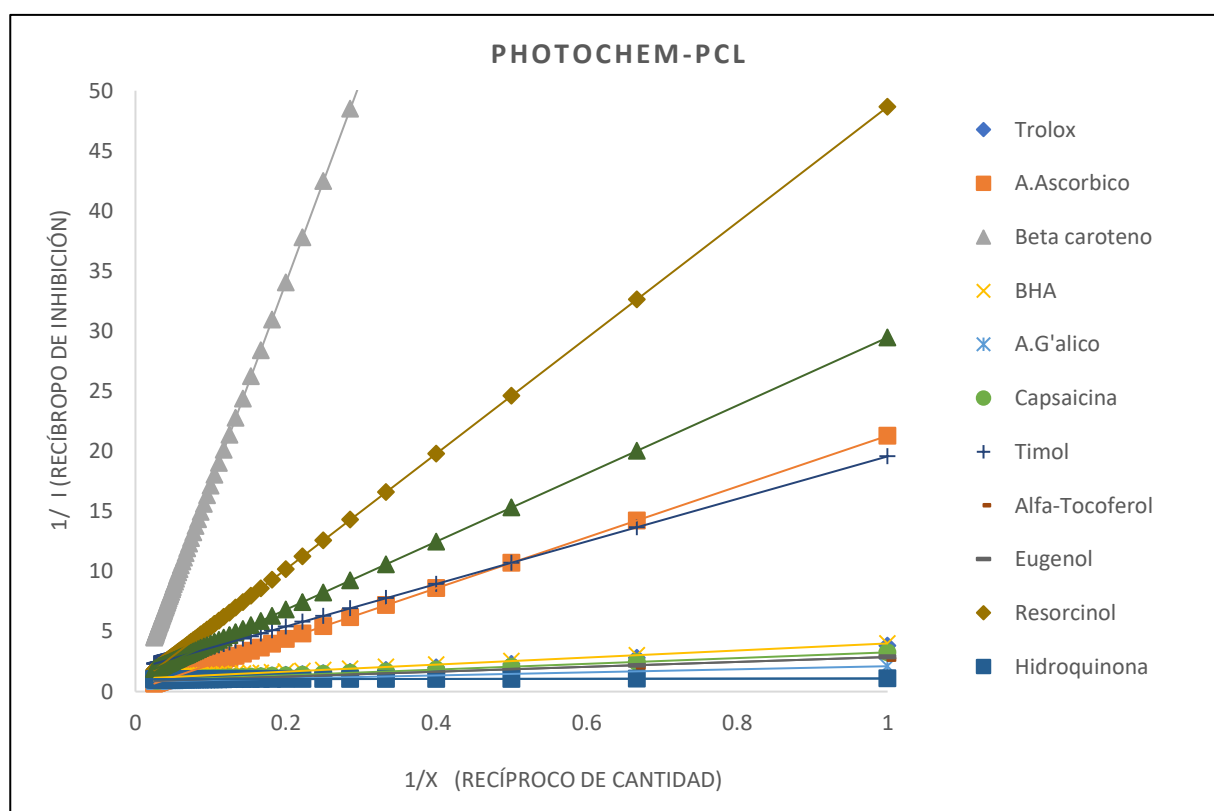
El comportamiento de la señal de respuesta para este método es una curva que posee tres características basadas en el principio que gobierna el método (PCL), este comportamiento ya se lo menciona en la fundamentación teórica y establece el hecho que para analizar compuestos hidrofílicos la representación de la regresión es lineal y para compuesto lipofílicos cuadrática. Sin embargo, para este caso como se muestra en la siguiente figura la regresión de las diferentes curvas es lineal a pesar de utilizar el protocolo establecido para componente lipofílicos. Esta representación es posible porque se la realizó considerando los valores recíprocos de la señal de respuesta y de las cantidades utilizadas de antioxidantes.

En la gráfica se puede notar que el compuesto que representa una menor sensibilidad en el método es el  $\beta$ - Caroteno. Se puede apreciar que es considerablemente mayor, en cuanto al valor de su pendiente, de los demás compuestos. El resorcinol también posee un valor elevado de pendiente lo cual es lo opuesto de su isómero de posición hidroquinona cuyo resultado muestra ser un caso excepcional ya que la sensibilidad del método a este compuesto es mucho mayor que para el resto. La figura 43, muestra la comparación de los resultados con la hidroquinona y la comparación entre los demás compuestos sin considerarla, para apreciar mejor la representación de la actividad de los otros compuestos.

Para el análisis de datos final, los resultados obtenidos para este compuesto en este método no son considerados para hallar correlaciones entre los métodos empleados ya que por simple inspección el resultado de este compuesto representa un dato anómalo que está asociado con la estabilización por resonancia del anillo. Esto es evidente por el resultado obtenido para el resorcinol.



**Figura 43.** Comparación de coeficientes TEAC obtenidos de compuestos antioxidantes estándar frente a PCL. Resultados comparados considerando la hidroquinona y sin esta.



**Figura 44.** Respuesta analítica a la actividad antioxidante de compuestos antioxidantes estándar frente al método PCL. Argumentos recíprocos.

La siguiente tabla muestra los resultados característicos de cada curva de regresión, se puede notar que la bondad del ajuste es mayor que en los demás métodos, y el rango de concentración empleado vuelve a poner en evidencia el hecho de la hidroquinona y la sensibilidad del método a este compuesto. Los compuestos que representan una mayor sensibilidad en el método después de la hidroquinona según el coeficiente TEAC y el rango de concentración empleado son el ácido ascórbico, eugenol, BHA, ácido gálico,  $\alpha$ -Tocoferol y capsaicina.

La sensibilidad encontrada para el BHA es semejante a la del Trolox, así como el  $\alpha$ -Tocoferol y eugenol son casi idénticos en cuanto al resultado obtenido para ellos.

**Tabla 12**

*Resultados del análisis simultáneo de compuestos antioxidantes frente a PCL.*

Compuesto	Ecuación de calibrado lineal $1/Y(X) = b (1/X) + c$	Coefficiente de regresión	Rango de concentración (nmol/2300 uL)	TEAC
Trolox	$1/I = 3.04 (1/\text{nmol TX}) + 0.777$	0.999	2 - 12	1
Á. Ascórbico	$1/I = 21.14(1/\text{nmol AA}) + 0.141$	0.9984	0.5 - 5	0.143762
B-Caroteno	$1/I = 168.85(1/\text{nmol } \beta\text{C}) + 0.258$	0.9986	10 - 100	0.018005
BHA	$1/I = 2.93(1/\text{nmol BHA}) + 1.072$	0.9993	0.5 - 5	1.036042
Á. Gálico	$1/I = 1.27(1/\text{nmol AG}) + 0.832$	0.9991	0.5 - 4	2.377524
Capsaicina	$1/I = 2.39(1/\text{nmol CPS}) + 0.874$	0.9996	0.5 - 4	1.271227
Timol	$1/I = 17.69(1/\text{nmol TM}) + 1.87$	0.9958	1 - 15	0.171804
$\alpha$ -Tocoferol	$1/I = 2.01(1/\text{nmol } \alpha\text{T}) + 0.669$	0.9998	0.5 - 3	1.508642
Eugenol	$1/I = 2.03(1/\text{nmol EGN}) + 0.836$	0.9992	0.5 - 4	1.491676
Resorcinol	$1/I = 48.09(1/\text{nmol RSN}) + 0.561$	0.9962	5 - 40	0.063213
Hidroquinona	$1/I = 0.06(1/\text{nmol HDQ}) + 1.02$	0.9994	0.05 - 1	48.63446
BHT	$1/I = 28.30(1/\text{nmol BHT}) + 1.15$	0.9992	1 - 25	0.1074

En la tabla anterior, se puede notar que los coeficientes de regresión obtenidos son los mejores entre todos los métodos. Sin embargo, también se puede notar que los rangos de concentración de compuesto antioxidante con el que se puede trabajar es más limitado que en el resto de los métodos.

#### 4.5.Comparación simultanea de la respuesta analítica a la actividad antioxidante obtenida por los diferentes métodos estudiados.

En los resultados anteriores se mostraron altos coeficientes de correlación lineal para todos los casos, excepto aquellos que como se mencionó son poco sutiles para ser analizados por el método correspondiente. El Trolox es el estándar utilizado como referencia para analizar si existe correlaciones favorables entre los métodos debido a que los resultados que normalmente se encuentran reportados utilizan este compuesto para dar la equivalencia de actividad antioxidante de la muestra estudiada. Sin embargo, es importante mencionar que, dependiendo del caso de estudio, se podría utilizar cualquiera de los compuestos cuya sensibilidad en el método es significativamente mayor que el compuesto usual utilizado como referencia para reportar resultados. Es decir, en Folin- Ciocalteu es común utilizar el ácido gálico como estándar de referencia, pero, como se vio antes, el eugenol también puede ser utilizado con el mismo propósito.

La siguiente tabla muestra los coeficientes TEAC de todos los compuestos empleados.

**Tabla 13**

*Actividad antioxidante expresado en TEAC para cada método.*

	<b>F-C</b>	<b>ABTS</b>	<b>DPPH</b>	<b>PCL</b>
<b>Trolox</b>	1.000	1.000	1.000	1.000
<b>Á. Ascórbico</b>	1.690	0.649	0.976	0.144
<b>β-Caroteno</b>	0.815	0.049	0.027	0.018
<b>BHA</b>	2.020	2.421	0.669	1.036
<b>Á. Gálico</b>	2.570	2.551	2.466	2.378
<b>Capsaicina</b>	2.285	0.871	0.245	1.271
<b>Timol</b>	1.076	0.105	0.022	0.172
<b>α-Tocoferol</b>	1.249	1.126	1.018	1.509
<b>Eugenol</b>	2.694	1.586	0.466	1.492
<b>Resorcinol</b>	1.750	0.150	0.018	0.063
<b>Hidroquinona</b>	1.219	1.153	0.968	48.634
<b>BHT</b>	0.994	0.533	0.045	0.107

Estos coeficientes están definidos como, la relación entre la pendiente de la curva de regresión del compuesto estudiado, con respecto a la del Trolox. También se mencionó en las secciones anteriores sobre la correlación de estos resultados, con los reportados en otras investigaciones para ciertos métodos. Esto será empleado para formular algunas conclusiones.

Los diferentes coeficientes TEAC de la tabla anterior permiten encontrar la siguiente matriz de correlaciones entre los diferentes métodos. Es importante mencionar que la correlación de los resultados se realizó omitiendo el coeficiente TEAC de la Hidroquinona ya que es claro que se trata de un compuesto excepcional que debe ser estudiado a profundidad para aclarar su comportamiento frente a los diferentes métodos.

**Tabla 14**

*Matriz de correlaciones entre métodos con resultados en TEAC*

VARIABLES	F-C	ABTS	DPPH	PCL
F-C	<b>1</b>	<b>0.651</b>	0.383	<b>0.650</b>
ABTS	<b>0.651</b>	<b>1</b>	<b>0.733</b>	<b>0.829</b>
DPPH	0.383	<b>0.733</b>	<b>1</b>	<b>0.758</b>
PCL	<b>0.650</b>	<b>0.829</b>	<b>0.758</b>	<b>1</b>

En la matriz anterior, los valores resaltados en negro son aquellos que presentan una correlación positiva entre los métodos asignados.

Los resultados indican que de expresarse los resultados en equivalentes de Trolox para todos los ensayos empleados, se obtienen correlaciones positivas en casi todos los casos excepto entre los métodos de DPPH• y Folin Ciocalteu. La siguiente tabla muestra el coeficiente de correlación entre los diferentes métodos considerando únicamente coeficientes TEAC para todos los casos con la respectiva relación lineal para estos.

**Tabla 15**

*Relaciones lineales estimadas utilizando valores TEAC entre métodos.*

Relación Lineal	Coefficientes de correlación
$TEAC_{PCL} = 0.753 TEAC_{ABTS} + 0.0795$	0.829
$TEAC_{PCL} = 0.8217 TEAC_{DPPH} + 0.3162$	0.758
$TEAC_{DPPH} = 0.6247 TEAC_{ABTS} + 0.025$	0.733
$TEAC_{PCL} = 0.7761 TEAC_{F-C} + 0.4447$	0.650
$TEAC_{ABTS} = 0.8276 TEAC_{F-C} - 0.3191$	0.651
$TEAC_{DPPH} = 0.4147 TEAC_{F-C} - 0.0092$	0.383

Para llevar a cabo el análisis de cada método se presenta la siguiente tabla en donde se encuentran los coeficientes respectivos a cada método para expresar la actividad antioxidante.

**Tabla 16**

*Actividad antioxidante expresada en equivalentes del compuesto usual para expresar resultados de cada método.*

	F-C mol AG/mol std	ABTS mol TX/mol std	DPPH mol AA/mol std	PCL mol TX/mol std
<b>Trolox</b>	0.389	1.000	1.022	1.000
<b>Á. Ascórbico</b>	0.657	0.649	1.000	0.144
<b>β-Caroteno</b>	0.317	0.049	0.028	0.018
<b>BHA</b>	0.785	2.421	0.685	1.036
<b>Á. Gálico</b>	1.000	2.551	2.512	2.378
<b>Capsaicina</b>	0.889	0.871	0.250	1.271
<b>Timol</b>	0.419	0.105	0.022	0.172
<b>α-Tocoferol</b>	0.485	1.126	1.038	1.509
<b>Eugenol</b>	1.048	1.586	0.475	1.492
<b>Resorcinol</b>	0.680	0.150	0.018	0.063
<b>Hidroquinona</b>	0.474	1.153	0.987	48.634
<b>BHT</b>	0.386	0.533	0.046	0.107



Las ecuaciones de correlación calculadas a partir de los datos de la tabla anterior se presentan a continuación, y representan correlaciones positivas a un nivel de significancia del 95%.

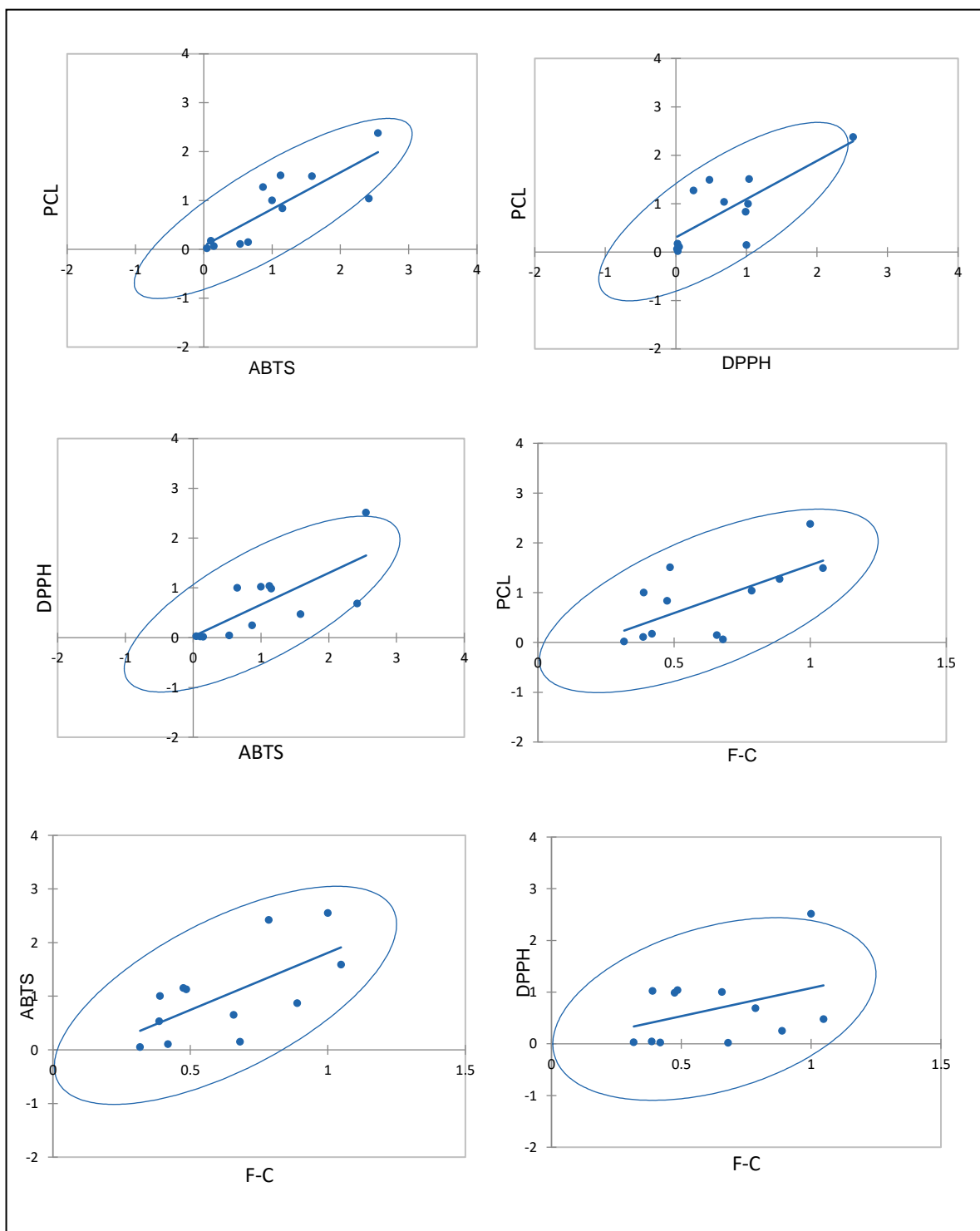
**Tabla 17**

*Relaciones lineales estimadas mediante valores de AO de cada compuesto entre los métodos.*

Relación Lineal	Coefficiente de correlación
$TEAC_{PCL} = 0.753 TEAC_{ABTS} + 0.0795$	0.829
$TEAC_{PCL} = 0.8051 \text{ Á. Ascorbico } E_{DPPH} - 0.316$	0.758
$\text{Á. Ascorbico } E_{DPPH} = 0.6367 TEAC_{ABTS} + 0.0265$	0.733
$TEAC_{PCL} = 1.996 \text{ Á. Gálico } E_{F-C} - 0.4449$	0.650
$TEAC_{ABTS} = 2.1288 \text{ Á. Gálico } E_{F-C} - 0.3195$	0.651
$\text{Á. Ascorbico } E_{DPPH} = 1.0871 \text{ Á. Gálico } E_{F-C} + 0.0086$	0.383

La tabla anterior muestra que los coeficientes de correlación son los mismos que se encuentran en la tabla 14, a pesar de que en este caso la estimación se realizó a partir del valor de AO encontrado para cada compuesto reportado en equivalentes del compuesto que se utiliza normalmente para reportar la AO en cada método. Esta particularidad indica que, los resultados mostrados en las figuras de resumen de resultados de las pruebas de Tukey y Dunnett donde se comparan los resultados individuales de cada método, son adecuadas para la identificación de diferencias entre la actividad antioxidante de los diferentes compuestos, sin importar si se compararon valores fijados con respecto al Trolox, es decir de haberse utilizado el ácido gálico como categoría de control en todos los métodos los resultados serían los mismos.

Las gráficas de correlación de los resultados obtenidos por los diferentes métodos se muestran a continuación en la siguiente figura. Se relacionaron los valores de AO expresados en el respectivo compuesto usual de cada método. La elipse de confianza está trazada a un nivel de significancia del 95%.



**Figura 45.** Gráficas de correlación ente métodos.

Se muestran correlaciones positivas entre todos los métodos, a excepción de la última relación que muestra un bajo coeficiente de correlación entre los resultados obtenidos entre los ensayos con radical DPPH• y Folin-Ciocalteu. Para comprobar lo representativas que pueden llegar a ser las relaciones antes planteadas, se realizara un análisis mediante los valores de actividad antioxidante reportada en algunas publicaciones.

Thaipong et al. (2006), realiza una comparación de diferentes resultados obtenidos por ABTS, DPPH, FRAP, y ORAC donde cuantifica la actividad antioxidante de diferentes genotipos de guaba utilizando diferentes extractos.

**Tabla 18**

*Actividad antioxidante (TEAC) de diferentes genotipos de Guaba.*

Genotipo	ABTS (TEAC)	DPPH (TEAC)
Allahabad	37.9 ± 3.4	32.07 ± 5.1
Fan Retief	34.47 ± 2.1	27.77 ± 1.7
Ruby	22.37 ± 0.9	16.27 ± 1
Selección Avanzada	29.67 ± 2.3	24.97 ± 0.5
Media de ensayo	31.17 ± 6.8	25.27 ± 6.7

Fuente: (Thaipong et al., 2006)

Ahora bien, la relación encontrada entre estos métodos (Tabla 15), permite obtener los siguientes resultados partiendo de los expresados para el ABTS.

**Tabla 19**

*Actividad antioxidante (TEAC) estimada a partir de las relaciones encontradas.*

Genotipo	ABTS (TEAC)	TEAC <sub>DPPH</sub>
Allahabad	37.9 ± 3.4	23.7
Fan Retief	34.47 ± 2.1	21.55
Ruby	22.37 ± 0.9	14
Selección Avanzada	29.67 ± 2.3	18.55
Media de ensayo	31.17 ± 6.8	19.49

Se puede notar que el valor de la media de ensayo, encontrado para los resultados TEAC mediante radical DPPH•, está por dentro del valor reportado, además el resto de los valores están lo suficientemente aproximados a los originales como para invalidar la relación encontrada. Estas pequeñas diferencias están relacionadas con el hecho de que los extractos fueron realizados en metanol, y los ensayos empleados en este trabajo utilizaron etanol como diluyente de los estándares. Esto permite formular conclusiones con respecto al uso de solventes.

Otro caso puede ser revisado de la siguiente manera. Przygodzka et al. (2014), realiza una comparación de tres métodos (ABTS, PCL, CV), para cuantificar la actividad antioxidante en algunas especies de plantas. Los resultados son los siguientes.

**Tabla 20**

*Actividad antioxidante de diferentes especies encontradas por ABTS<sup>•+</sup> y PCL.*

<b>Especie</b>	<b>ABTS (umol TX/gr masa seca)</b>	<b>PCL ( umol TX/ gr masa seca)</b>
<b>Anís Estrellado</b>	66.8 ± 1.3	22.2 ± 0.7
<b>Canela</b>	1057.1 ± 19.3	454.9 ± 17.1
<b>pimienta</b>	280.2 ± 1.5	126 ± 7.7
<b>clavo</b>	926.8 ± 64.2	805.6 ± 3.9
<b>mezcla de especias</b>	124.2 ± 0.5	18.4 ± 0.2
<b>nuez moscada</b>	358.5 ± 19.2	41.4 ± 5.6
<b>Jengibre</b>	52.8 ± 0.2	73.2 ± 6
<b>Vainilla</b>	102.3 ± 14.7	159.6 ± 0.5
<b>Hinojo</b>	26.8 ± 0.4	21.5 ± 0.7
<b>Anís</b>	12.7 ± 0.8	18 ± 0.2
<b>Cardamomo</b>	23.7 ± 0.4	12 ± 0.4
<b>Pimienta blanca</b>	40.4 ± 2.1	20.7 ± 0.1
<b>cilantro</b>	5.6 ± 0.5	9.2 ± 0.3

Fuente:(Przygodzka et al., 2014)

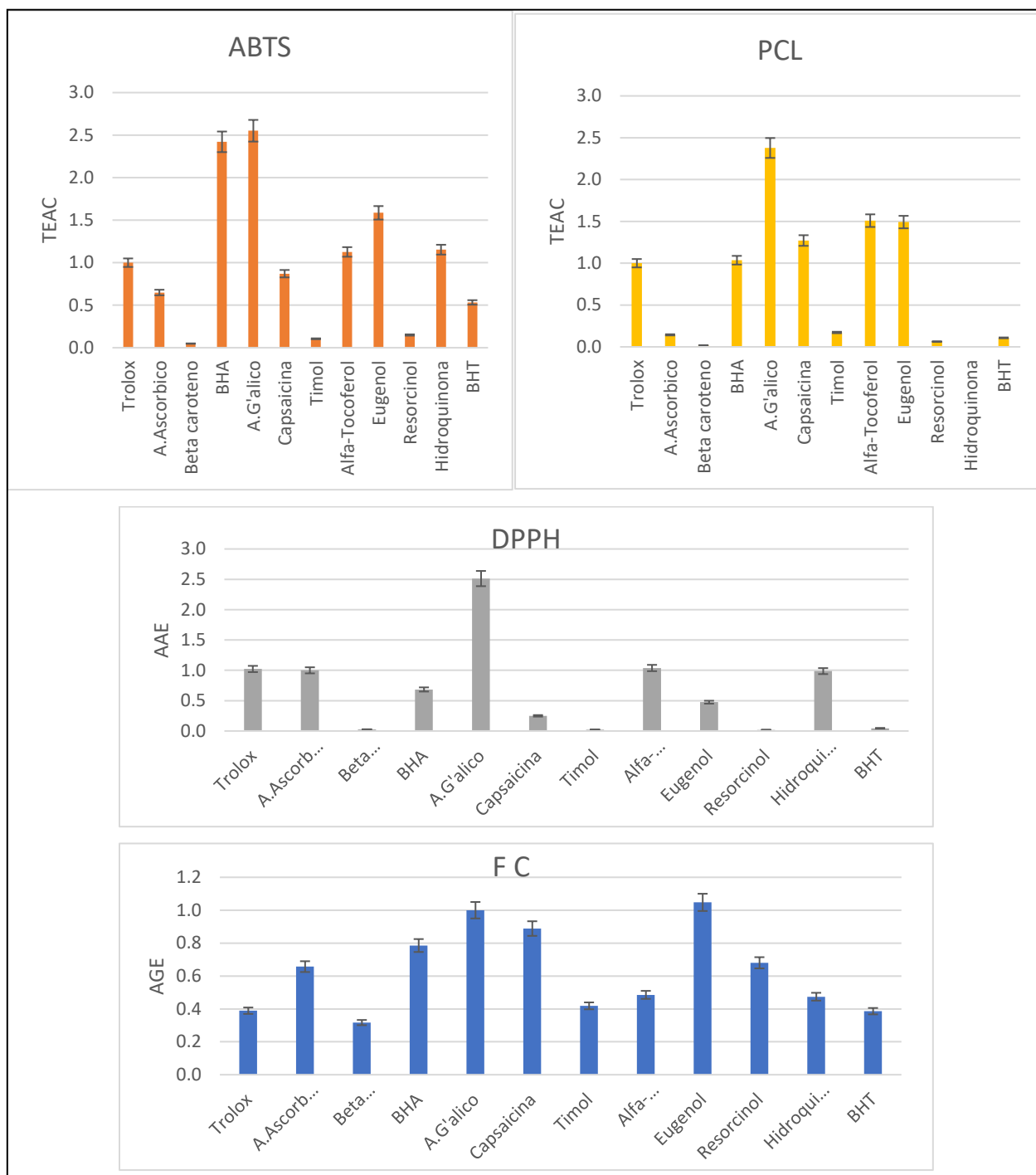
Estos resultados presentan un coeficiente de correlación de 0. 887. La correlación encontrada entre estos métodos en este trabajo, es la más alta (0.829). La expresión de estos valores con las relaciones planteadas en la tabla 15, son los siguientes.

**Tabla 21**

*Valores de AO predichos mediante las estimaciones propuestas a partir de los valores reportados por cada método.*

<b>Especie</b>	<b>TEAC ABTS</b>	<b>TEAC PCL</b>
<b>Anís Estrellado</b>	20.54816	50.3799
<b>Canela</b>	416.3821	796.0758
<b>pimienta</b>	115.5044	211.0701
<b>clavo</b>	737.2025	697.9599
<b>mezcla de especias</b>	17.07192	93.6021
<b>nuez moscada</b>	38.11232	270.03
<b>Jengibre</b>	67.20296	39.8379
<b>Vainilla</b>	146.2417	77.1114
<b>Hinojo</b>	19.9078	20.2599
<b>Anís</b>	16.706	9.6426
<b>Cardamomo</b>	11.2172	17.9256
<b>Pimienta blanca</b>	19.17596	30.5007
<b>cilantro</b>	8.65576	4.2963

Los datos encontrados a partir de las relaciones propuestas son similares para ambos casos. Además, el coeficiente de correlación de los datos originales también asegura que los datos obtenidos por los dos métodos se correlacionan positivamente. Esto dirige a que las pequeñas diferencias están relacionadas con otros aspectos como la forma de preparación de muestras, la proporción de volúmenes empleados, tipos de solvente utilizados, tiempos de registro de absorbancia, y medios de reacción apropiados. Aun así, la estimación de la actividad antioxidante es aceptable, considerando el hecho de que no se tiene la certeza de cómo fue realizada la determinación de estos valores, las relaciones propuestas en las tablas 15 y 17, proporcionan una buena estimación de la correlación entre los métodos y de cómo pueden ser utilizadas para comprobar la predictibilidad de resultados entre métodos



**Figura 46.** Actividad antioxidante de compuestos antioxidantes estándar frente a diferentes métodos. ABTS<sup>•+</sup>, PCL, DPPH<sup>•</sup>, FC

Las gráficas anteriores son una representación de la actividad antioxidante de cada estándar estudiado reportado en equivalentes del compuesto de referencia utilizado para estos métodos.

El método de Folin Ciocalteu que se utiliza para determinar la actividad debida al contenido total fenólicos ofrece resultados representativos de los compuestos utilizados. Es decir que bajo las condiciones experimentales empleadas en este trabajo, es posible determinar el contenido total fenólico de una muestra que contenga alguno de los compuestos estudiados. Sin embargo, este hecho no es tan ventajoso ya que el ácido ascórbico ha sido tomado como un componente que interfiere en el método y como se puede ver en la figura 46, es posible obtener resultados debido al ácido ascórbico, el valor correspondiente para este compuesto es 0.657 mol Á. Gálico/ mol Á. Ascórbico presente en una muestra, esto deja en evidencia el hecho de que su presencia sobreestima la actividad antioxidante debida al contenido total fenólico, que es para lo que usualmente se emplea este método.

Sin embargo, el procedimiento empleado para este método permite obtener resultados apropiados para evaluar la actividad antioxidante de compuestos lipofílicos como hidrofílicos.

Por otro lado, el análisis de actividad antioxidante usando radical ABTS con el procedimiento empleado, muestra que no es apropiado analizar este carotenoide, resorcinol, y timol. Además, el método presenta mayor sensibilidad al ácido gálico y BHT, por lo tanto, pueden ser utilizados si se buscara equivalencia en compuestos naturales, o sintéticos respectivamente. Otra característica del método es que la sensibilidad con respecto a la hidroquinona es similar que en F-C, aunque no se repite este comportamiento para su isómero resorcinol que representa mayor sensibilidad en F-C.

En el ensayo utilizando radical DPPH, se repite el comportamiento de la hidroquinona y resorcinol y aunque en la gráfica se puede notar que en este ensayo existe mayor semejanza entre la sensibilidad que representan los compuestos Trolox, Ácido Ascórbico, y  $\alpha$ -Tocoferol, que son utilizados normalmente para reportar resultados, el Ácido gálico es el antioxidante que presente mayor sensibilidad en el método.

La actividad antioxidante del Timol,  $\beta$ -Caroteno, resorcinol, y BHT, no es posible cuantificarla apropiadamente bajo el procedimiento experimental empleado. Es decir, muestras que deban su actividad antioxidante a estos compuestos, requerirán de otros métodos para ser analizadas apropiadamente. Un ejemplo de esto es el Orégano que cuya actividad antioxidante es cuantificable apropiadamente mediante F-C, pero si, por el contrario, se empleara el método con radical DPPH•, la baja sensibilidad de este método al Timol (componente mayoritario del Orégano) lo hace poco practica para llevar a cabo esta determinación.

El método PCL muestra ser particularmente sensible al Acido gálico, lo cual es relevante, ya que se empleó el protocolo establecido para analizar compuestos lipofílicos y los resultados muestran que, en efecto la actividad del ácido ascórbico no es apreciable bajo este procedimiento, mas no es el caso para el ácido gálico. También, compuestos como  $\beta$ -Caroteno, timol, resorcinol, y BHT no representan sensibilidades considerables en el método. En este caso, al igual que en el método de radical DPPH•, se deben hacer las consideraciones pertinentes si se requiere analizar actividad antioxidante debida a compuestos específicos, ya que como se puede notar, existen compuestos que no son representativos con respecto a la sensibilidad del método.



El caso excepcional es el de la hidroquinona, que manifiesta una actividad antioxidante bastante superior a la del resto de compuestos en este método (PCL). El valor hallado representa a 48 equivalentes en Trolox por cantidad de hidroquinona cuando el resto como a lo mucho se aproxima a 2.5 equivalentes.

Todos los métodos manifiestan una sensibilidad particular con el ácido gálico, y en algunos de ellos como el ABTS y F-C, es comparable con la del BHA, y eugenol respectivamente.

Los métodos basados en mecanismos mixtos (DPPH, ABTS), se utilizan de forma indistinta para analizar compuestos lipofílicos o hidrofílicos con resultados comparables entre ellos para la mayoría de los estándares empleados. Por el contrario, aunque F-C se utiliza para únicamente componentes hidrosolubles, los resultados obtenidos muestran que se pueden obtener valores apropiados también para compuestos lipofílicos siguiendo el procedimiento experimental empleado. Es decir, utilizar etanol como diluyente inicial de la muestra, es un buen recurso al trabajar con muestras lipofílicas.

Todos los compuestos antioxidantes utilizados en este trabajo poseen diferentes habilidades frente a los radicales empleados en cada ensayo. Esto incrementa la ambigüedad sobre los mecanismos de reacción entre los radicales y antioxidantes sin embargo es posible llegar a una clasificación por la habilidad que poseen para reducir iones metálicos (Folin-Ciocalteu), reducir radicales catiónicos (ABTS<sup>•+</sup>), sofocar radicales libres (DPPH<sup>•</sup>), y barrer radicales peróxidos (O<sub>2</sub><sup>-</sup>/PCL). Este enfoque dirige a, que, para llegar a un consenso para la cuantificación real de la actividad antioxidante, la cual implica las habilidades antes mencionadas, además de otras que podrían estudiarse a profundidad, se deben llevar a cabo las mediciones en los diferentes ensayos para al final dar una estimación real de la actividad antioxidante.

Sin embargo, esto podría ser impráctico por cuestiones de tiempo, dinero, y disponibilidad de equipos y reactivos, por lo que una solución a este problema podría ser desarrollar un sistema de ponderación que asigne importancia a los compuestos al que el método es más sensible, así, los valores obtenidos de los diferentes ensayos serán aditivos y ofrecerán una estimación comparable entre el resto de los compuestos.

La siguiente tabla muestra un resumen de la habilidad representativa de cada compuesto para interactuar con los radicales y/o el compuesto activo de cada método para evaluar la actividad antioxidante. Las habilidades de estos compuestos debido a su interacción generan una señal de respuesta (Actividad antioxidante) representativa a un nivel de significancia de 95% obtenida en cada ensayo, y es tomada en cuenta para señalar su participación en cada método.

**Tabla 22**

*Actividad representativa de cada compuesto antioxidante para barrer radicales de diferente naturaleza.*

Antioxidante	Reducción de iones metálicos (F-C)	Reducción de radicales catiónicos (ABTS <sup>•+</sup> )	Barrido de radicales (DPPH <sup>•</sup> )	Barrido de radicales peróxidos (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> )
A. Gálico	X	X	X	X
A. Ascórbico	X	X	X	
Trolox	X	X	X	X
β-Caroteno	X			
BHT	X	X		
BHA	X	X	X	X
Timol	X			
Eugenol	X	X	X	X
Capsaicina	X	X		X
Hidroquinona	X	X	X	X
Resorcinol	X			
α-Tocoferol	X	X	X	X

## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- El método de Folin-Ciocalteu determina la actividad antioxidante de compuestos liposolubles, utilizando como primer diluyente al etanol, y como segundo diluyente agua. Esto permite proponer consideraciones experimentales para desarrollar el ensayo enfocado a determinaciones para este tipo de compuestos.
- El ácido gálico y el eugenol son los antioxidantes más efectivos para expresar la actividad antioxidante debida al contenido total fenólico encontrado mediante F-C. Por el contrario, en este método, el menos efectivo es representado por la respuesta más débil concerniente al  $\beta$ -Caroteno, aunque es significativamente mayor que en los demás métodos. Además, entre todos los métodos estudiados, F-C es el más sensible a la capsaicina.
- Los métodos TEAC/ABTS<sup>•+</sup> y PCL se correlacionan positivamente (0.829). Los resultados son predecibles de un método al otro. La relación propuesta entre estos métodos permite relacionar los resultados obtenidos por cualquiera de estos, con una estimación cercana a los valores reportados entre investigaciones.
- Existe baja correlación entre los métodos DPPH y F-C. Bajo las condiciones y procedimientos experimentales empleados, estos métodos no presentan correlación favorable entre ellos por lo que sus resultados no son comparables.
- El ácido gálico es el compuesto más activo de los antioxidantes estudiados ya que representa la mayor sensibilidad en todos los métodos empleados.

- La hidroquinona es el compuesto con mayor actividad frente a radicales superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ ), el resultado obtenido en el método PCL es superior en gran medida al resto de los compuestos estudiados y pone en evidencia la gran habilidad de este compuesto para sofocar radicales de esta naturaleza. El rango óptimo de concentración de hidroquinona empleada en la obtención de la señal de respuesta está entre 0 y 1 nmol por cada 2300uL de disolución final.
- El BHA es el compuesto lipofílico más activo entre los métodos. Su participación en cada caso es representativa y superior a la del Trolox.
- El método TEAC/ABTS $\bullet^+$ , es más sensible al ácido gálico, BHA, y eugenol. Estos compuestos presentan alta actividad frente al radical. Por otro lado, la actividad del Trolox, es comparable con la del  $\alpha$ -Tocoferol, e hidroquinona. En menor proporción se encuentran el ácido ascórbico, capsaicina, y BHT. Lo restantes no representan una sensibilidad significativa en el método.
- El método con radical DPPH $\bullet$ , es menos susceptible a factores estéricos o de resonancia. Los antioxidantes utilizados como referencia, incluyendo a la hidroquinona, para la mayoría de los ensayos, presentan una señal de respuesta semejante, a excepción del ácido gálico que como se mencionó sobresale por ser el más activo. La interacción de los antioxidantes restantes con el radical es muy débil para ser tomada en cuenta.
- Los ensayos basados en mecanismos (HAT) son más prácticos que los (SET), por su simplicidad, y menos susceptibilidad a factores relacionados con el medio de reacción. Sin embargo, son necesarios para analizar diferentes radicales cuyo tiempo de vida si este sujeto a factores como temperatura, pH y tiempo de medición

- La cuantificación de la actividad antioxidante de un compuesto o muestra, debe seguirse por el criterio de perfil antioxidante utilizando diferentes métodos que permitan evaluar la capacidad de sofocar radicales de diferente procedencia.
- Para estandarizar los diferentes métodos que existen para cuantificar algunas de las características antioxidantes de ciertas sustancias se debe presentar procedimientos experimentales claros, la interacción que se está evaluando, los solventes que se utilizan, el tipo y origen de la muestra, y la expresión de los resultados en base a un mismo estándar de referencia para los métodos utilizados.

## 5.2.Recomendaciones

### 5.2.1. Recomendaciones para la estandarización general de los métodos de análisis de actividad antioxidante.

- Con la finalidad de disponer de datos útiles que permitan la comparación de resultados entre investigaciones, es recomendable utilizar el mismo enfoque para reportar resultados ya que las diferentes formas en que se presentan son motivo de confusión y ambigüedad. Con esto en mente es necesario continuar analizando la sensibilidad de los diferentes métodos que existen frente a antioxidantes que muestran tener una actividad representativa para estabilizar de diferentes formas a diferentes radicales. Por lo pronto, los resultados de este trabajo muestran que para los ensayos estudiados los antioxidantes más efectivos para expresar resultados es el ácido gálico y el BHA para componentes hidrosolubles y liposolubles respectivamente.
- Se debe tener claro que no todos los compuestos antioxidantes pueden ser analizados por el criterio de fase de retardo (medición del tiempo que toma la conversión oxidativa). Entonces ya que los ensayos que utilizan este criterio usualmente son los basados en mecanismos (HAT), es recomendable utilizar como estándar de referencia al compuesto más activo que en este caso continúa siendo el ácido gálico o BHA dependiendo del caso.
- Es necesario coincidir en las modificaciones que se realizan a los ensayos para adaptarlos a diferentes circunstancias de análisis. Sin embargo, también existe el riesgo de realizar cambios innecesarios a los métodos por lo tanto es recomendable comparar los cambios que se puedan ocasionar en la señal de respuesta frente a las modificaciones empleadas y llevar un registro de esto.

Por ejemplo, en este trabajo se vio que no es necesario utilizar isobutanol para diluir el reactivo de Folin-Ciocalteu para que su alcance involucre a compuesto liposolubles, ya que la correlación de resultados obtenidos para los mismos compuestos indica que modificando el solvente para diluir los reactivos es suficiente para llevar a cabo las determinaciones para los dos tipos de compuestos con resultados semejantes.

- Para tomar en cuenta las diferentes señales de respuesta que tienen los antioxidantes individuales en los diferentes métodos y dar un estimado aceptable de actividad, es recomendable desarrollar un método aritmético que permita relacionar la sensibilidad de los métodos con diferentes compuestos estudiados. La ponderación para cada compuesto es un camino aceptable que permite tomar en cuenta su actividad y por lo tanto es recomendable una vez más utilizar siempre el mismo estándar antioxidante para expresar resultados entre los diferentes métodos. Se recomienda el desarrollo de esta relación ponderada basada la respuesta obtenida en cada método para dar una expresión apropiada de los resultados y poder separar características no favorables de algunos compuestos antioxidantes.
- Por último, para estandarizar la cuantificación del perfil antioxidante de un compuesto y que los resultados sean comparables, es importante desarrollar nuevos métodos que abarquen el comportamiento de los antioxidantes frente a radicales cuya actividad es características en sistemas biológicos de esta forma los resultados serán más relevantes y los procedimientos de los métodos podrán ser reajustados para llevar a cabo este tipo de determinaciones.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aeschbach, R., Löliger, J., Scott, B., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., . . . Toxicology, C. (1994). Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *32*(1), 31-36.
- Akoh, C. C. (2017). *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*: CRC press.
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. J. S. P. J. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *21*(2), 143-152.
- Apak, R., Capanoglu, E., & Shahidi, F. (2017). *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications*: John Wiley & Sons.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., Güçlü, K. J. P., & Chemistry, A. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *85*(5), 957-998.
- Apak, R. a., Özyürek, M., Güçlü, K., & Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, *64*(5), 997-1027.
- Apak, R. a., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E. J. J. o. a., & chemistry, f. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *64*(5), 997-1027.
- Arts, M. J., Haenen, G. R., Voss, H.-P., Bast, A. J. F., & Toxicology, C. (2004). Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *42*(1), 45-49.
- Ayres, G. H. J. A. C. (1949). Evaluation of accuracy in photometric analysis. *21*(6), 652-657.



- Babich, H. J. E. R. (1982). Butylated hydroxytoluene (BHT): a review. *29*(1), 1-29.
- Barceloux, D. G. (2008). *Medical toxicology of natural substances: foods, fungi, medicinal herbs, plants, and venomous animals*: John Wiley & Sons.
- Berker, K. I., Ozdemir Olgun, F. A., Ozyurt, D., Demirata, B., Apak, R. J. J. o. a., & chemistry, f. (2013). Modified Folin–Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. *61*(20), 4783-4791.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., Berset, C. J. L.-F. s., & Technology. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *28*(1), 25-30.
- Cedrón, J. C. J. R. d. Q. (2013). La capsaicina. *27*(1-2), 7.
- Cordell, G. A., & Araujo, O. E. J. A. o. P. (1993). Capsaicin: identification, nomenclature, and pharmacotherapy. *27*(3), 330-336.
- De las Heras, B., Slowing, K., Benedi, J., Carretero, E., Ortega, T., Toledo, C., . . . Gómez-Serranillos, P. (1998). Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *Journal of ethnopharmacology*, *61*(2), 161-166.
- Didry, N., Dubreuil, L., & Pinkas, M. J. P. A. H. (1994). Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *69*(1), 25-28.
- Festjens, N., Kalai, M., Smet, J., Meeus, A., Van Coster, R., Saelens, X., . . . differentiation. (2006). Butylated hydroxyanisole is more than a reactive oxygen species scavenger. *13*(1), 166.
- Fiuza, S., Gomes, C., Teixeira, L., Da Cruz, M. G., Cordeiro, M., Milhazes, N., . . . chemistry, m. (2004). Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties—a structure–activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *12*(13), 3581-3589.

- Foti, M., Piattelli, M., Baratta, M. T., Ruberto, G. J. J. o. A., & Chemistry, F. (1996). Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure– activity relationship. *44*(2), 497-501.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. J. F. r. b., & medicine. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *18*(1), 125-126.
- Lynch, B. S., Delzell, E. S., Bechtel, D. H. J. R. t., & pharmacology. (2002). Toxicology review and risk assessment of resorcinol: thyroid effects. *36*(2), 198-210.
- Madhavi, D. L., Deshpande, S., & Salunkhe, D. K. (1995). *Food antioxidants: Technological: Toxicological and health perspectives*: CRC Press.
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., . . . Nabavi, S. M. J. F. c. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *210*, 402-414.
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica*: Pearson Educación.
- Miller, J. N., Miller, J. C., Jiménez, C. M., & Hornillos, R. I. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica*: Pearson Educación.
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food chemistry*, *130*(4), 1036-1043.
- Müller, L., Fröhlich, K., & Böhm, V. J. F. C. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay ( $\alpha$ TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *129*(1), 139-148.

- Nordlund, J., Grimes, P., Ortonne, J. P. J. J. o. t. E. A. o. D., & Venereology. (2006). The safety of hydroquinone. *20*(7), 781-787.
- Pavithra, B. J. J. o. P. S., & Research. (2014). Eugenol-a review. *6*(3), 153.
- Petke, J., Maggiora, G., Shipman, L., & Christoffersen, R. J. P. (1979). *Photochem.* *30*, 203-224.
- Popov, I., & Lewin, G. (1999). Antioxidative homeostasis: characterization by means of chemiluminescent technique. In *Methods in enzymology* (Vol. 300, pp. 437-456): Elsevier.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. J. J. o. a., & chemistry, f. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *53*(10), 4290-4302.
- Przygodzka, M., Zielińska, D., Ciesarová, Z., Kukurová, K., Zieliński, H. J. L.-F. S., & Technology. (2014). Comparison of methods for evaluation of the antioxidant capacity and phenolic compounds in common spices. *58*(2), 321-326.
- Raja, M., Srinivasan, V., Selvaraj, S., & Mahapatra, S. J. P. A. A. (2015). Versatile and synergistic potential of eugenol: a review. *6*(5), 367.
- Rajalakshmi, D., Marasimhan, S. J. F. A. T. T., & Perspectives, H. (1995). Food Antioxidants: Sources and Methods of Evaluation. *65*.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. J. F. r. b., & medicine. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *26*(9-10), 1231-1237.
- Sahu, N., & Saxena, J. J. I. A. J. o. P. R. (2013). Different methods for determining antioxidant activity: a review. *3*.

- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., & Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free radical research*, 36(2), 177-187.
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. J. F. c. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *113*(4), 1202-1205.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. J. A. j. o. E., & Viticulture. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *16*(3), 144-158.
- Suresh, S., Srivastava, V. C., Mishra, I. M. J. I. J. o. E., & Engineering, E. (2012). Adsorption of catechol, resorcinol, hydroquinone, and their derivatives: a review. *3*(1), 32.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D. H. J. J. o. f. c., & analysis. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *19*(6-7), 669-675
- Vasco, C., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food chemistry*, 111(4), 816-823.
- Verhagen, H., Schilderman, P. A., & Kleinjans, J. C. J. C.-b. i. (1991). Butylated hydroxyanisole in perspective. *80*(2), 109-134.
- Williams, G., Iatropoulos, M., Whysner, J. J. F., & toxicology, c. (1999). Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *37*(9-10), 1027-1038.

# **ANEXOS**



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y**

**MECÁNICA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN PETROQUÍMICA**

**CERTIFICACIÓN**

Se certifica que el presente trabajo fue desarrollado por el señor: Mauricio Alexander Bedón Ipiál. En la ciudad de Latacunga a los 10 días del mes de mayo de 2019.

Aprobado por:

PhD. Román Rodríguez  
**DIRECTOR DEL PROYECTO**  
**DIRECTOR DE CARRERA**

Certificado por:

Abg. Darwin Albán  
**SECRETARIO ACADÉMICO**