

Universidad de Huelva

Departamento de Ingeniería Química, Química Física y
Ciencias de los Materiales



Desarrollo e implementación de métodos electroquímicos para determinar la capacidad antioxidante de muestras orgánicas

Memoria para optar al grado de doctor
presentada por:

Alberto Palma López

Fecha de lectura: 15 de mayo de 2015

Bajo la dirección de los doctores:

Jesús Fernández Arteaga

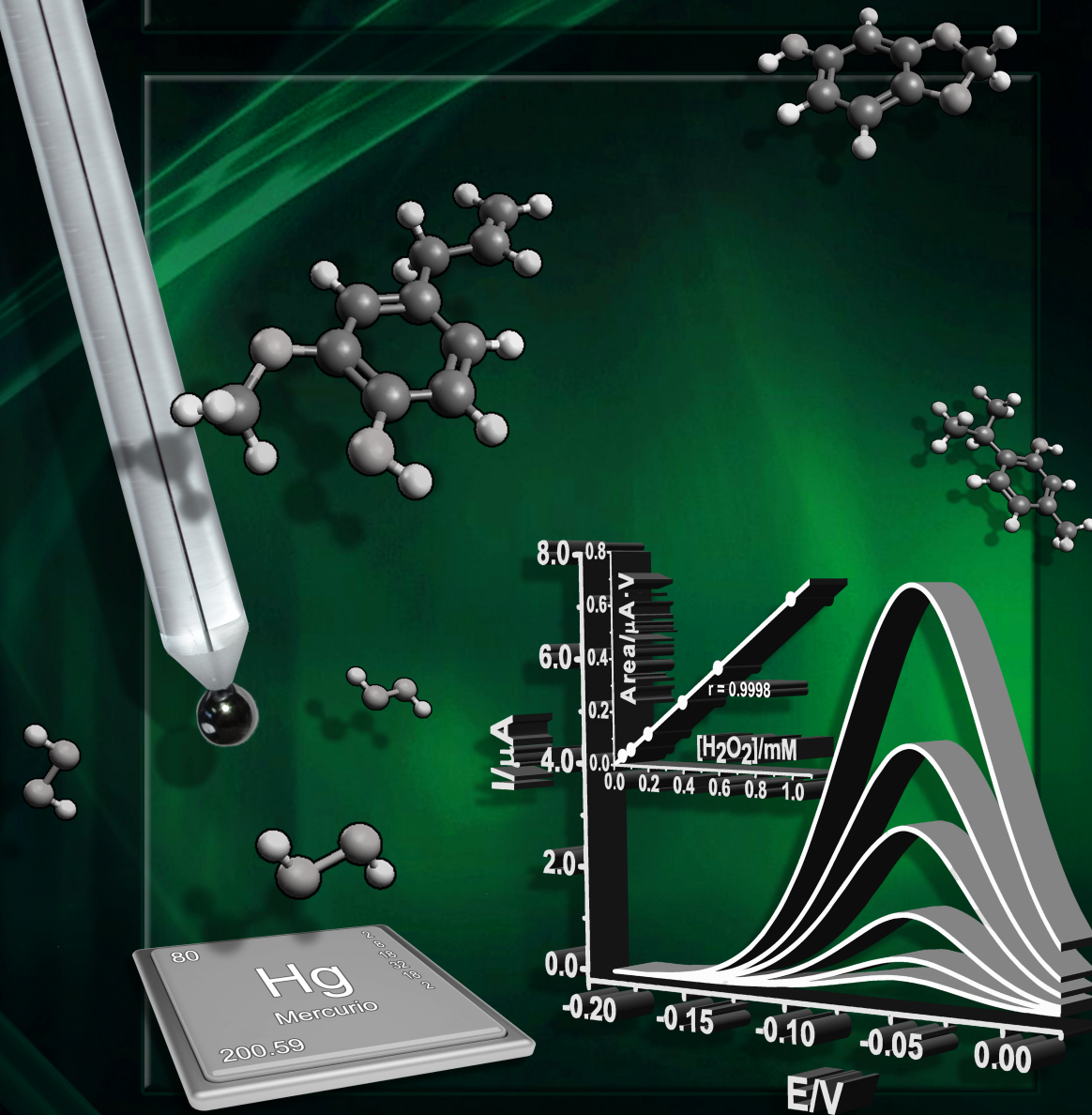
Mercedes Ruiz Montoya

José Miguel Rodríguez Mellado

Huelva, 2015



En la actualidad, el consumo de antioxidantes es sinónimo de salud. Esta afirmación, avalada por estudios científicos, es consecuencia inherente de la implicación de éstos sobre el estrés oxidativo, factor causal del envejecimiento y de múltiples enfermedades crónico-degenerativas. En la presente Tesis Doctoral se han desarrollado novedosas y prometedoras metodologías electroquímicas alternativas a métodos tradicionales como el ensayo de captura del radical DPPH', capaces de determinar de manera rápida, precisa y con bajo coste la capacidad antioxidante de principios activos presentes en especias y condimentos, así como en muestras reales de té e infusiones. Asimismo, permitió evaluar efectos sinérgicos y antagonísticos en mezclas antioxidantes mediante el desarrollo y ejecución de diseños experimentales.



Desarrollo e implementación de métodos electroquímicos para determinar la capacidad antioxidante de muestras orgánicas

Alberto Palma López
TESIS DOCTORAL

DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE MUESTRAS ORGÁNICAS

TESIS DOCTORAL



Universidad de Huelva



Universidad de Huelva
2015

Alberto Palma López

2015



UNIVERSIDAD DE HUELVA

Departamento de Ingeniería Química,
Química Física y Química Orgánica



**Universidad
de Huelva**

Desarrollo e implementación de métodos electroquímicos para determinar la capacidad antioxidante de muestras orgánicas

**Memoria para optar al Grado de Doctor
presentada por:**

Alberto Palma López

Adscrito al programa oficial de doctorado Ciencia y Tecnología Química

Bajo la dirección de los doctores:

Jesús Fernández Arteaga

Mercedes Ruiz Montoya

José Miguel Rodríguez Mellado

Huelva, Mayo de 2015

UNIVERSIDAD DE HUELVA

FACULTAD CIENCIAS EXPERIMENTALES

Departamento de Ingeniería Química,
Química Física y Química Orgánica



**Universidad
de Huelva**

**Desarrollo e implementación
de métodos electroquímicos para
determinar la capacidad antioxidante
de muestras orgánicas**

**Tesis Doctoral
Alberto Palma López
Huelva, 2015**

UNIVERSIDAD DE HUELVA

FACULTAD CIENCIAS EXPERIMENTALES

Departamento de Ingeniería Química,
Química Física y Química Orgánica



**Universidad
de Huelva**

**Desarrollo e implementación
de métodos electroquímicos para
determinar la capacidad antioxidante
de muestras orgánicas**

**Memoria para optar al Grado de Doctor en Química
por la Universidad de Huelva**

Doctorando:

Alberto Palma López

Directores:

*Dr. Jesús Fernández Arteaga
Dra. Mercedes Ruiz Montoya
Dr. José Miguel Rodríguez Mellado*

Huelva, 2015



**Universidad
de Huelva**

Departamento de Ingeniería Química,
Química Física y Química Orgánica

Campus del Carmen
Avda. de las Fuerzas Armadas, s/n
21071 HUELVA

Dr. JESÚS FERNÁNDEZ ARTEAGA y **Dra. MERCEDES RUIZ MONTOYA**, Profesores Titulares adscritos al Departamento de Ingeniería Química, Química Física y Química Orgánica de la Universidad de Huelva, así como **Dr. JOSÉ MIGUEL RODRÍGUEZ MELLADO**, Catedrático del Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada de la Universidad de Córdoba,

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria de Investigación titulada “Desarrollo e implementación de métodos electroquímicos para determinar la capacidad antioxidante de muestras orgánicas” presentada por el Licenciado en Química D. Alberto Palma López para obtener el Grado de Doctor por la Universidad de Huelva, ha sido realizada en el Departamento de Ingeniería Química, Química Física y Química Orgánica bajo nuestra dirección reuniendo todas las condiciones exigidas según la legislación vigente para su defensa como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, firman el presente certificado.

Huelva, a 16 de Abril de 2015.

VºBº Directores de Tesis

Dr. Jesús
Fernández Arteaga

Dra. Mercedes
Ruiz Montoya

Dr. José Miguel
Rodríguez Mellado

Doctorando

Alberto Palma López

“...esta es una de las principales paradojas en el campo de los radicales libres/antioxidantes que lo convierte en un terreno excitante y estimulante en el que trabajar. Es más, todos los aspectos de la vida aeróbica implican radicales libres y antioxidantes; no puedes escapar de ellos, no deberías desearlo”.

Barry Halliwell, 2007.

A mis padres,

A mis hermanos,

A mi sobrina Sofía.

AGRADECIMIENTOS

Hacia los momentos cúlmines de cualquier largo proyecto iniciado con ilusión, es inevitable no sentirse orgulloso de uno mismo, más aún si cabe, cuando éste supone toda una etapa de tu vida. La elaboración de esta Tesis Doctoral ha supuesto un verdadero reto que ha llevado consigo una serie de sacrificios que, en ocasiones puntuales, derivaron en pequeños conatos de abandono. Sin embargo, las ganas por conseguirlo, la certeza de estar haciendo lo correcto, la ilusión de mis padres y, sobre todo, el gran apoyo recibido, han hecho posible la consecución de esta inolvidable etapa investigadora. Por todo ello, quisiera aprovechar la oportunidad que me brindan estas líneas para expresar, de la manera más sincera y honesta posible, mi enorme gratitud hacia todas y cada una de las personas que durante estos años han contribuido a la realización de esta Tesis.

En primer lugar y de manera muy especial, como no podría ser de otra manera, agradecer a mis directores de Tesis la oportunidad de trabajar a su lado:

Al **Dr. Jesús Fernández Arteaga** por tu plena confianza en mí desde el primer día que llamé a tu puerta, cuando aún era estudiante de la Licenciatura, por tu apoyo y motivación diaria, por tu virtud innata de ver siempre el lado positivo a cualquier situación adversa y por ser capaz de dar soluciones a todos los obstáculos académicos y personales que han surgido; por esa amistad que me ofreció y me ofrece a pesar de nuestra gran rivalidad tenística, y por ser todo un ejemplo a seguir.

A la **Dra. Mercedes Ruiz Montoya**, simplemente, por ser tan buena persona conmigo. En todos estos años el trato personal ha sido inmejorable, siempre comprensiva y predispuesta a ayudarme en todo cuanto ha estado en tus manos, por acogerme en su grupo de investigación, dándome toda la confianza y libertad que he necesitado, por tu gran dedicación, por estar siempre disponible, por enseñarme tantísimo, tus consejos y enseñanzas han sido vitales e imprescindibles para la elaboración de este trabajo.

Al **Dr. José Miguel Rodríguez Mellado** por haber accedido de buen grado a dirigir la presente Tesis pese a la distancia que nos separa, prestándome una dedicación constante durante todo este amplio periodo de investigación.

Agradecer también a los profesores del departamento de Ingeniería Química, Química Física y Química Orgánica, en especial a los integrantes del grupo de investigación “RNM 371: Tecnología de recursos renovables y contaminación ambiental”, **Dr. Francisco López Baldovín**, **Dr. Juan Carlos García Domínguez** y **Dr. Manuel Jesús Díaz Blanco**, por abrirme las puertas de su laboratorio y apostar por mí en sus proyectos.

A la **Dra. M^a Inmaculada Giráldez Díaz**, por esa pasión y ganas que trasmite en todo lo que hace, por esa especial atención y preocupación que me ha demostrado, ofreciéndose siempre a ayudar en todo momento, sin pedir nunca nada a cambio. Son innumerables las horas de conversaciones didácticas y muchísimas las cosas que me ha enseñado.

El hecho de que me resulte extremadamente fácil recordar buenos momentos dentro del laboratorio es una prueba más que concluyente de lo que he disfrutado estos años. Se hace inevitable, a la par que necesario, agradecer a mis compañeros haber sido parte activa de esas vivencias que ahora pasaran a formar parte de mis recuerdos... **Gema**, amiga de la infancia y a quien debo estar hoy escribiendo esta Tesis. **Javi**, por ser el “jefe” de este laboratorio y servir de guía a los más nuevos, sin duda alguna, has sido el mejor ejemplo de doctorando que he podido presenciar. **Óscar y Trinidad**, como buen matrimonio unido que sois, me veo en la obligación de no separaros para deciros lo mucho que os aprecio, en especial a mi Trini, “la alegría de la huerta” y con quien he recorrido en paralelo toda esta senda investigadora. Y por último, a ti **Zoe**, por toda la ayuda prestada y por haberte ganado ser esa amiga en la que he podido confiar en todo momento.

Y continuando por la senda de la amistad, porque ésta es el ingrediente más importante en la receta de la vida, quiero agradecer a esos verdaderos **Amigos**, algunos de los cuáles, afortunadamente, conservo desde pequeño, el estar siempre ahí en los momentos buenos (atesoro cientos de “batallitas” con vosotros), como en los malos. Me voy a permitir el lujo de no dar nombres, pues estoy meramente convencido de que todos ellos lo saben.

A **Hilda y María**, por ser unas jefas magníficas y aún mejores amigas. Compaginar todos los años de doctorado impartiendo clases en vuestra academia ha sido vital para mí y siempre os estaré agradecido.

Y para concluir, he reservado de manera especial este último párrafo para mi **FAMILIA**. Dado que no soy una persona que acostumbre en el día a día a decirles

lo importante que son para mí y lo que les quiero... Estas palabras son para vosotros:

A mis padres, **Manuel y Tomi**, con todo mi cariño por ser las personas que han hecho y continúan haciendo todo en la vida para que yo pueda ir logrando todos mis objetivos, por motivarme y darme siempre el impulso necesario para afrontar todo aquello que mi inherente negatividad trata de impedir, por educarme de la manera en la que lo habéis hecho. Sin duda os debo todo lo que soy, esta Tesis es para vosotros.

A mis hermanos, **Manuel Jesús y Cristina**, porque os he tenido siempre que lo he requerido y sé que continuará siendo así el resto de mi vida.

A mi pequeña y linda sobrina, **Sofía**, por ser, sin aún consciencia de ello, la persona que más felicidad me aporta. No hay mejor momento en el día que el de estar jugando contigo. Espero que cuando seas mayor, puedas sentirte orgullosa y veas en tu “tito Alberto” un ejemplo a seguir.

A todos, muchas gracias.

*“El que da, no debe volver a acordarse;
pero el que recibe nunca debe olvidar”.*

Proverbio hebreo.

RESUMEN

Desde la más remota antigüedad el ser humano ha tratado de encontrar la manera de prolongar su vida, algunas civilizaciones incluso han pretendido conseguir la inmortalidad mediante un elixir que otorgara la eterna juventud, suceso que se antoja utópico a día de hoy, pues se trata de un hecho irrefutable que el proceso de envejecimiento es inherente a la vida, y que todo ser vivo nace, crece, envejece y muere. Sin embargo, los avances científicos y tecnológicos de las últimas décadas han conseguido prolongar la esperanza de vida notablemente.

El estrés oxidativo es uno de los procesos bioquímicos estudiados de mayor relevancia en los últimos años que surge como consecuencia de un desequilibrio entre las sustancias antioxidantes y prooxidantes. Este fenómeno se ve acrecentado actualmente por una serie de malos hábitos que se han instalado de manera alarmante en la sociedad, especialmente en la población joven. Dietas malsanas unidas al sedentarismo que originan la aparición del sobrepeso, fumar y beber en exceso, una extrema contaminación ambiental, etc., conducen, en gran medida, a que las defensas antioxidantes propias del organismo se vean absolutamente desbordadas. Se hace imprescindible adoptar remedios preventivos que eviten o retrasen, en la medida de lo posible, este continuo desequilibrio al que el cuerpo está sometido para que no comiencen a manifestarse enfermedades crónico-degenerativas, tales como el Alzheimer, Parkinson, aterosclerosis e incluso cáncer. La ingesta de productos naturales en la dieta, tales como frutas, verduras, especias y condimentos, tés e infusiones, cafés, etc., garantiza el aporte exógeno de antioxidantes necesarios para establecer una adecuada situación de “homeostasis redox” en el organismo. De este modo, resultan ser una defensa eficaz frente a la acumulación de radicales libres en el organismo, donde adquieren un papel protagonista las especies reactivas de oxígeno (ROS, en inglés), responsables de acelerar el proceso del envejecimiento celular y la aparición de dichas enfermedades. La contrastada implicación de los antioxidantes naturales dietéticos en la prevención de enfermedades hace que su búsqueda y empleo resulte especialmente interesante y estén en continuo auge debido, en gran parte, a la mejor aceptación pública que ofrecen frente a sus análogos sintéticos en cuanto a percepción de seguridad se refiere. Este estudio ha utilizado como fuentes dietéticas especias y condimentos, así como muestras de tés e infusiones, todas ellas con un alto contenido en compuestos fenólicos.

La extensa variedad de metodologías actuales para determinar la actividad antioxidante *in vitro* de productos naturales, métodos directos (ensayos ABTS^{•+}, DPPH[•], etc.) e indirectos (ensayos ORAC, FRAP, etc.) no refleja de manera completa el perfil antioxidante de una determinada muestra, debido a la complejidad de los procesos de oxidación implicados, siendo relativamente difícil la comparación de resultados como consecuencia de la diversidad de métodos experimentales adoptados. Realmente, no existe una metodología universal establecida por consenso para solventar con eficacia dicho propósito.

Esta situación actual demanda la necesidad de desarrollar metodologías alternativas con mayor eficacia. La presente investigación ha optado por metodologías electroquímicas novedosas y prometedoras que presentan una serie de ventajas importantes con respecto a las metodologías tradicionales. Constituyen una prueba rápida, reproducible, precisa y de bajo coste para la determinación de actividad de captura radical (actividad antioxidante), con un mecanismo de interacción establecido y detallado entre el antioxidante y los radicales de interés biológico hidroperoxilo (HO_2^\bullet) y superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), y fundamentada en la formación de un complejo de Hg^{2+} con HO_2^- y HO^- , aniones generados durante el proceso de electrooxidación del H_2O_2 sobre el electrodo de gota de mercurio (EGM) en medio básico (pH 10.51). Se han seleccionado 30 compuestos puros, todos ellos principios activos presentes en especias, condimentos o fármacos y pertenecientes a la familia de antioxidantes naturales de bajo peso molecular, con estructuras que pueden englobarse en dos grupos bien diferenciados: por una parte, aromáticas fenólicas y no fenólicas y, por otra, no aromáticas cíclicas y acíclicas. Se estudió la posible actividad antioxidante de dichos compuestos mediante voltametría cíclica (VC), determinándose sus potenciales de oxidación ($E_{p,a}$) bajo unas condiciones experimentales previamente optimizadas: $C_{\text{AO}} = 5 \cdot 10^{-4}$ M, pH = 10.5 y $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. La presencia de corriente anódica en los voltagramas registrados es indicativa de actividad antioxidante, siendo ésta mayor cuanto menor es el valor del $E_{p,a}$ obtenido (proceso de electrodonación favorecido). Los resultados obtenidos se han comparado por con los adquiridos mediante el ensayo de captura del radical DPPH[•], metodología espectrofotométrica basada en la interacción, en medio metanólico, del radical 1,1-difenil-2-picril-hidracilo con los antioxidantes. Los resultados reflejaron una buena correlación entre ambas técnicas, por lo que se estableció el $E_{p,a}$ como un parámetro electroquímico acertado en la evaluación de la capacidad antioxidante,

además de aportar información sobre la influencia de grupos alquilos, alcoxi y/o carbonílicos en determinadas posiciones del anillo aromático de los compuestos fenólicos. Desafortunadamente, los resultados obtenidos por VC no siempre pueden ser relacionados con la capacidad antioxidante de la muestra. Así, determinados compuestos con estructura no fenólica no presentaron corriente de oxidación en VC, además, la falta de precisión en la medida del poder antirradical (ARP), aportado por el ensayo de captura del radical DPPH[•], era significativamente grande para poder asociar un valor concreto a estas moléculas de baja actividad.

A raíz de los primeros resultados obtenidos, se desarrolló una novedosa metodología electroquímica basada en la oxidación anódica del mercurio en presencia de H₂O₂ mediante voltametría de pulso diferencial (VPD), capaz de determinar la actividad antioxidante, tanto de compuestos puros que no presentaban actividad con las metodologías anteriores, como de mezclas sintéticas de los mismos, con el objetivo final, a largo plazo, de ser implementada en muestras reales de mayor complejidad antioxidante: té, infusiones y extractos acuosos de especias como orégano, clavo, tomillo, nuez moscada y canela. Optimizada la metodología, se llevaron a cabo diseños experimentales de mezclas sintéticas cuaternarias de compuestos puros con diferente grado de actividad, observando la existencia de efectos sinérgicos y antagónicos en la actividad antioxidante global. Asimismo, se interpretó la influencia o contribución antioxidante de cada componente sobre la respuesta global obtenida.

Finalmente, se establecieron parámetros adimensionales para la cuantificación de la actividad antioxidante acordes a la nueva metodología electroquímica: el valor de la pendiente de la parte lineal obtenida en la representación del porcentaje de disminución del área de pico asociado al complejo generado a partir del proceso electrooxidativo del H₂O₂ sobre el EGM en medio básico, Hg(HO₂)(HO), frente a la cantidad o volumen de antioxidante individual añadido; el valor inverso de la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir en un 10% el área de pico, C₁₀; y, en última instancia, el parámetro μ_{10} , definido como el valor inverso del volumen de antioxidante individual o mezcla de antioxidantes necesaria para disminuir en un 10% el área de pico, V₁₀.

Palabras claves: actividad antioxidante, compuestos fenólicos, especias, té, radical DPPH[•], métodos electroquímicos, VC, VPD, electrodo de gota de mercurio, peróxido de hidrógeno, diseño experimental, sinergia antioxidante.

ACRÓNIMOS

COMPUESTOS PUROS OBJETOS DE ESTUDIO

2,4-BZ	2,4-dihidroxibenzaldehído	FA	ácido furoico
2,5-BZ	2,5-dihidroxibenzaldehído	FU	furfural
3,5-BZ	3,5-dimetoxibenzaldehído	FN	ácido 2-furanoacético
4-MA	4-metoxibenzil alcohol	GA	ácido gálico
α-PI	α-pineno	GE	geraniol
β-PI	β-pineno	HC	3-hidroxycumarina
AA	ácido ascórbico	HR	4-hexilresorcinol
BZ	benzaldehído	LI	limoneno
CA	ácido cinámico	MT	mentol
CC	carvacrol	SA	salicilaldehído
CI	cinamaldehído	SE	sesamol
CL	<i>p</i> -cloroanisol	TH	timol
CN	1,4-cineol	VA	vainillina
CU	cumarina	MT'	mentona
EU	eugenol	PU	pulegona

GENERALES

Abs	Absorbancia
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico

AEDT	Ácido etildiaminotetraacético
AF	Función área
AO	Antioxidante
ATP	Adenosín trifosfato
ARP	Poder antirradical
C_{AO}	Concentración de antioxidante
CBA	Oxidación de la crocina
CUPRAC	Capacidad antioxidante reductor de ión cúprico
CTE	Cadena de transporte electrónico.
dc	Corriente continua
DMPD	N,N- dimetil- <i>p</i> -fenilendiamina
DoE	Diseño experimental
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
EC₅₀	Concentración efectiva
EC	(-)-epicatequina
ECD	Enfermedades crónico-degenerativas
ECG	(-)-epicatequina-3-galato
ECV	Electrodo de carbón vitrificado
EGC	(-)-epigalocatequina
EGCG	(-)-epigalocatequina-3-galato
EGM	Electrodo de gota de mercurio
E_{p,a}/E_{p,c}	Potencial de pico anódico/catódico.
FRAP	Poder de reducción antioxidante del hierro
GC	(+)-galocatequina
GCG	(-)-galocatequina-3-galato

GSH	Glutación
I_{p,a}/I_{p,c}	Intensidad de pico anódico/catódico.
I.C.	Intervalo de confianza
LDL's	Lipoproteínas de baja densidad
LPx	Peroxidación lipídica
NAD	Nicotinamida adenina dinucleítido (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleítido fosfato (forma reducida)
ORAC	Capacidad de absorción del radical oxígeno
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
RL	Radical libre
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
SET	Transferencia de electrones
SOD	Superóxido dismutasa
TBARS	Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente al Trolox
TRAP	Parámetro antioxidante de captura de radicales
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico
v	Velocidad de barrido
VC	Voltametría cíclica
Vn	Valor normalizado
VPD	Voltametría de pulso diferencial

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.	Principales ROS y RNS de interés biológico	3
Tabla 2.	Principales compuestos volátiles del AE de las especias estudiadas	35
Tabla 3.	Clasificación de los ensayo de actividad antioxidante	46

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1.	Estructuras químicas de los compuestos de bajo peso molecular objetos de estudio	100
-----------------	----------------------------------------------------------------------------------------	-----

CAPÍTULO IV. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PRINCIPIOS ACTIVOS PRESENTES EN ESPECIAS Y CONDIMENTOS MEDIANTE VC COMO METODOLOGÍA ALTERNATIVA Y COMPLEMENTARIA AL ENSAYO DE CAPTURA RADIAL DPPH[•]

Tabla 1.	Parámetros electroquímicos de los antioxidantes fenólicos. [a] $C_{AO} = 5 \cdot 10^{-4}$ M, pH = 7.0 y $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. [b] $C_{AO} = 5 \cdot 10^{-4}$ M y pH = 7.0. [c] pH = 7.0 y $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$	115
Tabla 2.	Valores de $E_{p,a}$ y ARP de los compuestos puros estudiados. [a] I.C. = $\pm 0.5\%$ del valor promedio de ARP. [b] I.C. de los valores de $E_{p,a} < \pm 4\text{mV}$	125

CAPÍTULO V. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE ANTIOXIDANTES Y EROS ELECTROGENERADAS EN EL PROCESO DE OXIDACIÓN DEL H₂O₂ SOBRE ELECTRODOS DE Hg. DEDUCCIÓN DE ECUACIONES ELECTROQUÍMICAS TEÓRICAS Y DESARROLLO DE UN PARÁMETRO CINÉTICO DE MEDIDA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE VOLTAMETRÍA DIFERENCIAL DE PULSO

Tabla 1.	Valores promedio de V_{10} , μ_{10} , m y $1/C_{10}$. [a] I.C. = $\pm 1\%$ de valor promedio. $C_{AO} = 5 \text{ mM}$	140
-----------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

CAPÍTULO VI. ESTUDIO EXHAUSTIVO DEL PROCESO DE ADICIÓN DE ANTIOXIDANTE EN EL MECANISMO DE OXIDACIÓN DEL H₂O₂ SOBRE ELECTRODO DE Hg. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS ACUOSOS DE ESPECIAS

Tabla 1. Parámetros de actividad antioxidante. ^[a] I.C. = ±1% del valor promedio de m. ^[b] C_{AO} = 5 mM. ^[c] I.C. = 0.5% del valor promedio del ARP. ^[d] I.C. de los valores de E_{p,a} < ±4mV..... 155

Tabla 2. Parámetro μ₁₀ de mezclas de antioxidantes. ^[a] Concentración de antioxidante expresada en mM. ^[b] I.C. = ±1% del valor promedio 157

Tabla 3. Parámetros antioxidantes V₁₀, μ₁₀, W₅₀ y ARP. Principales antioxidantes presentes en los AE de las especias estudiadas.. 160

CAPÍTULO VII. APLICACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL AL ESTUDIO SINÉRGICO DE MEZCLAS ANTIOXIDANTES SINTÉTICAS

Tabla 1. Experimentos del diseño experimental aplicado al estudio sinérgico de mezclas antioxidantes sintéticas. ^[a] I.C. = ±1% del valor promedio 168

CAPÍTULO VIII. IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA ELECTROQUÍMICA EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MUESTRAS REALES: TÉS E INFUSIONES

Tabla 1. Parámetros antioxidantes V₁₀, μ₁₀, W₅₀ y ARP obtenidos para los extractos acuosos de los téis e infusiones comerciales analizados. ^[a] I.C = ±1% del valor promedio de μ₁₀. ^[b] I.C = 0.5% del valor promedio del ARP 183

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Figura 1.	Transformación secuencial del oxígeno en agua en la cadena de transporte electrónico mitocondrial mediante reducción progresiva (vía univalente).....	5
Figura 2.	Curvas de energía potencial del oxígeno molecular. Configuraciones electrónicas de los orbitales moleculares del O_2 y 1O_2	6
Figura 3.	Principales fuentes de formación de radicales libres	11
Figura 4.	Daños y enfermedades asociadas al estrés oxidativo	16
Figura 5.	Mecanismo de ataque de RL a biomoléculas.....	17
Figura 6.	Etapas del proceso de peroxidación lipídica.....	19
Figura 7.	Características del proceso de envejecimiento	23
Figura 8.	Teorías del proceso de envejecimiento	25
Figura 9.	Distribución cronológica de las publicaciones relacionadas con métodos de determinación de actividad antioxidante (SCOPUS, enero 2015).....	28
Figura 10.	Mecanismos de reacción antioxidante SET y HAT.....	30
Figura 11.	Clasificación de las familias de compuestos fenólicos.....	33
Figura 12.	Diagrama de flujo del procesado de los diferentes tipos de té	36
Figura 13.	Flavonoides del té verde y té negro.....	37
Figura 14.	Estructura química de las principales catequinas del té	38
Figura 15.	Reactividad fisicoquímica básica del grupo funcional fenol	41
Figura 16.	Diseño experimental factorial completo 3^3 (Izquierda). Fracciones del diseño factorial fraccionado 3^{3-1} (Derecha)	44
Figura 17.	Espectro de absorción del radical DPPH [•] y de su especie reducida DPHP-H tras la reacción del radical DPPH [•] con el antioxidante (AO-H).....	55

Figura 18.	Señal triangular de excitación del potencial en VC.....	59
Figura 19.	Voltagrama cíclico reversible. Perfiles de concentración de la especie reducida y oxidada en las proximidades del ECV.....	60
Figura 20.	Señal de excitación y voltagrama característico en VPD.....	64

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 1.	Espicias, condimentos, té e infusiones comerciales objetos de estudio.....	101
Figura 2.	Equipo instrumental electroquímico CHI650A. Celda analítica con sistema de 3 electrodos	102
Figura 3.	Espectrofotómetro Genesys 10 uv utilizado en el ensayo de captura del radical DPPH [•]	103
Figura 4.	Efecto del pulido y tiempo de medición sobre la respuesta voltamétrica en ECV. 10^{-3} M EU, pH = 7.0 y $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$	104
Figura 5.	Procedimiento experimental para la determinación de la actividad antioxidante de compuestos puros y extractos acuosos de especias, té e infusiones mediante VC.....	105
Figura 6.	Procedimiento experimental para la determinación de la actividad antioxidante de compuestos puros y extractos acuosos de especias, té e infusiones mediante VDP	106
Figura 7.	Calibración lineal del radical DPPH [•]	107

CAPÍTULO IV. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PRINCIPIOS ACTIVOS PRESENTES EN ESPECIAS Y CONDIMENTOS MEDIANTE VC COMO METODOLOGÍA ALTERNATIVA Y COMPLEMENTARIA AL ENSAYO DE CAPTURA RADIAL DPPH[•]

Figura 1.	Influencia de la concentración sobre 2,5-BZ. Análisis del $E_{p,a}$ e $I_{p,a}$ frente al $\log C_{AO}$ y la C_{AO} , respectivamente. pH = 7.0 y $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$	113
------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Figura 2.	Influencia de la concentración sobre SE y SA. pH = 7.0 y $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$	113
Figura 3.	Influencia de la concentración sobre VA y TH. pH = 7.0 y $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$	114
Figura 4.	Influencia del pH sobre 2,5-BZ. Análisis del $E_{p,a}$ e $I_{p,a}$ frente al pH. $C_{AO} = 5\cdot 10^{-4} \text{ M}$ y $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$	115
Figura 5.	Influencia del pH sobre GA, EU, TH y HC. $C_{AO} = 5\cdot 10^{-4} \text{ M}$ y $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$	116
Figura 6.	Influencia de la velocidad de barrido sobre SE. Análisis del $E_{p,a}$ y $\log I_{p,a}$ con el $\log v$. $C_{AO} = 5\cdot 10^{-4} \text{ M}$ y $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$	117
Figura 7.	Influencia de la velocidad de barrido sobre TH, 2,5-BZ, VA y 2,4-BZ. $C_{AO} = 5\cdot 10^{-4} \text{ M}$ y pH = 7.0	118
Figura 8.	Comportamiento cinético de VA, 2,5-BZ, SE y AA en el ensayo de captura del radical DPPH [•]	120
Figura 9.	Cinética EU. Determinación del estado estacionario	120
Figura 10.	Voltagramas de compuestos con actividad antioxidante	121
Figura 11.	Voltagramas de compuestos sin actividad antioxidante	122
Figura 12.	Determinación del parámetro EC_{50} del 2,5-BZ, EU, AA y HR	124
Figura 13.	Valor límite de $E_{p,a}$ asociado a propiedades antioxidantes.....	126
Figura 14.	Correlación de los parámetros de actividad antioxidante obtenidos mediante el ensayo de captura del radical DPPH [•] y VC del conjunto de antioxidantes activos	126

CAPÍTULO V. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE ANTIOXIDANTES Y EROS ELECTROGENERADAS EN EL PROCESO DE OXIDACIÓN DEL H₂O₂ SOBRE ELECTRODO DE Hg. DEDUCCIÓN DE ECUACIONES ELECTROQUÍMICAS TEÓRICAS Y DESARROLLO DE UN PARÁMETRO CINÉTICO DE MEDIDA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE VOLTAMETRÍA DIFERENCIAL DE PULSO

Figura 1. Efecto del porcentaje de etanol sobre el voltagrama PD (a) y polarograma dc (b) de H₂O₂ 5·10⁻³ M. pH 10.51..... 132

Figura 2. Efecto de la concentración de H₂O₂ en VPD. Recuadro: Representación del área de pico vs concentración de H₂O₂. pH 10.51 y 30% EtOH..... 133

Figura 3. Efecto de la de la concentración de HC en la distorsión del pico de oxidación del H₂O₂. Medida del parámetro b..... 137

Figura 4. Efecto de la concentración de HC en la disminución del área del pico de oxidación del H₂O₂ 138

Figura 5. Porcentaje de disminución del área de pico de oxidación del H₂O₂, parámetro b y función área (AF) del GA y HC 5 mM. Determinación del parámetro cinético m..... 139

Figura 6. Representación gráfica de los parámetros V₁₀ y μ₁₀ tabulados.... 140

Figura 7. Representación gráfica de los parámetros m y 1/C₁₀ tabulados. Relación experimental de los resultados obtenidos para ambos parámetros 141

Figura 8. Relación lineal entre los parámetros m y 1/C₁₀..... 143

CAPÍTULO VI. ESTUDIO EXHAUSTIVO DEL PROCESO DE ADICIÓN DE ANTIOXIDANTE EN EL MECANISMO DE OXIDACIÓN DEL H₂O₂ SOBRE ELECTRODO DE Hg. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS ACUOSOS DE ESPECIAS

Figura 1. Voltagramas cíclicos de disoluciones de SE 0.5 mM en presencia de cantidades crecientes de H₂O₂ 5·10⁻² M. Volumen celda 10 mL, pH 10.51 150

Figura 2.	Disminución del área de pico de los voltogramas DP de la onda de oxidación obtenida para una solución $5 \cdot 10^{-4}$ M H_2O_2 sobre el EGM tras adiciones de volúmenes crecientes de AO 5 mM.....	153
Figura 3.	Disminución del área de pico para concentraciones variables de VA. Recuadro: representación gráfica de V_{10} vs concentración de VA para un 10% de disminución.....	154
Figura 4.	Correlación entre los parámetros m y μ_{10}	156
Figura 5.	Clasificación de las muestras antioxidantes en base a la presencia de efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos	158
Figura 6.	Disminución del área VPD de la disolución $5 \cdot 10^{-4}$ M H_2O_2 con la adición de volúmenes crecientes de disoluciones antioxidantes: extractos acuosos de especias estudiadas.....	159
Figura 7.	Correlación entre los parámetros ARP y μ_{10} de los extractos acuosos de las especias estudiadas.....	161

CAPÍTULO VII. APLICACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL AL ESTUDIO SINÉRGICO DE MEZCLAS ANTIOXIDANTES SINTÉTICAS

Figura 1.	Clasificación de las mezclas antioxidantes del DoE en base a la presencia de efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos ..	169
Figura 2.	Variación de la variable dependiente en función de las variables independientes normalizadas. Influencia, en %, de los antioxidantes sobre el valor de μ_{10} en el conjunto de mezclas del DoE	170
Figura 3.	Actividad antioxidante individual, $C_{AO} = 0.5$ mM (azul). Variación de la influencia total de las interacciones ejercidas por el resto de componentes sobre el conjunto de mezclas del DoE (verde)	171

Figura 4.	Influencia, en %, sobre la actividad antioxidante individual ($C_{AO} = 0.5 \text{ mM}$) asociada a las interacciones del resto de componentes sobre el conjunto de mezclas establecidas en el DoE.....	172
Figura 5.	Efectos sinérgicos y antagónicos observados en las distintas combinaciones de los antioxidantes presentes en las mezclas del DoE	174
Figura 6.	Influencia de la concentración de eugenol en la actividad antioxidante global de mezcla	175

CAPÍTULO VIII. IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA ELECTROQUÍMICA EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MUESTRAS REALES: TÉS E INFUSIONES

Figura 1.	Voltagrama cíclico de EGCG 0.05 mM (A) y de extractos acuosos de té e infusiones (B, C, D) a $\text{pH} = 7.0$ y $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$	180
Figura 2.	Determinación de la actividad antioxidante mediante VPD de té e infusiones comerciales	182
Figura 3.	Actividad antioxidante (μ_{10} y ARP) de extractos acuosos de té e infusiones analizadas	184
Figura 4.	Correlación débil entre los parámetros μ_{10} y ARP para los extractos acuosos de té e infusiones analizadas	184

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	I
Resumen.....	V
Acrónimos	IX
Índice de tablas y figuras	XIII
Índice de capítulos	XXI

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1. Especies oxidantes. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno	1
1.1. Concepto de radical libre.....	1
1.2. Clases de radicales libres.....	2
1.3. Oxígeno. Especies reactivas de oxígeno en sistemas biológicos.....	3
1.3.1. Oxígeno Singlete	6
1.3.2. Anión radical superóxido.....	7
1.3.3. Peróxido de hidrógeno	8
1.3.4. Radical hidroxilo	9
1.3.5. Radical perhidroxilo.....	10
1.3.6. Radical alcoxilo y radical peroxilo	10
1.4. Génesis de radicales libres	11
1.4.1. Fuentes exógenas	12
1.4.2. Fuentes endógenas.....	13
2. Estrés oxidativo en la salud humana.....	15
2.1. Daño biomolecular mediado por el estrés oxidativo	17
2.1.1. Daño oxidativo a proteínas	18
2.1.2. Daño oxidativo a lípidos	19
2.1.3. Daño oxidativo a glúcidos	20
2.1.4. Daño oxidativo al ADN	20
2.2. Envejecimiento biológico	21
2.2.1. Concepto de envejecimiento	22
2.2.2. Teorías del envejecimiento	23
2.2.2.1. Teoría del “envenenamiento” por ROS	25
2.2.2.2. Teoría de los radicales libres	25
3. Antioxidantes.....	27

3.4.1.3. Métodos de análisis de actividad antioxidante que utilizan mecanismos de reacciones SET y HAT	53
3.4.1.3.1. ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) o TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).....	53
3.4.1.3.2. DPPH (1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl).....	54
3.4.2. Técnicas electroquímicas voltamétricas	57
3.4.2.1. Voltametría cíclica	58
3.4.2.2. Voltametría de pulso diferencial	63
4. Bibliografía	65

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

1. Objetivos	91
1.1. Objetivo general.....	91
1.2. Objetivos específicos	93

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales	97
1.1. Reactivos químicos.....	97
1.2. Muestras de estudio	98
1.2.1. Compuestos puros de bajo peso molecular	98
1.2.2. Tés e infusiones de especias y condimentos.....	101
1.3. Instrumental de análisis.....	102
1.3.1. Instrumental electroquímico	102
1.3.2. Instrumental de espectrofotometría.....	103
2. Métodos	103
2.1. Metodología electroquímica.....	103
2.1.1. Voltametría cíclica.....	103
2.1.2. Voltametría de pulso diferencial.....	105
2.2. Metodología espectrofotométrica	107

**CAPÍTULO IV: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PRINCIPIOS
ACTIVOS PRESENTES EN ESPECIAS Y CONDIMENTOS MEDIANTE VC COMO
METODOLOGÍA ALTERNATIVA y COMPLEMENTARIA AL ENSAYO DE
CAPTURA DEL RADICAL DPPH[•]**

1. Introducción	111
2. Experimental	112
2.1. Voltametría cíclica.....	112
2.1.1. Condiciones óptimas de medida.....	112
2.1.1.1. Estudio con la concentración	112
2.1.1.2. Estudio con el pH.....	115
2.1.1.3. Estudio con la velocidad de barrido	116
2.2. Ensayo de captura del radical DPPH [•]	119
2.2.1. Influencia de la cinética antioxidante en la captura del radical DPPH [•] . Determinación del estado estacionario	119
3. Resultados y discusión	121
3.1. Voltametría cíclica.....	121
3.2. Ensayo de captura del radical DPPH [•]	124
4. Bibliografía	127

**CAPÍTULO V: ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE ANTIOXIDANTES Y ROS
ELECTROGENERADAS EN EL PROCESO DE OXIDACIÓN DEL H₂O₂ SOBRE
ELECTRODO DE Hg. DEDUCCIÓN DE ECUACIONES ELECTROQUÍMICAS
TEÓRICAS Y DESARROLLO DE UN PARÁMETRO CINÉTICO DE MEDIDA DE
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE VOLTAMETRÍA VPD**

1. Introducción	131
2. Experimental	132
2.1. Efecto del etanol.....	132
2.2. Efecto de la concentración de H ₂ O ₂	133
3. Resultados y discusión	134
4. Bibliografía	143

CAPÍTULO VI: ESTUDIO EXHAUSTIVO DEL PROCESO DE ADICIÓN DE ANTIOXIDANTE EN EL MECANISMO DE OXIDACIÓN DEL H₂O₂ SOBRE ELECTRODO DE Hg. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS ACUOSOS DE ESPECIAS

1. Introducción	149
2. Análisis del proceso electroquímico.....	149
3. Resultados y discusión	153
4. Bibliografía	161

CAPÍTULO VII: APLICACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL AL ESTUDIO SINÉRGICO DE MEZCLAS ANTIOXIDANTES SINTÉTICAS

1. Introducción	165
2. Experimental	166
2.1. Selección de antioxidantes	166
2.2. Elección del rango de concentración	166
3. Resultados y discusión	167
4. Bibliografía	176

CAPÍTULO VIII: IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA ELECTROQUÍMICA EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MUESTRAS REALES: TÉS E INFUSIONES

1. Introducción	179
2. Resultados y discusión	179
2.1. Aplicación de las técnicas electroquímicas	179
2.2.1. Voltametría cíclica.....	179
2.2.2. Metodología desarrollada basada en la voltametría de pulso diferencial.....	181
2.2. Contraste de la metodología electroquímica desarrollada con el ensayo de captura del radical DPPH*	182
3. Bibliografía	186

CAPÍTULO IX: CONCLUSIONES

1. Conclusiones.....	191
----------------------	-----

CAPÍTULO X. ANEXOS

1. Deducción teórica de las relaciones i-E del mecanismo de oxidación del H ₂ O ₂ en el EGM en presencia de antioxidante.....	197
2. Análisis estadístico del diseño experimental	201
2.1. Modelo matemático asociado al diseño experimental.....	201
2.2. Influencia estadística de las variables independientes sobre la variable dependiente considerada	202
3. Bibliografía	204
4. Publicaciones	205
5. Comunicaciones.....	235

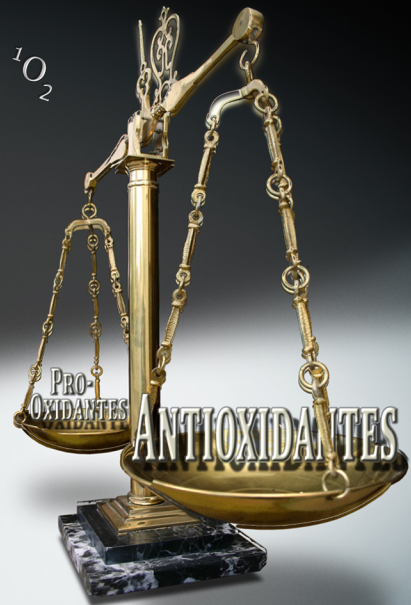
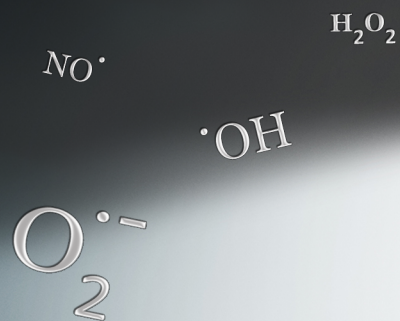
CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

HOO^\bullet

RO^\bullet

ESTRÉS OXIDATIVO



1. ESPECIES OXIDANTES. RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

1.1. CONCEPTO DE RADICAL LIBRE

El modelo atómico actual establece que el átomo se compone de un núcleo, constituido principalmente por protones y neutrones, y una corteza de electrones en torno a él. Los electrones se encuentran distribuidos según sus niveles energéticos en diferentes regiones del espacio denominadas orbitales. Cada orbital puede albergar un máximo de dos electrones girando sobre sus propios ejes en sentidos opuestos, anulándose mutuamente sus campos magnéticos individuales asociados al giro, confiriéndose de esta manera propiedades diamagnéticas al átomo o molécula. Por esta razón, un electrón desapareado busca necesariamente la asociación directa con otro electrón con el que poder así aparear sus *spin* en un sistema de baja energía, adquiriendo la estabilidad termodinámica deseada.

Un radical libre (RL) es una especie química, átomo, molécula, o bien, un fragmento de ésta, con existencia independiente, que posee al menos un electrón desapareado, ya sea por pérdida o ganancia de éste, en su orbital más externo.^[1] En ocasiones, pueden presentar carga positiva o negativa.

La presencia de un electrón solitario lleva asociado consigo un momento magnético no compensado denominado “magnetón Bohr”, que dota al átomo o molécula de propiedades paramagnéticas. Por consiguiente, se ocasiona una inestabilidad en la configuración electrónica de los RL, hecho que se traduce en una elevada e indiscriminada reactividad hacia estructuras moleculares adyacentes como consecuencia de la necesidad imperiosa de adquirir la estabilidad perdida.^[2] La interacción con otros compuestos químicos puede atender a tres posibles casos: el radical puede ceder su electrón desapareado (radical reductor), tomar uno de una molécula estable apareando así su propio electrón (radical oxidante), o bien, puede enlazarse covalentemente a una molécula estable. En cualquiera de las situaciones descritas, el RL compensa su orbital incompleto; sin embargo, este logro es alcanzado, irremediablemente, a expensas de desestabilizar la configuración electrónica del compuesto químico con el que reacciona, provocando la formación de un nuevo radical libre químicamente agresivo.^[3] A través de estos mecanismos, los RL dan lugar a reacciones en cascada con formación continua de estas especies reactivas. El proceso finaliza sólo cuando coinciden dos radicales que pueden combinar sus

electrones desapareados y unirse mediante un enlace covalente. En ocasiones, pueden existir especies estables en forma de RL.^[4] La formación de un RL también puede originarse a través de una ruptura homolítica de una molécula estable.^[5]

Es destacable que la alta reactividad característica de estas especies radicales es la responsable de su toxicidad y su corta vida media,^[6,7] o tiempo transcurrido desde el origen del RL hasta que se produce la correspondiente captación de un electrón adyacente o la cesión de su electrón desapareado. Las reacciones promovidas por los RL atienden a tres posibles tipos: reacciones de iniciación, propagación y terminación.^[8]

Numerosos estudios científicos revelan la implicación de estas especies reactivas, mediante fenómenos de oxidación celular, en determinadas enfermedades crónico-degenerativas (ECD) que afectan al ser humano como Alzheimer, Parkinson o enfermedad de Crohn, y a su vez, en ciertos tipos de cánceres.^[9-11] A pesar de lo citado, su generación *in vivo* por parte de los organismos vivos como productos del metabolismo celular, hace indicar que desempeñan determinadas funciones establecidas tales como mantener activo el sistema inmunológico, actuar de segundos mensajeros, estimular la proliferación celular y/o intervenir como mediadores y reguladores para la activación de células. El desarrollo de estas funciones es llevado a cabo cuando están presentes en concentraciones fisiológicas. Por el contrario, en concentraciones elevadas, como consecuencia de la sobreexigencia a la que se somete el cuerpo en su control, resultan altamente perjudiciales debido sus características oxidantes.^[10]

1.2. CLASES DE RADICALES LIBRES

Los RL, desde un punto de vista molecular, son pequeñas moléculas ubicuas y difusibles que se generan *in vivo* producto de nuestro metabolismo celular. Las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Spices*) son los RL más destacados, no sólo por su elevada abundancia procedente de la respiración aeróbica, sino también por sus conocidas implicaciones en procesos relevantes como el deterioro de alimentos, el envejecimiento celular y una gran diversidad de patologías de ECD, justificando así el hecho de que sean los RL más conocidos y estudiados.^[12-15]

De manera análoga, existen especies reactivas de nitrógeno (RNS), de cloro (RClS) y de bromo (RBrS).^[12] En la Tabla 1 se presentan las principales especies radicales y no radicales de los dos grandes grupos de especies reactivas implicados en la biología redox.^[13]

	Radicales	No radicales
ROS	Anión superóxido, $O_2^{\bullet -}$ Hidroxiilo, $\bullet OH$ Hidroperoxilo, HO_2^{\bullet} Alcoxilo, RO^{\bullet} Peroxilo, RO_2^{\bullet}	Oxígeno Singlete, 1O_2 Ozono, O_3 Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
RNS	Óxido nítrico, NO^{\bullet} Dióxido de nitrógeno, NO_2^{\bullet}	Óxido nítrico, NO Peroxinitrito, ONO_2^- Peróxido de nitrógeno, $ONO_2^{\bullet -}$ Ión nitrosilo, NO^- / NO^+

Tabla 1. Principales ROS y RNS de interés biológico.

1.3. OXÍGENO. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

El ser humano vive sumergido en un mar de aire constituido, entre otros gases, por un 21% de oxígeno molecular. Este recurso natural es indispensable para el desarrollo de la vida y resulta imprescindible para el mantenimiento de las funciones vitales del hombre. Metafóricamente hablando, el O_2 puede ser considerado el combustible de la vida. Se trata del RL más abundante en los sistemas biológicos y su estado basal recibe el nombre de estado triplete, [3O_2]. Presenta dos electrones desapareados en su orbital más externo con idéntico *spin*, hecho que, además de proporcionar carácter paramagnético a la molécula, propició la aparición de la connotación “dirradical” en el año 1924.^[16] Esta disposición paralela de los *spin* conlleva que la molécula de O_2 sólo interactúe con radicales cuyos electrones tengan *spin* complementarios a los suyos, fenómeno denominado “restricción de *spin*”, es decir, previene la

adición directa de un par de electrones hacia la molécula, ya que sería necesaria una inversión del *spin* de uno de los electrones antes de producirse la unión, evitando así colocarse dos electrones con el mismo *spin* en un mismo orbital. Sin embargo, como consecuencia de la relativa lentitud del proceso de inversión del *spin* en comparación con la vida media de los elementos colisionantes, la molécula de oxígeno en su estado fundamental se comporta como un oxidante relativamente débil, lo que permite, afortunadamente, la coexistencia de materia orgánica y oxígeno libre. Sin embargo, una consecuencia inherente de la restricción de *spin* es que se ve favorecida, siempre que sea posible desde el punto de vista energético, la vía de reducción univalente por parte del estado fundamental del oxígeno, ocasionando como resultado inevitable la aparición de ROS.^[17-19]

El O₂ actúa comoceptor final de electrones en el proceso respiratorio a nivel celular originado en las mitocondrias con el fin de obtener energía. La reducción del oxígeno para producir agua en la cadena de transporte electrónico (CTE) requiere 4 electrones (reducción tetravalente), siendo considerado un proceso relativamente seguro. Sin embargo, el ambiente reductor del medio intracelular favorece la existencia de reducciones univalentes (Figura 1), desencadenando la formación de ROS. La potencial naturaleza oxidante de estas especies hacia otras moléculas es el precio inevitable que han de pagar las células aerobias y de la que han de defenderse constantemente. Irónicamente, la molécula que nos mantiene vivos es cómplice de nuestra muerte, resultando ser la principal causa del envejecimiento, con implicación directa en la oxidación de células del organismo. Este singular hecho es conocido como la *Paradoja del oxígeno*.^[20]

La producción excesiva de ROS a nivel mitocondrial durante el ejercicio físico para suplir la demanda de ATP generada es bien conocida.^[21] No obstante, la producción en pequeñas cantidades de las mismas durante el fenómeno de hipoxia muscular que se desarrolla durante el esfuerzo físico prolongado resulta nuevamente paradójico.^[14] En respuesta a la aparición del fenómeno de hipoxia, la mitocondria puede actuar como sensor de oxígeno produciendo de manera controlada el anión superóxido en el complejo III de la CTE.^[15]

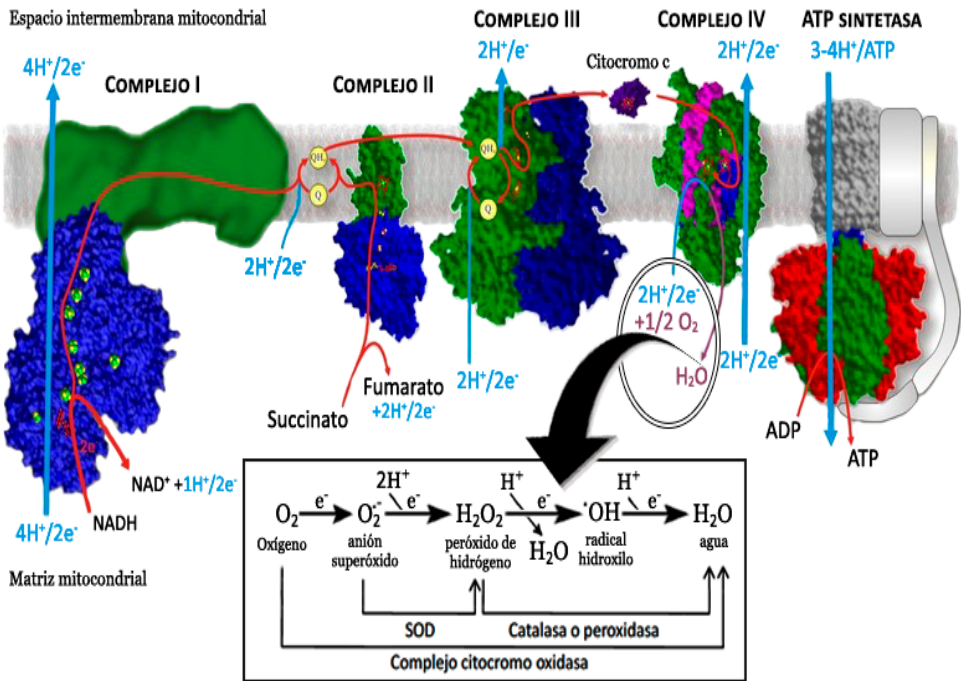


Figura 1. Transformación secuencial del oxígeno en agua en la cadena de transporte electrónico mitocondrial mediante reducción progresiva (vía univalente).

El término especies reactivas de oxígeno engloba a un amplio colectivo de especies reactivas que, radicales o no, centran su reactividad en un átomo de oxígeno. Algunas moléculas precursoras de RL, como por ejemplo el H₂O₂, están también incluidas en esta connotación. La elevada toxicidad asociada a estas especies viene determinada desde el punto de vista químico, mientras que la reactividad obedece a sus estructuras electrónicas moleculares. También han de tenerse en consideración factores como la especificidad, selectividad y difusividad. Las ROS con mayores capacidades de difusión son H₂O₂, O₂⁻ y ·OH respectivamente,^[22] permitiéndoles reaccionar con moléculas muy alejadas de sus lugares de origen, e incluso, ser capaces de atravesar membranas, aumentando así considerablemente su radio de acción y potencial reactividad.

1.3.1. OXÍGENO SINGLETE

El O_2 presenta cuatro configuraciones electrónicas diferentes debido a las diversas posibilidades de distribución que poseen sus electrones desapareados. El estado de máxima multiplicidad y menor energía (estado basal) se denomina “estado triplete”, $^3\Sigma_g^-$, seguido por dos estados singletes con idéntica y superior energía, denominándose el conjunto $^1\Delta_g$, y finalizando, otro estado singlete, $^3\Sigma_g^+$, esta vez con energía aún mayor que los anteriores (Figura 2). Las posibles transiciones entre los diferentes estados electrónicos resultan muy improbables, la transición del estado excitado, $^1\Delta_g$, al estado basal, $^3\Sigma_g^-$, está prohibida por *spin*, de este modo, el estado $^1\Delta_g$ posee un tiempo de vida relativamente largo. En cambio, el segundo estado excitado de mayor energía, $^3\Sigma_g^+$, posee un tiempo de vida corto originado por la permisibilidad de *spin* de las transiciones hacia el estado excitado de menor energía.

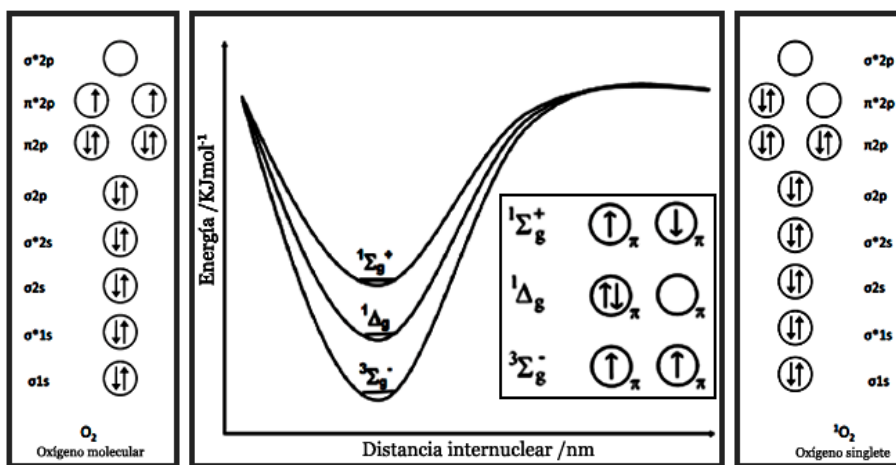


Figura 2. Curvas de energía potencial del oxígeno molecular.

Configuraciones electrónicas de los orbitales moleculares del O_2 y 1O_2 .

El 1O_2 se corresponde con el estado electrónicamente excitado de menor energía del oxígeno molecular en el que los dos electrones albergados en los últimos orbitales antienlazantes se configuran con *spin* opuestos, dando como resultado un agente fuertemente oxidante y, en consecuencia, una especie electrófila sumamente reactiva a pesar de no tratarse de un radical libre propiamente dicho.

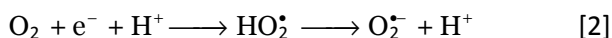
Su generación se produce por absorción de energía electromagnética por parte del oxígeno molecular, invirtiéndose de manera transitoria el sentido de rotación de uno de sus electrones desapareados durante el proceso, consiguiendo así una adecuada orientación antiparalela de los *spin* de los electrones albergados en los orbitales antienlazantes más externos. No obstante, el proceso de formación está limitado debido a la restricción de la absorción de grandes cantidades de energía electromagnética a acontecimientos fotoquímicos.^[23,24]



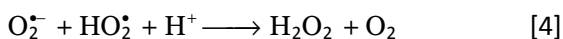
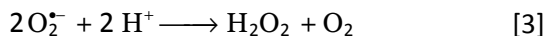
Reacciones de oxidación de diversas especies, o bien, durante el transcurso de algunas reacciones enzimáticas, resultan fuentes alternativas secundarias.

1.3.2. ANIÓN RADICAL SUPERÓXIDO

El anión superóxido (O_2^-) es un radical libre cargado negativamente procedente de la reducción univalente del oxígeno molecular. Se origina en todas las células eucariotas animales, preferentemente en la mitocondria^[17-19] y el retículo endoplasmático.^[25] Durante la respiración celular, aproximadamente entre el 1-2% de los electrones que son transportados en la cadena respiratoria mitocondrial no alcanzan el complejo IV y, en consecuencia, no son partícipes de la reducción completa de oxígeno hasta agua, sino de la formación del radical O_2^{\bullet} .^[19]

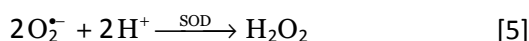


El O_2^- es la base conjugada de un ácido débil, el radical hidroperóxido (HO_2^{\bullet}), el cual es capaz de atravesar membranas y actuar como molécula bio-señalizadora en el crecimiento y desarrollo celular y en respuesta a situaciones de estrés. Ambos radicales mantienen equilibrio; sin embargo, dado que el valor del pK_a de la reacción de disociación es de 4.88, en entornos de pH fisiológicos, el radical predominante es el anión superóxido,^[26] el cual experimenta reacciones de dismutación produciendo peróxido de hidrógeno y oxígeno. Idéntico resultado se obtiene en la posible reacción en el equilibrio entre ambas especies radicales.^[27]



La formación del $O_2^{\cdot-}$ puede proceder de posibles fuentes alternativas como son las múltiples reacciones catalizadas enzimáticamente, destacando aquellas en las que participan las deshidrogenasas flavoproteínicas (xantina oxidasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, etc.),^[28] oxidasas e hidroxilasas (diamino oxidasa, galactosa oxidasa, citocromo P₄₅₀, etc.),^[29] o bien, mediante autooxidación de moléculas como el gliceraldehído, ascorbato, hidroquinonas y compuestos tiólicos (cisteína, catecolaminas, flavinas y hemoproteína) en presencia de algunos metales a nivel de trazas.^[30] De manera conjunta, se estima una producción por célula del organismo del orden de 10^{10} moléculas de $O_2^{\cdot-}$ al día.^[31]

A pesar de su relativa escasa reactividad e inestabilidad es potencialmente tóxico como consecuencia de ser la principal fuente de formación de H_2O_2 , que a su vez, es un precursor idóneo del radical hidroxilo ($\cdot OH$), la ROS de mayor toxicidad.^[32] La eliminación a nivel celular de este radical está catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD):

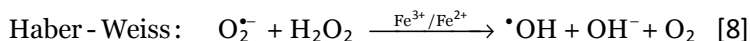
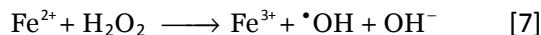
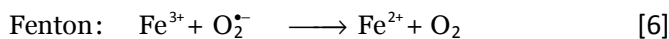


1.3.3. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

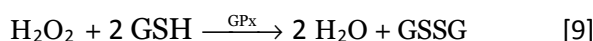
El H_2O_2 no se considera un RL, pues no posee electrones desapareados en su orbital más externo. A pesar de ello, está incorporado dentro del concepto global ROS, al ser un importante precursor de otros radicales libres. Constituye la especie menos reactiva, y realmente su importancia recae en su capacidad para atravesar las membranas biológicas,^[22] posibilitando reacciones de oxidación en diversos puntos de la célula distantes del lugar de producción del mismo, participando activamente en numerosas reacciones de formación de nuevos RL.

Existen diversas fuentes de formación, principalmente, por reducción directa del oxígeno molecular en la que participan dos electrones y dos protones^[12] y, en menor medida, por dismutación del radical $O_2^{\cdot-}$ catalizada por la enzima SOD,^[33,34] como producto de algunas enzimas (glucosa oxidasa, uricasa, etc.),^[35] o bien, a través de reacciones químicas de autooxidación.^[28]

El H_2O_2 no es tóxico cuando se encuentra en concentraciones fisiológicas. Sin embargo, la reacción de Fenton-Haber-Weiss^[36] puede dar lugar al radical $\cdot OH$ en presencia de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre y en combinación con el anión radical superóxido:



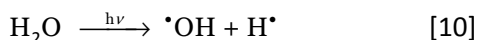
La naturaleza del daño producido por estas reacciones dependerá de la disponibilidad y localización de estos metales de transición. Finalmente, la detoxificación del H_2O_2 , que genera la formación de agua, es producida por la acción de sistemas enzimáticos como glutatión peroxidasa (GPx):^[11]



1.3.4. RADICAL HIDROXILO

El $\bullet\text{OH}$ es el radical libre de mayor reactividad, presentando una vida media de 10^9 segundos.^[37] No posee un gran poder de difusión, aún así, se trata del radical más dañino que existe. Se desconoce actualmente la existencia de una enzima capaz de detoxificarlo de manera directa, probablemente como consecuencia de su destrucción de manos del propio radical.

Una posible fuente de formación *in vivo* es la fisión homolítica del agua [10], no obstante, a pesar de ser poco frecuente, puede originarse como consecuencia de radiaciones de alta energía (rayos X, rayos γ). La luz ultravioleta (UV) no tiene suficiente energía ($h\nu$) como para escindir una molécula de agua. Pese a ello, permite la ruptura fotolítica de una molécula de H_2O_2 en dos moléculas del radical hidroxilo [11].

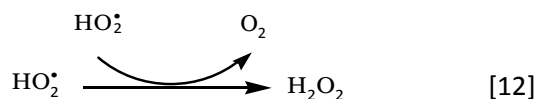


El proceso más importante de formación de este radical está constituido por las mencionadas reacciones de Fenton-Haber-Weiss, en la que una molécula de H_2O_2 reacciona con una molécula de $\text{O}_2^{\bullet-}$, u otro agente reductor, para producir $\bullet\text{OH}$, ^-OH y O_2 . La velocidad de esta reacción es demasiado baja para ser de importancia fisiológica. Sin embargo, metales de transición como el hierro o el cobre pueden actuar como cofactores de la misma, acelerando la velocidad de la velocidad de la reacción.^[10]

La alta reactividad del $\cdot\text{OH}$ queda de manifiesto en su capacidad para reaccionar con las bases púricas y pirimidínicas del ADN, considerándose un agente genotóxico,^[38] al mismo tiempo que puede abstraer un protón de la cadena carbonada procedente de ácidos grasos poliinsaturados, iniciando de esta forma la peroxidación lipídica (LPx),^[39] siendo además capaz de dañar proteínas.^[40]

1.3.5. RADICAL PERHIDROXILO

Es la forma protonada del radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, más liposoluble y con capacidad para reaccionar con un radical análogo originando peróxido de hidrógeno según la reacción:



Existen diversas rutas alternativas para la generación de HO_2^{\cdot} : mediante la generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en medio acuoso y solvente prótico por el sistema xantina oxidasa, o bien, a través de sistemas fotocatalíticos, sometiendo el H_2O_2 a la luz ultravioleta y, comúnmente, aceleradas con el uso de catalizadores.

Es un oxidante extremadamente más fuerte y con una vida media superior al radical superóxido, jugando un papel importante en el proceso de iniciación de la lipoperoxidación en membranas biológicas, así como en la oxidación de una amplia cantidad de compuestos biológicos.^[39]

1.3.6. RADICAL ALCOXILO Y RADICAL PEROXILO

Los radicales alcoxilo ($\text{RO}\cdot$) y peroxilo (RO_2^{\cdot}) son especies reactivas generadas durante la LPx como consecuencia del ataque de otros RL sobre las cadenas carbonatadas de los ácidos grasos, tal y como se comentó anteriormente, resultando parte fundamental en el desarrollo del proceso al contribuir en el inicio y propagación de la reacción. Sus correspondientes reactividades son inferiores a la del radical hidroxilo; sin embargo, su selectividad es superior.^[41]

1.4. GÉNESIS DE RADICALES LIBRES

Los RL son producidos fisiológicamente en cantidades moderadas, participando, en condiciones normales, en importantes funciones biológicas, entre las que destacan la intervención como segundos mensajeros redox,^[42] la estimulación del proceso de proliferación celular,^[9] la actuación como mediadores,^[43] la regulación fisiológica y la activación de determinadas células,^[44] la defensa frente a infecciones,^[45] la inflamación,^[46] y finalmente, la implicación en el metabolismo normal^[47]. Desafortunadamente, los RL pueden alcanzar niveles elevados en el organismo, lo que se traduce en daños celulares de diversa índole, repercutiendo de manera importante en la salud.

El origen del exceso de especies reactivas puede responder a fuentes exógenas o endógenas.^[48]

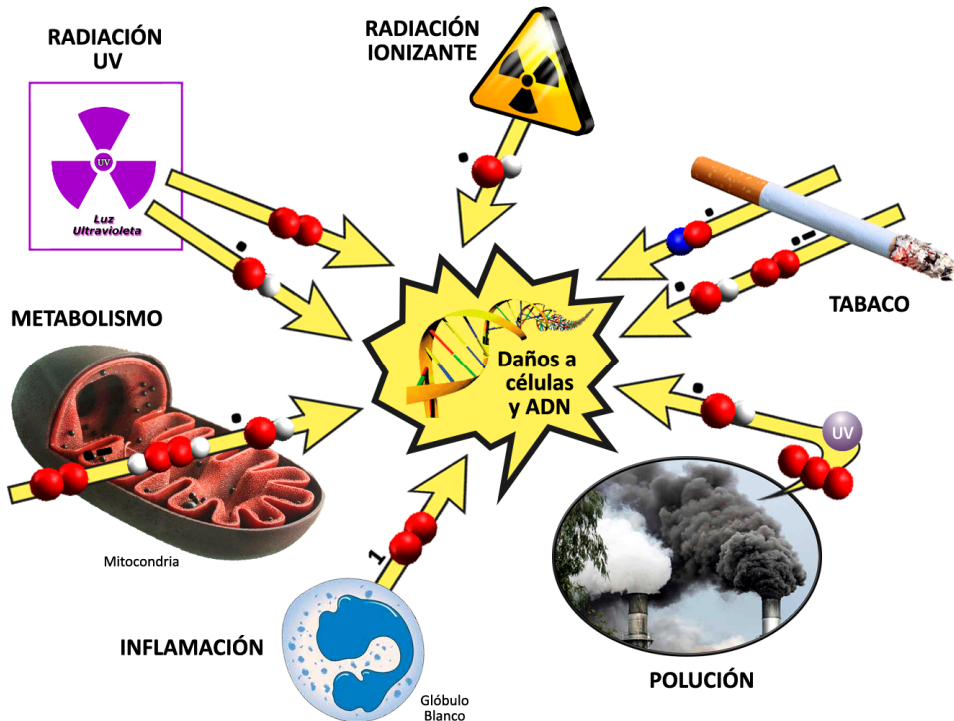


Figura 3. Principales fuentes de formación de radicales libres.

1.4.1. FUENTES EXÓGENAS

El actual sistema de vida, mayoritariamente urbano, genera un ritmo de vida acelerado que suele desembocar en situaciones de estrés y cansancio, malos hábitos alimentarios, etc. Si a estos hechos unimos, entre otros, la invasión constante de multitud de nuevos productos químicos tóxicos y la excesiva contaminación ambiental, se tiene como resultado una realidad óptima y favorable para la formación de los RL. Las principales fuentes exógenas de producción de RL son:

- 1. Factores ambientales.** Destacan la contaminación del aire producida por contaminantes fotoquímicos, el humo del tabaco inhalado directamente o indirectamente, la hiperoxia, los pesticidas, los xenobióticos (cloroformo, paracetamol, etanol, tetracloruro de carbono, etc.), los metales pesados, los disolventes, los anestésicos y los hidrocarburos aromáticos. Estos agentes pueden poseer RL de manera intrínseca como el humo del tabaco, o bien, transformarse en radicales a través del metabolismo celular y los correspondientes procesos de desintoxicación.^[49]
- 2. Compuestos de naturaleza prooxidante ingeridos en la dieta.** Gran parte de los aditivos químicos utilizados en los alimentos en conservas y embutidos (conservantes, colorantes, saborizantes, etc.), las grasas animales y la de los aceites y mantequillas calentadas al fuego o por hidrogenación, bebidas alcohólicas, azúcares refinados, etc.
- 3. Contaminantes químicos.** Ciertos componentes de perfumes y cremas para la piel, champús y jabones, pinturas, detergentes para la ropa, productos de limpieza, etc.
- 4. Agentes antineoplásicos y antibióticos.** Algunos de los efectos de estos fármacos se han atribuido a su capacidad para reducir el O_2 a $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y $\cdot OH$. Entre ellos se encuentran: la adriamicina, bleomicina, daunorubicina y algunos antibióticos que dependen de grupos quinoides o de unión a metales para su actividad.^[50]
- 5. Irradiaciones sobre los organismos.** Radiaciones solares, UV, electromagnéticas (rayos X y rayos γ) o ionizantes (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas α y β).^[51]
- 6. Proceso de metabolización de determinados fármacos.**^[52]

1.4.2. FUENTES ENDÓGENAS

Las principales fuentes de RL presentes en los organismos aeróbicos las constituyen las mitocondrias presentes en sus tejidos sanos.^[53] Estos orgánulos son responsables de más del 90% del consumo del oxígeno celular. La CTE, constituida por una serie de proteínas con propiedades redox, capaces de reducir el oxígeno molecular hasta la formación de agua, acoplada a su vez a la fosforilación oxidativa para producir ATP, constituye la principal fuente endógena de ROS.

De manera aproximada, entre el 1-2% de los electrones transportados por la cadena mitocondrial no alcanza su destino final, el complejo IV,^[54] y por consiguiente, no intervienen en la producción de ATP, sino que son partícipes de reducciones parciales del O₂. Se calcula que entre el 1-5% de las moléculas de O₂ son activadas por incorporación directa de un electrón generando O₂^{-•}. Su producción resulta proporcional a la actividad de funcionamiento de la CTE, aunque es importante aclarar que dicha actividad no es necesariamente proporcional al consumo de O₂ en el hombre.^[55] Por otra parte, los complejos I, II y III de la CTE también pueden agregar electrones a las moléculas de O₂, constituyendo fuentes primarias de O₂^{-•}.^[56] El anión radical superóxido producido es capaz de reducir al citocromo c en el espacio intermembrana, o bien, ser convertido, allí o en la matriz mitocondrial, en H₂O₂ y O₂. En determinadas ocasiones, se incrementa y a la vez se mantiene en el tiempo la actividad de la CTE, constituyendo un estado estable de formación de O₂^{-•} capaz de reducir metales de transición, favoreciendo así la formación de [•]OH o la reacción con NO, dando como producto el radical ONOO[•].^[17] Es importante resaltar que la liberación de ROS hacia el exterior mitocondrial depende de factores como el potencial de membrana. En alusión a ello, diversos estudios coinciden en que esta situación tiene lugar, principalmente, cuando se alcanza el potencial máximo.^[57]

En las últimas décadas, la propuesta de la hiperactividad mitocondrial como principal fuente de ROS ha sido reemplazada progresivamente por una teoría más amplia que engloba la participación de otras fuentes tales como los fenómenos de isquemia-reperfusión, las reacciones enzimáticas e inmunitarias, la autooxidación de catecolaminas, la producción de ácido láctico, etc.^[58] Sin excluir otras características como puedan ser las condiciones ambientales, las

cuales podrían potenciar la actividad de estas fuentes, así como determinar un fallo o insuficiencia de los mecanismos capaces de contrarrestar su formación, conduciendo al daño molecular y al estrés oxidativo. Las diversas fuentes de formación de ROS pueden ser clasificadas, acorde a su capacidad de regulación por parte de los sistemas de homeostasis del organismo, en dos grupos:

- **Fuentes de formación regulada**, donde se incluye, de manera específica, el sistema inmune con su necesidad fisiológica de ROS. Los macrófagos y neutrófilos (fagocitos activados) requieren como condición esencial la formación regulada de un ambiente oxidativo donde poder desarrollar satisfactoriamente su metabolismo y poder desarrollar de esta manera la eliminación de antígenos y células apoptóticas.^[59] Por otra parte, y desde un punto de vista bioquímico, dos moléculas de oxígeno en presencia de NADPH-oxidasa producen dos moléculas radicales O_2^- mediante la reacción denominada “estallido oxidativo”,^[60] cuyo principal propósito es la formación de H_2O_2 a través de la reacción de Fenton en presencia de SOD.
- **Fuentes de formación no regulada**, producidas espontáneamente en función de determinados estímulos que inducen su activación, el ejercicio físico, la dieta, la temperatura ambiental o las radiaciones son ejemplos concretos. En este apartado es posible destacar otros componentes celulares importantes en el aumento productivo a nivel global de ROS, tal es el caso del retículo endoplasmático durante el proceso de plegamiento proteínico y la formación de enlaces disulfuro. Los sistemas enzimáticos citoplasmáticos y la superficie de la membrana plasmática,^[32,61] los peroxisomas y la actividad de múltiples sistemas enzimáticos, como el sistema del citocromo P_{450} mono-oxigenasa, la xantina oxido-reductasa, sintasa de óxido nítrico, aldehído oxidasa, flavinproteín deshidrogenasa y triptófano dioxigenasa y otras enzimas implicadas en el proceso inflamatorio (ciclo-oxigenasa y lipo-oxigenasa),^[10] constituyen el resto de fuentes de interés.

2. ESTRÉS OXIDATIVO EN LA SALUD HUMANA

Gran parte de las ROS descritas con anterioridad desempeñan papeles fisiológicos de vital importancia. Desafortunadamente, también se encuentran implicadas de manera activa en reacciones de oxidación indeseadas, frente a las cuales el organismo ha desarrollado ciertas defensas antioxidantes.^[62] La producción endógena de una determinada tasa de ROS, sin sobrepasar unos límites concretos, es un proceso celular normal e inevitable, y que resulta imprescindible para la vida de la célula debido a su participación activa en la regulación y producción de energía metabólica, la activación o inactivación de biomoléculas, etc.^[42-47]

La producción controlada, en condiciones normales, está exenta del más mínimo daño oxidativo gracias a la provisión, por parte de la célula, de una gran cantidad de mecanismos antioxidantes con los que combatirlos. En el preciso momento en el que tiene lugar un aumento considerable de la velocidad de formación de ROS, se desencadena un aumento en número, respecto al establecido bajo condiciones normales, generalmente acompañado de una disminución de los propios mecanismos de defensa del organismo. Este hecho deriva en una situación de desequilibrio entre las especies prooxidantes, más numerosas, y las antioxidantes, lo que da como resultado daños oxidativos importantes sobre determinadas moléculas presentes en el organismo, repercutiendo, a su vez, en sus respectivas funciones biológicas. El balance existente entre los agentes prooxidantes y antioxidantes determinará el estado redox, manteniendo una “homeostasis redox” o estado de equilibrio de las condiciones de oxidación-reducción finales.

El estrés oxidativo^[63-66] (Figura 4) se define como la exposición de la materia viva a diversas fuentes de formación de radicales que originan una alteración del equilibrio que debe existir entre las especies o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas sustancias reactivas. Esta indeseada situación de desequilibrio puede originarse por un incremento exacerbado de las sustancias prooxidantes, principalmente ROS, una deficiencia de agentes antioxidantes, o bien, por una combinación de ambos factores. Bajo las circunstancias citadas, las células se encuentran expuestas a un ambiente prooxidante que genera efectos adversos sobre el estado redox celular, originando daños de naturaleza reversible o irreversible a todo tipo de biomoléculas, incluyendo proteínas, lípidos, glúcidos,

ácidos nucleicos (ADN)^[67,68] y componentes de la matriz extracelular. De esta forma se desatan reacciones químicas capaces de producir alteraciones en la relación estructura/función de órganos, sistemas o grupos celulares especializados y que, consecuentemente, están asociadas de manera implícita a la evolución de un número creciente de síndromes de interés médico y social.

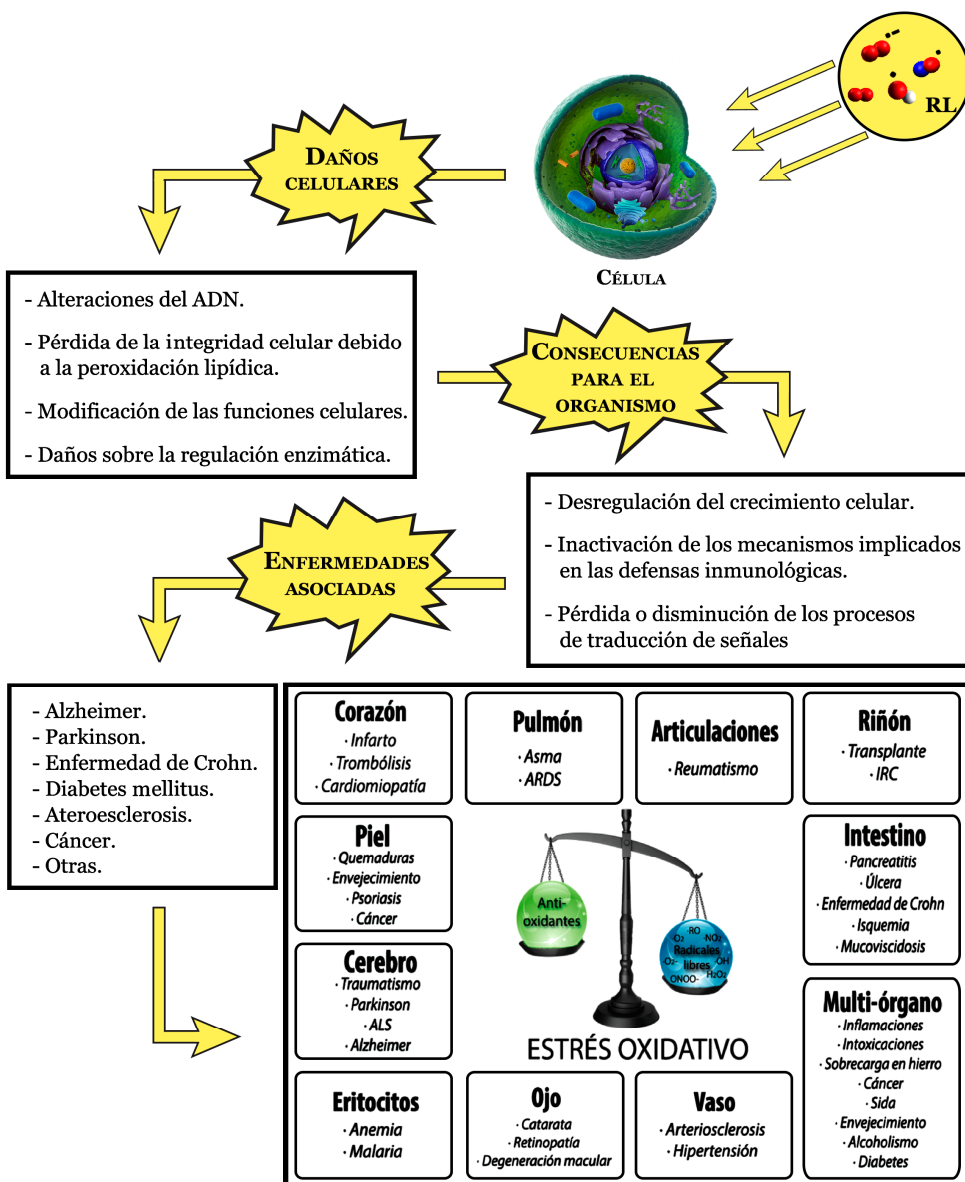


Figura 4. Daños y enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

En la actualidad se han descrito casi un centenar de enfermedades en las que se han hallado certezas experimentales sobre la incidencia del desbalance del estado oxidativo en su origen y desarrollo. Destacan los procesos patológicos de ECD,^[69] tales como Alzheimer,^[70] Parkinson,^[71] enfermedad de Crohn,^[72] ciertos tipos de cánceres,^[9-11] diabetes mellitus,^[73] patologías cardiovasculares,^[74] aterosclerosis,^[75] procesos reumáticos,^[76] patologías gastroentéricas^[77] y afecciones broncopulmonares.^[78] Asimismo, se incluyen procesos fisiológicos como el envejecimiento,^[79] el daño causado por el ejercicio físico agotador,^[21] etc.

2.1. DAÑO BIOMOLECULAR MEDIADO POR EL ESTRÉS OXIDATIVO

La naturaleza del daño ocasionado por el estrés oxidativo puede ser muy dispar, aunque en principio viene determinada por la reactividad química del RL participante, así como por la disponibilidad de un sustrato susceptible de ser atacado en las proximidades del lugar de formación de dicho radical. A pesar de la disparidad de los posibles daños, los mecanismos por los que éstos se producen son comunes. Consisten en la sustracción de un átomo de hidrógeno, o de manera alternativa de un electrón, de una determinada molécula adyacente (molécula diana), estabilizándose el electrón desapareado del radical mediante la formación de un par electrónico (Figura 5). Indistintamente, de una u otra manera, se genera la aparición de un nuevo radical que, generalmente, posee la reactividad de su predecesor; sin embargo, en ocasiones puede no presentar reactividad alguna.

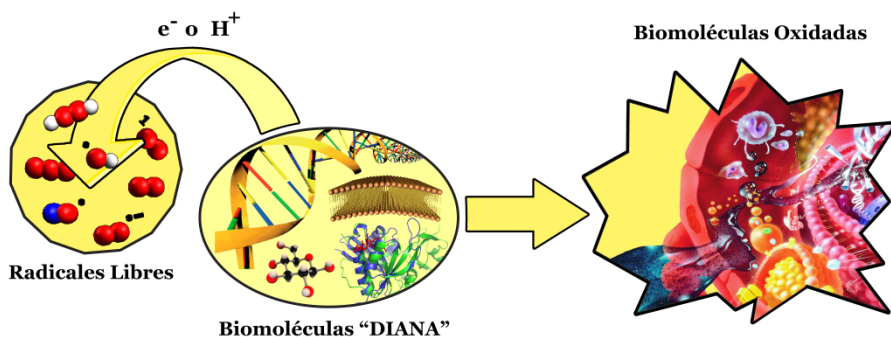


Figura 5. Mecanismo de ataque de RL a biomoléculas.

La acumulación de compuestos alterados por el resultado de la acción de los RL es a menudo la explicación de efectos a largo plazo, por lo que son difícilmente

demostrables como una relación inmediata causa-efecto. El daño oxidativo provoca una gran variedad de alteraciones metabólicas como inactivación y desnaturalización proteica, peroxidación lipídica, lisis celular, etc.; daños sobre los ácidos nucleicos con la consecuente ruptura de cadenas y modificaciones en las bases nitrogenadas responsables de procesos de mutagénesis, carcinogénesis y modificación de las vías de señalización implicadas en el metabolismo y regulación del ciclo celular.

2.1.1. DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS

Existen evidencias que relacionan de manera directa los RL, las proteínas y los mecanismos de proteólisis.^[80] Determinadas proteínas se caracterizan, además de por ser dianas de la acción de RL, por su capacidad para generar o propagar estas especies reactivas. El daño oxidativo sobre las proteínas alcanza niveles más allá de la propia modificación de la molécula como sustrato implicado en los mecanismos proteolíticos, repercutiendo además activamente en los mismos.

El conjunto de aminoácidos presentes en las proteínas, presenta residuos susceptibles al ataque radical, especialmente por parte de $\cdot\text{OH}$, $\text{RO}\cdot$ y especies reactivas de azufre (RSS). Estos ataques son de naturaleza difusa, pudiendo dar lugar a modificaciones generalizadas, o por el contrario, modificar zonas específicas mediante ataques selectivos. Las modificaciones de tipo general pueden producir alteraciones en la estructura proteica y, en consecuencia, la pérdida o modificación de la función biológica, procesos de inactivación, fragmentación, desnaturalización y/o degradación proteica, alteraciones de funciones celulares como la producción de energía, interferencias con la creación de potenciales de membrana y cambios en el tipo y nivel de proteínas celulares.^[81,82] La presencia de grupos carbonilo en la estructura proteica es indicativa de una modificación oxidativa global de las mismas, y consecuencia directa de ello, resultan las posibles pérdidas de funciones estructurales o catalíticas.^[83] Los ataques selectivos son responsables de causar un daño oxidativo en el que los metales de transición adquieren una importancia catalítica relevante, por lo que las enzimas que los contienen son las que presentan un mayor riesgo de ataque.^[84] La principal modificación que permite la degradación proteolítica es la oxidación de grupos $-\text{SH}$ de los aminoácidos^[85] que da como resultando estas proteínas de mayor grado de oxidación con respecto a

proteínas parcialmente desnaturizadas o poco oxidadas y que, además, son más resistentes frente a la eliminación mediante proteólisis celular, lo que favorece la acumulación de las mismas.^[80] Esta acumulación de proteínas dañadas, se ve incrementada con el paso de los años como consecuencia del aumento de la velocidad de oxidación y/o la disminución de la capacidad degradativa de las mismas,^[86] asociada intrínsecamente al proceso de envejecimiento.

2.1.2. DAÑO OXIDATIVO A LÍPIDOS

El “enranciamiento” oxidativo o proceso de peroxidación lipídica es el daño oxidativo más importante en los lípidos. Consiste en un daño hístico que puede ser iniciado por los radicales O_2 , 1O_2 , H_2O_2 y $^{\bullet}OH$, afectando a estructuras con alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, del inglés *Polyunsaturated fatty acids*), presentes en cantidades importantes en las membranas celulares, y con mayor susceptibilidad a medida que aumenta el número de dobles enlaces.^[87] La LPx es un proceso continuo y fisiológico que en condiciones normales actúa como un renovador de membranas biológicas; sin embargo, cuando su activación es excesiva se relaciona con la patogénesis de numerosas enfermedades de interés: Alzheimer, diabetes mellitus, etc.^[88,89] La LPx consta de tres etapas fundamentales: iniciación, propagación y terminación (Figura 6).^[87]

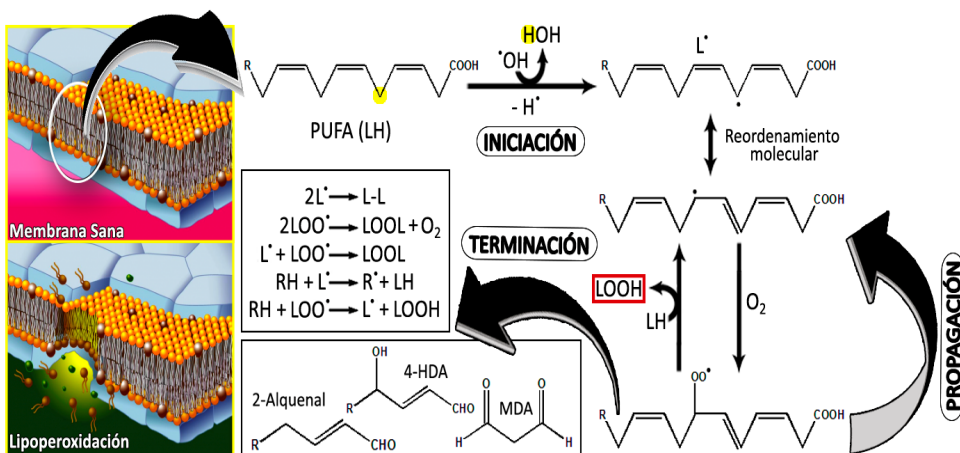


Figura 6. Etapas del proceso de peroxidación lipídica.

2.1.3. DAÑO OXIDATIVO A GLÚCIDOS

Es conocida la actuación de diversos polisacáridos como agentes protectores. Los monosacáridos, por su parte, en condiciones fisiológicas se autooxidan formando cetoaldehídos e intermediarios como el radical O_2^- , el cual es captado por moléculas de glucosa impidiendo su posterior acción radical. Ciertos monosacáridos, como la manosa o el manitol, presentan también la capacidad de capturar radicales tales como $\cdot OH$ y el propio O_2^- ,^[90] aunque resulta evidente que no es suficiente, y los RL provocan una importante disminución del contenido de ATP intracelular, alterando así la vía glucolítica y mitocondrial. En esta primera vía, los radicales producen la inactivación de la vía de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), la disminución de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), una discreta acidosis intracelular y el aumento de iones Ca^{2+} libres.

2.1.4. DAÑO OXIDATIVO AL ADN

El ADN, a pesar de ser considerado una molécula bien protegida, es propenso al daño oxidativo de todos sus componentes,^[91] especialmente por parte de los radicales $\cdot OH$ y H_2O_2 .^[68,92] Las posibles alteraciones, generadas en la interacción con RL, son partícipes en diversas patologías, e incluso, en el proceso de envejecimiento, con riesgos de producir un mayor número de mutaciones, roturas espontáneas en las cromátidas y pérdida de fragmentos cromosómicos que pueden ocasionar la pérdida total de cromosomas en situaciones extremas.^[93]

El proceso oxidativo del ADN recae habitualmente sobre sus bases nitrogenadas. La mayoría de las modificaciones que tienen lugar presentan una seria repercusión al bloquear el proceso de replicación. La alteración más frecuente de las bases púricas consiste en la abstracción de un protón de la posición C-8 de la guanina por parte del radical $\cdot OH$, originando su forma nucleósida 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG), la cual posee un elevado efecto mutagénico. Respecto a las bases pirimidínicas, destacan los glicoles de timina y citosina, así como los hidratos de pirimidina, los cuales dan lugar a la fragmentación del ADN. Los daños ocasionados también pueden presentarse como posibles alteraciones en los sistemas de reparación de la propia molécula. La cuantificación de la formación de 8-OHdG es utilizada como indicativo de la

extensión del daño oxidativo sobre el ADN.^[94] Las enzimas reparadoras de los fragmentos dañados^[95] no son capaces de eliminar las lesiones oxidativas en su totalidad, por tanto, éstas se acumulan produciendo un aumento paulatino y permanente de mutaciones con la edad, reflejado en procesos patológicos como la carcinogénesis y el envejecimiento. Por su parte, el ADN mitocondrial presenta aún mayor tasa mutagénica a causa de las modificaciones oxidativas de sus bases; esto repercute negativamente en el funcionamiento de los complejos de la CTE, ya que se incrementa la producción de ROS y entra, de esta manera, en un continuo círculo dañino.^[96] La cantidad de 8-OHdG mitocondrial es 16 veces superior a la encontrada en el ADN nuclear, lo que podría suponer una disfunción mitocondrial asociada al desarrollo del fenotipo característico de la senescencia celular.^[97]

2.2. ENVEJECIMIENTO BIOLÓGICO

Desde la más remota antigüedad el ser humano se ha preocupado por su supervivencia y por encontrar la manera de prolongar su vida al máximo. Sin embargo, se trata de un hecho irrefutable que el proceso de envejecimiento es inherente a la vida, y que todo ser vivo nace, crece, envejece y muere.

El envejecimiento es el fenómeno biológico más importante ligado al estrés oxidativo; de ahí se deriva el gran interés investigador que ha conducido a múltiples especulaciones e hipótesis acerca de las causas y factores que establecen una duración limitada de la existencia de los seres vivos. El progreso de las ciencias de la vida en el siglo XIX propició la aparición de teorías gerontológicas en las cuales se detallaban explicaciones parciales de los mecanismos del envejecimiento, acordes a los avances de la biología y de la medicina de la época. En este aspecto, la investigación ha presenciado una continua evolución:^[98] desde simples análisis estadísticos sobre la longevidad de las poblaciones, pasando por determinados estudios sobre la pérdida de rendimiento de los sistemas fisiológicos, hasta culminar en el presente auge de la gerontología celular y molecular.^[99]

El hecho de que el fenómeno de envejecimiento tenga lugar en todos los niveles de organización biológica, propició numerosas interpretaciones con el fin de dar una explicación a las alteraciones que se producen en los distintos niveles estudiados, lo que se traduce, según Medvedev,^[100] en cerca de 300 teorías del envejecimiento. Dicho investigador afirmaba que casi cada descubrimiento

importante en biología celular y molecular daba paso a una nueva familia de teorías del envejecimiento o nuevas versiones avanzadas de otras teorías más antiguas. Sin embargo, en la actualidad, gran parte del conjunto de estas teorías sólo presenta un valor meramente histórico, mientras que otras teorías, que gozaban de cierta popularidad, tales como la teoría del “error catastrófico” en la síntesis de proteínas (1963)^[101] o la teoría del “reloj mitótico” (1965),^[102] pierden apoyo en favor de las teorías referentes al papel protagonista de los RL en el proceso de envejecimiento (1956)^[103] y la “toxicidad residual” del oxígeno (1962).^[104] A pesar de ello, ninguna de estas teorías es capaz por sí misma de dar explicación a los múltiples efectos del envejecimiento, puesto que son incapaces de ofrecer una explicación detallada y razonable del porqué de la existencia de organismos con un envejecimiento prematuro, en contraste con la aparente inmortalidad de formas de vidas más simples como las bacterias y las amebas.

2.2.1. CONCEPTO DE ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un fenómeno extraordinariamente complejo en el que se ve implicada gran variedad de procesos, razón por la cual se han propuesto numerosas definiciones, entre las que se engloba la siguiente:

“El conjunto de procesos post-madurativos que inducen una serie de cambios en las células y tejidos que progresivamente disminuyen la capacidad de mantenimiento de la homeostasis y aumentan la vulnerabilidad del organismo, incrementando el riesgo de enfermedad y muerte”^[105,106]

Desde el punto de vista personal, la definición más completa sería:

Proceso universal, intrínseco, paulatino y progresivo, heterogéneo e individual, deletéreo e irreversible que lleva asociado una acumulación progresiva de cambios con el tiempo que hacen a los organismos vivos ser más susceptibles al daño, disminuyendo sus posibilidades de supervivencia y fertilidad, generando así una pérdida progresiva de su capacidad de adaptación (Figura 7).

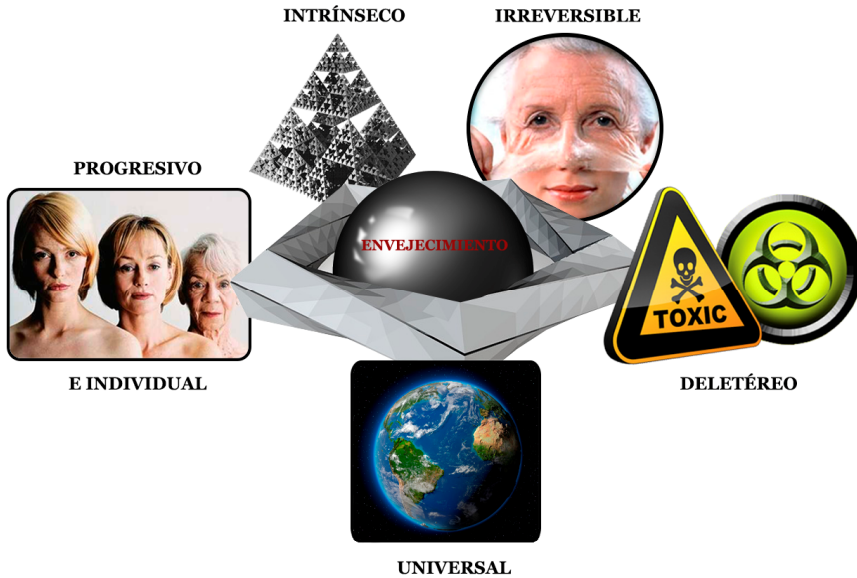


Figura 7. Características del proceso de envejecimiento.

2.2.2. TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO

La complejidad inherente al proceso del envejecimiento dificulta no sólo establecer una definición única, sino que ha permitido postular numerosas teorías durante el último siglo con el fin de esclarecer los mecanismos que subyacen a esta inevitable realidad. Las principales teorías del envejecimiento proporcionan información útil y relevante que facilitan la comprensión de los cambios fisiológicos asociados al paso del tiempo; sin embargo, responden específicamente a casusas concretas. Se antoja necesaria una visión globalizada y complementaria de las mismas para tratar de resolver un fenómeno que, actualmente, presenta algunos aspectos sombríos. Esclarecer y comprender detalladamente los mecanismos precisos involucrados en el desarrollo del envejecimiento es uno de los mayores retos por resolver de la biología moderna.

Goldstein y sus colaboradores, tras una revisión exhaustiva del amplio número de teorías existentes,^[107] propusieron englobarlas en dos amplias categorías bien diferenciadas: las que afirman que el proceso de envejecimiento sería el resultado de la suma, acumulada en el tiempo, de alteraciones que ocurren de manera aleatoria, denominadas **teorías estocásticas** o del “uso y desgaste”, y aquellas

que suponen que el envejecimiento estaría genéticamente programado, es decir, abogan por un envejecimiento, en cierta manera, predeterminado, denominadas **teorías no estocásticas o deterministas**.

Las teorías de envejecimiento de “uso y desgaste” proponen la acumulación de errores o daños durante el desarrollo de la vida como principal culpable del proceso de envejecimiento, asociándolo con la inexistencia de eficacias del 100% en los sistemas de reparación y mantenimiento propios del organismo. En consecuencia, estos daños van aumentando y acumulándose progresivamente, disminuyendo las capacidades fisiológicas hasta llegar a ser incompatible con la vida. No obstante, hay datos que parecen contradecir esta perspectiva teórica, como es el hecho del ejercicio físico moderado y realizado de manera continuada, que pese a exigir un mayor uso y desgaste del cuerpo, no está asociado a un proceso de envejecimiento mayor o más veloz, sino que si se alude a los resultados existentes, tiende a mejorar la calidad de vida y el bienestar en personas de edad avanzada.^[108] En cambio, las teorías referentes al envejecimiento genéticamente programado plantean que el proceso, al igual que el desarrollo, del envejecimiento se constituye de sucesos codificados en el genoma que tienen lugar a una velocidad específica en cada especie y que supone el deterioro de las capacidades fisiológicas hasta el inevitable desenlace final de la vida.

Medvedev concluyó en el año 1990 que no era realista la expectativa de que surgiera una teoría “verdaderamente unificada” o “causa única” del envejecimiento.^[100] Actualmente, se sigue aceptando que, en general, no se dispone de todas las respuestas que se precisan para la comprensión completa del proceso. No obstante, resulta posible ofrecer soluciones preliminares integrando varias teorías complementarias (Figura 8) que posibiliten la aparición de nuevos experimentos que favorezcan, a través de explicaciones lógicas, incrementar el conocimiento y la comprensión del envejecimiento en referencia a los cambios que tienen lugar a todos los niveles de organización biológica.

En este contexto, la investigación actual gerontológica engloba, desde el análisis de curvas de supervivencia en poblaciones y la pérdida de rendimiento de los sistemas fisiológicos, hasta el cada vez más interesante estudio sobre los mecanismos de control genético implicados en el envejecimiento en relación con la longevidad.

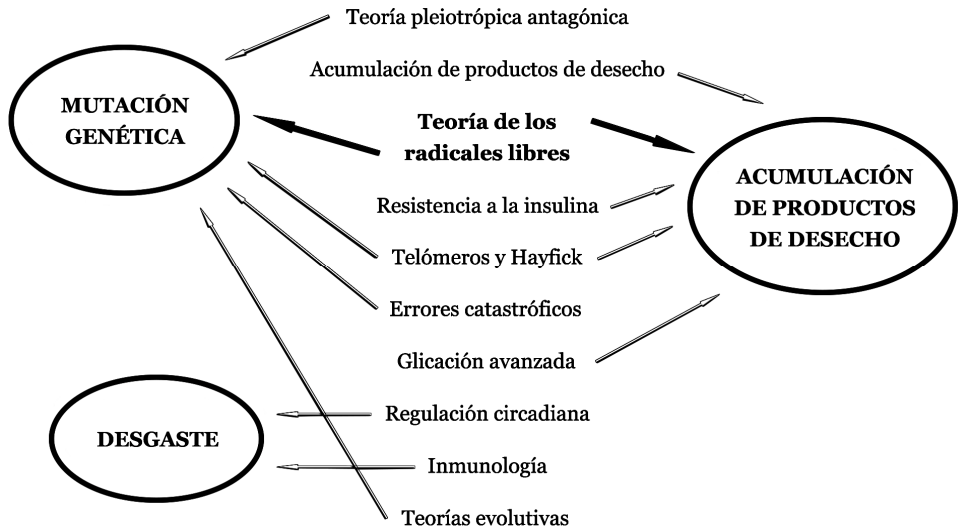


Figura 8. Teorías del proceso de envejecimiento.

2.2.2.1. TEORÍA DEL “ENVENENAMIENTO” POR ROS

Esta teoría fue propuesta por Rebeca Gerschman en 1954 a la luz de los hallazgos de sus estudios sobre el aumento de los efectos lesivos de la radiación ionizante en presencia de O_2 gaseoso y el efecto protector asociado a la ausencia del mismo.^[108] Durante el transcurso de su investigación observó la existencia de efecto sinérgico entre la radiación y el O_2 como consecuencia del aumento de la concentración intracelular de ROS causado por dicho gas, a su vez, unido a los radicales derivados de la propia irradiación. Estos hechos le condujeron a deducir la implicación directa del oxígeno en el desencadenamiento del envejecimiento a través de la formación de ROS durante el metabolismo celular, facilitado por la incapacidad de las defensas antioxidantes del organismo para contrarrestar en su totalidad el ataque oxidativo asociado.

2.2.2.2. TEORÍA DE LOS RADICALES LIBRES

La teoría de los RL, formulada por Denham Harman en 1956,^[103] es considerada, actualmente, la más aceptada por parte de la comunidad científica. Cimentada en

el descubrimiento de Rebeca Gerschman, sugiere que estos derivados de oxígeno no sólo son los responsables del proceso de envejecimiento, sino también del daño oxidativo producido con la edad a nivel celular y tisular, dado que los sistemas de defensa antioxidante son incapaces de hacerles frente al ser generados de manera continuada a lo largo de la vida celular, provocando, de manera irremediable, daños oxidativos en la célula y, por extensión, sobre los tejidos y órganos. Originariamente, esta teoría pertenecía al grupo de las teorías estocásticas, ya que las ROS serían las responsables de la generación del daño que se acumula durante el envejecimiento; sin embargo, hoy día se sitúa inmersa entre ambos grupos de teorías como consecuencia de la existencia de resultados que parecen indicar que el ritmo de acumulación del daño ocasionado estaría determinado vía genética.

La teoría de los RL cuenta con el respaldo de multitud de pruebas experimentales, donde el descubrimiento de la enzima SOD constituyó, en el año 1969, el primer apoyo importante. Tan sólo tres años después, Harman completó su propia teoría afirmando que la formación de ROS responsables del envejecimiento ocurría *in vivo*, como subproducto del funcionamiento de la CTE mitocondrial, debido a una pequeña proporción de electrones que entraban en la cadena de transporte electrónico provocando la reducción incompleta del oxígeno molecular, tal y como se comentó en el apartado 1.3 (Figura 1). Por otro lado, la formación de RL por parte de las células aeróbicas también parece confirmar teorías más antiguas relacionadas con la tasa metabólica y la longevidad máxima, tales como la teoría de la velocidad de vida (1928),^[109] propuesta a raíz de la descripción inicial de Rubner,^[110] y según la cual, se establece una correlación inversa entre la tasa metabólica y la longevidad máxima. Por tanto, una tasa metabólica mayor es indicativo de un ritmo de vida elevado, es decir, un consumo más rápido del potencial energético vital (LEP, del inglés *Lifetime Energy Potential*),^[111] parámetro que permanece constante durante el periodo vital de la mayoría de los mamíferos y que hace referencia a la cantidad total de energía por gramo de tejido. Se deduce de esta manera que una disminución rápida del LEP conlleva un mayor y acelerado proceso de envejecimiento.

En la actualidad, numerosos artículos respaldan esta teoría aportando datos que demuestran la relación existente entre la tasa de producción de RL y la longevidad máxima. Resulta evidente que cada especie debe presentar una tasa

determinada y constante durante su tiempo de vida independiente a la tasa de consumo de O₂ mitocondrial requerida,^[112] e inversamente relacionada con la longevidad; por consiguiente, las tasas mayores de formación de RL tienen lugar en especies de vida corta y viceversa.^[113,114] Estos estudios dejan de manifiesto que el principal determinante del envejecimiento es la producción mitocondrial excesiva de RL y no la tasa metabólica. De este modo, los animales que presentan tasas de producción de RL menores serán más longevos con independencia de la tasa metabólica.

Descubrimientos recientes de numerosos estudios realizados en diversos organismos ayudan a sustentar esta teoría, sugiriendo que la reducción del estrés oxidativo (reducción de la carga prooxidante) o el aumento de la resistencia al mismo (aumento de las defensas antioxidantes) están relacionados con la prolongación de la vida.^[115] Sin embargo, dicha teoría también cuenta con sus detractores, siendo varios los estudios que han generado cierta ambigüedad y controversia sobre la misma.^[64,112-113] Por citar ejemplos concretos, determinados experimentos con ratones no mostraron cambios en la vida útil tras incrementar o reducir la cantidad de enzima antioxidante,^[64,118] al igual que no pudo demostrarse que administrar sustancias antioxidantes en ensayos clínicos humanos tuviera repercusión en la prolongación de la vida.^[119,120]

3. ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes (AO) desarrollan una función vital en el organismo actuando como sistema de defensa en la prevención del daño oxidativo mediado por los RL, en especial las ROS. Su actividad está estrechamente ligada a la presencia de estas especies reactivas derivadas del oxígeno molecular. Haciendo alusión a este hecho, el prestigioso profesor Barry Halliwell citó:

“El oxígeno es venenoso y los organismos aeróbicos sobreviven en su presencia sólo porque disponen de defensas antioxidantes”.^[66]

En las últimas décadas, el número de publicaciones científicas relacionadas con antioxidantes, especialmente de origen natural, ha experimentado un crecimiento exponencial, tal y como ilustra el gráfico estadístico de la Figura 9.

Este gran interés surgido responde fundamentalmente a tres razones:

1. La eficacia antioxidante de una amplia variedad de agentes fitoquímicos.
2. La idea generalizada acerca de los beneficios del consumo de antioxidantes naturales sobre multitud de patologías de enfermedades crónico-degenerativas y sobre el proceso de envejecimiento.
3. La cierta inseguridad que ofrece al consumidor la ingesta de antioxidantes sintéticos.

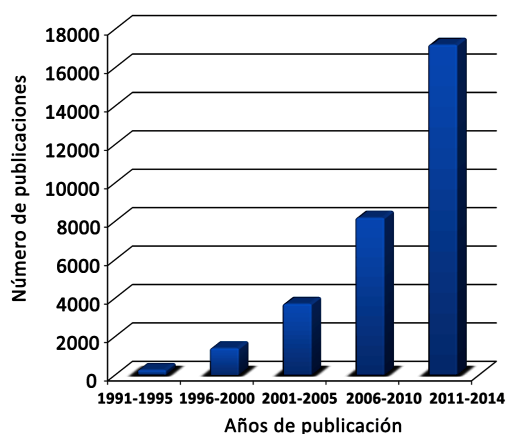


Figura 9. Distribución cronológica de las publicaciones relacionadas con métodos de determinación de actividad antioxidante (SCOPUS, enero 2015).

La inseguridad asociada a los antioxidantes sintéticos contrasta con la creencia popular de seguridad incuestionable de los antioxidantes naturales que son comercialmente más aceptados y demandados.^[121] El consumo de antioxidantes naturales a través de la dieta supone un refuerzo adicional considerable de las defensas naturales propias del organismo y, resultado de tal reconocimiento, es la consideración de los AO como moléculas cuyo consumo es sinónimo de salud.

3.1. CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN

Dada la susceptibilidad de las células aeróbicas a los RL y a la toxicidad del O_2 , relacionada directamente con las ROS, resulta obvio que la primera y mejor defensa es evitar, en la medida de lo posible, la generación de estas especies reactivas. Sin embargo, tal propósito resulta extremadamente complejo,

pues de manera inherente al metabolismo aeróbico se produce una constante formación de estas especies reactivas. Con el objetivo establecido de prevenir y proteger los componentes celulares del daño oxidativo, los organismos aeróbicos han desarrollado un elaborado y complejo mecanismo de defensa denominando sistema de defensa antioxidante.^[62]

El Diccionario de la Real Academia Española de la Lengua define antioxidante como: “*adj.* Que evita la oxidación”. En el campo de la química, y desde un punto de vista más general, Gutteridge y Halliwell definieron antioxidante como “cualquier sustancia que, cuando está presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de este sustrato”.^[122] La definición enfatiza la importancia de la diana o sustrato oxidable estudiado y la fuente de especies reactivas empleada cuando se examina la actividad antioxidante, pero por otra parte no tiene en cuenta determinados sistemas como las chaperonas, los sistemas de reparación del ADN o de residuos proteicos, o bien, los inhibidores de la formación de RL, por lo que se optó por redefinir el concepto mediante una simplificación de la anterior definición:

“cualquier sustancia (o acción) que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula diana”.^[66]

El concepto de molécula diana resulta muy generalizado, incluyéndose en tal connotación a la mayoría de las moléculas orgánicas e inorgánicas presentes en las células vivas (proteínas, lípidos, carbohidratos y moléculas de ADN).

Resulta relativamente frecuente el uso, a menudo de manera errónea, del término captador o estabilizador (*scavenger*, en inglés) de radicales como sinónimo de antioxidante para describir sustancias con capacidad para descomponer o inactivar RL y especies oxidantes. Desde un enfoque riguroso, la actividad de captación de RL, comúnmente conocida como actividad antirradicalaria, está determinada por la reactividad del AO en presencia de radicales, determinada a su vez por la velocidad de su interacción. En cambio, la actividad antioxidante hace referencia a la capacidad del AO para retardar la degradación oxidativa mediada por dichos radicales. Por consiguiente, una alta actividad antirradicalaria no necesariamente está correlacionada con un valor elevado de actividad antioxidante, siendo ejemplos característicos de tal hecho algunos compuestos fenólicos sintéticos, los cuales presentan elevada

reactividad hacia RL y moderada actividad antioxidante, debido a la alta reactividad de los derivados fenoxil o semiquinona formados en etapas posteriores a la estabilización de los RL.^[123]

El término antioxidante resulta de una amplia descripción que engloba numerosas sustancias, de las cuales los captadores de radicales representan sólo una categoría, asociada únicamente al caso particular en el que se origina la formación de un nuevo RL más estable y menos dañino tras su interacción con la especie radical.^[124] Esta reacción es debida a una transición redox en la que está implicada la donación de un electrón, o bien, de un átomo de hidrógeno a la especie radicalaria (Figura 10), dando como resultado la formación de un radical derivado del antioxidante (captador de radical) que, en la mayoría de las ocasiones, presenta carácter inerte, estable o de cierta reactividad.^[125] En referencia a la actividad antioxidante, ésta se encuentra determinada por tres factores fundamentales: la capacidad del AO para acceder a la zona de reacción, su reactividad química, desarrollada por dos posibles mecanismos de acción (mecanismo SET y mecanismo HAT)^[10] y, finalmente, por la estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres.

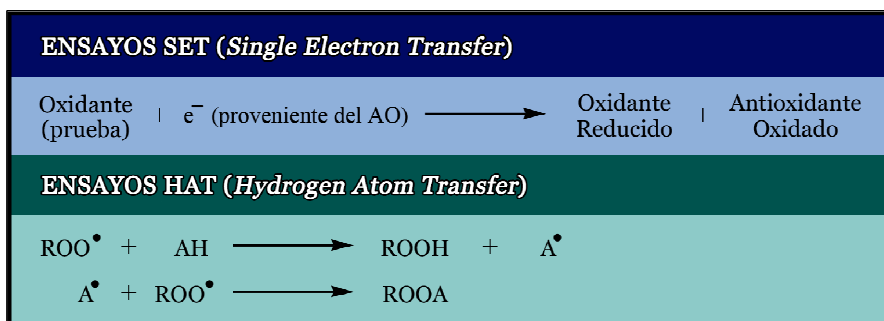


Figura 10. Mecanismos de reacción antioxidante SET y HAT.^[126]

La amplia gama conocida de antioxidantes de toda índole posibilita multitud de clasificaciones. Si bien pueden clasificarse, comúnmente, desde la perspectiva de su origen y/o la presencia en el organismo (endógenos o bio-sintetizados en el organismo y exógenos o ingeridos a través de la dieta), en este apartado, siguiendo el hilo conductor del mismo, se clasificarán de acuerdo al mecanismo de acción que involucran:

- 1. Antioxidantes primarios (pro-oxidantes):** previenen la formación de nuevos RL, especialmente ROS, antes de que puedan reaccionar mediante su conversión a moléculas menos dañinas.^[127] Se engloban en este grupo los antioxidantes endógenos enzimáticos.
- 2. Antioxidantes secundarios:** presentan actividad de captura radical, por tanto, interrumpen la propagación en cadena de RL, inhiben la generación de ROS y previenen la activación metabólica de carcinógenos.^[128] Algunos ejemplos importantes son la vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ascorbato), β -caroteno, ácido úrico, bilirrubina y albúmina, los cuales pertenecen al grupo de antioxidantes endógenos no enzimáticos.
- 3. Antioxidantes terciarios:** reparan el daño ocasionado por los RL, o bien, eliminan moléculas dañadas.^[129] Las enzimas reparadoras del ADN y la metionina sulfóxido reductasa son ejemplos característicos de este tipo de moléculas.

3.2. ANTIOXIDANTES FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos constituyen un importante grupo químicamente heterogéneo de sustancias ampliamente repartidas por el reino vegetal y constituido por más de 8.000 estructuras identificadas.^[130] Los compuestos polifenólicos presentan la peculiaridad de precipitar macromoléculas tales como proteínas, carbohidratos y enzimas digestivas, hecho que reduce la digestión de ciertos alimentos y que propició, antiguamente, la connotación de antinutrientes. Sin embargo, en la década de los 90, la percepción sobre estos compuestos cambió drásticamente, incrementándose notablemente su interés como consecuencia de sus efectos beneficiosos sobre la salud descritos en determinadas enfermedades cardiovasculares^[131,132] o neurodegenerativas,^[133,134] así como en la prevención y tratamiento de distintos tipos de cánceres^[132,135] y, en general, en todas aquellas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Los numerosos beneficios aportados por la extensa variedad de compuestos fenólicos respondían a sus propiedades antiinflamatorias,^[136] anticancerígenas^[137] y, fundamentalmente, por sus propiedades antioxidantes.^[134] La influencia de las propiedades antioxidantes en la mejora de la salud, así como la gran abundancia de estos compuestos en nuestra dieta cotidiana, ha despertado un gran interés actual desde el punto vista

científico-empresarial, pero también en el campo de los ingredientes funcionales ya que poseen otras propiedades tales como las organolépticas y farmacológicas.

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios sintetizados por las plantas, tanto en su desarrollo normal –desempeñan funciones fisiológicas referentes al crecimiento y la reproducción-, como en respuesta a condiciones de estrés -intervienen en procesos defensivos frente a patógenos, parásitos, polución, radiación UV, temperaturas extremas, etc.-^[138] y, además, son los principales responsables de las propiedades de color, astringencia, sabor y aroma (flavor) de los vegetales. A pesar de la gran diversidad de compuestos fenólicos, la mayor parte presenta un origen metabólico común: la ruta del ácido shikímico y el metabolismo de los fenilpropanoides.^[139] Esta ruta biosintética conduce a la producción de ácidos benzoicos y cinámicos, así como a ciertos aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina). Se trata de moléculas muy solubles que presentan un anillo bencénico hidroxilado como elemento común en sus estructuras moleculares, las cuales pueden incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.^[140,141] No obstante, ciertos compuestos fenólicos son solubles sólo en disolventes orgánicos, mientras que algunos grandes polímeros son muy insolubles en agua.

3.2.1. CLASIFICACIÓN

La clasificación de estos compuestos resulta muy compleja debido al gran número y diversidad de estructuras que se engloban y a la inexistencia de criterios claramente establecidos para tal propósito. Una clasificación ampliamente aceptada es la realizada por Harborne (1989) en base al número de átomos de carbono de sus estructuras básicas, de este modo, se pueden encontrar desde moléculas muy simples de bajo peso molecular (donde centraremos gran parte de nuestro estudio), hasta agregados poliméricos que contienen múltiples anillos aromáticos (polifenoles). También se incluyen sus derivados funcionales como los ésteres, los metil ésteres y los glicósidos.^[142]

La Figura 11 muestra la clasificación de las distintas familias de compuestos fenólicos en función del número de átomos de carbono que forman su esqueleto básico molecular; de ellos los más abundantes en la dieta son los ácidos fenólicos y los flavonoides (30 y 60% del total, respectivamente).^[130] Los flavonoides pueden

subdividirse a su vez en otras 13 clases con más de 5000 compuestos descritos,^[143] hecho que, en ocasiones, ha derivado en una clasificación alternativa de los compuestos fenólicos basada en dos grandes grupos principales: flavonoides y no flavonoides.^[144]

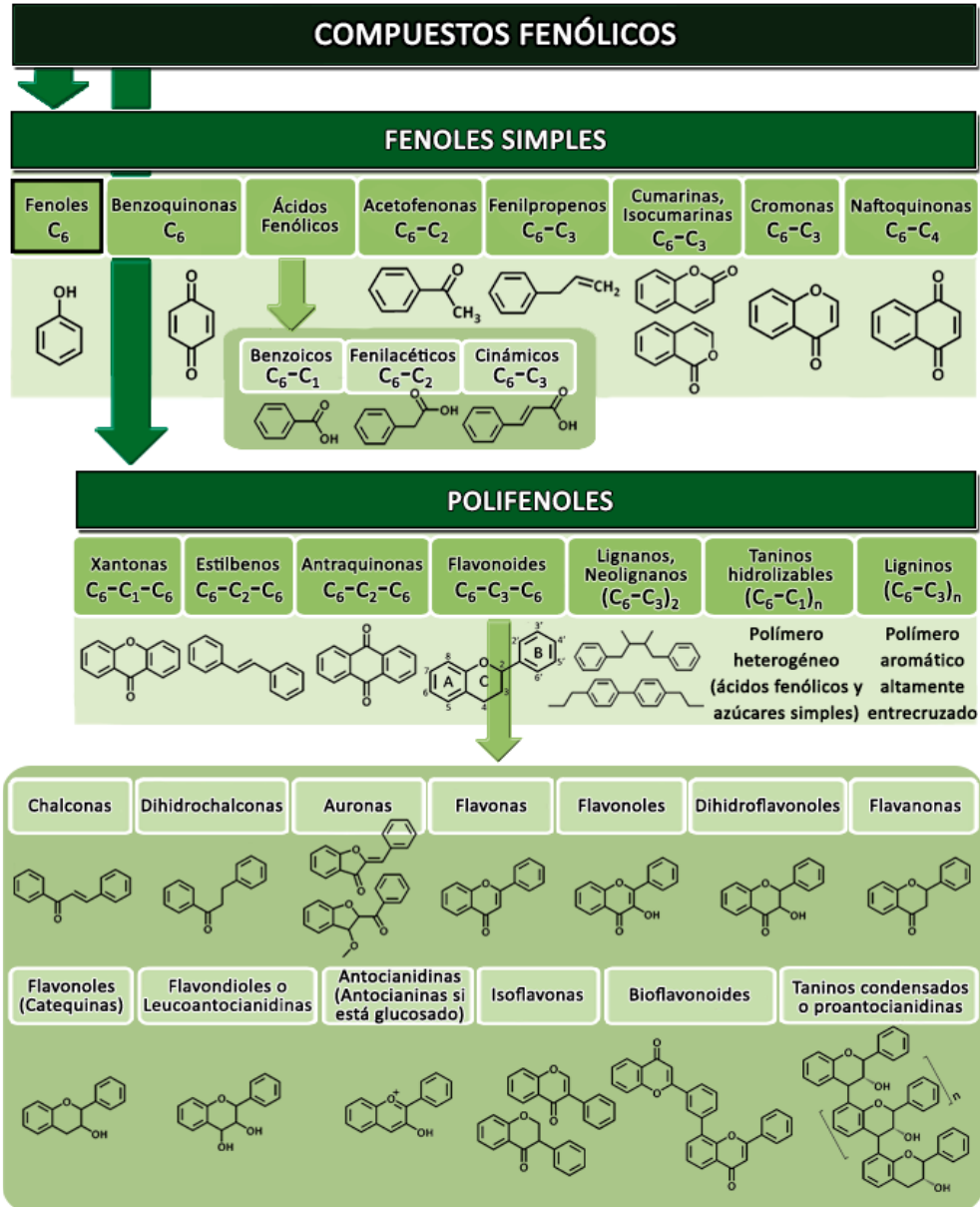


Figura 11. Clasificación de las familias de compuestos fenólicos.

3.2.2. FUENTES NATURALES DIETARIAS DE COMPUESTOS FENÓLICOS

La tendencia actual en la alimentación se proyecta hacia una constante búsqueda y consumo de productos saludables, donde los productos naturales con alto nivel de antioxidantes fenólicos adquieren un papel protagonista. Su presencia ubicua en los alimentos de origen vegetal (frutas, vegetales, café, té, especias y condimentos, etc.)^[144] aporta, de manera muy aproximada, una ingesta diaria de ~1.0 gramos dependiendo de la dieta realizada.^[145]

3.2.2.1. ESPECIAS Y CONDIMENTOS

Las especias y condimentos se consideran indispensables en el arte culinario. Su contenido en sustancias aromáticas, sápidas o excitantes comunica caracteres agradables al paladar y al olfato, aderezando o mejorando el aroma y/o sabor de muchos alimentos con un nulo o escaso aporte nutricional, asimismo son adicionalmente reconocidas por sus propiedades fisiológicas y medicinales y su amplio espectro de eficacia.^[146-148] Recientemente, han sido identificadas como fuentes de diferentes fitoquímicos que en un extenso porcentaje poseen una potente actividad antioxidante,^[149,150] tanto en su esencia natural o aceite esencial (AE) –constituido por la fracción volátil de los principios activos de origen vegetal obtenido por un proceso de arrastre con vapor de agua, destilación a presión reducida, etc. de semillas, raíces, frutos, hojas, corteza o flores de la planta–; como en sus extractos acuosos, consistentes en la fracción no volátil de los principios activos obtenidos por técnicas de extracción sólido-líquido.

La composición y cantidad de compuestos antioxidantes dependen de la zona geográfica, los factores climáticos y la altitud. Todos ellos factores estrechamente relacionados con la variedad y el quimiotipo de la especia, así como de la época de cosecha y el estado de crecimiento de la misma.^[151] A su vez, existen diferencias significativas según se analice el aceite esencial o su extracto acuoso, en ambos casos, dependiente del método de extracción^[152] e influenciado por el tiempo^[153] y la temperatura^[154] de extracción, lo que dificulta en exceso la comparativa de resultados asociados a la actividad antioxidante de las especies genéricas.

La Tabla 2 muestra los principales componentes antioxidantes presentes en los aceites esenciales de las cinco variedades de especias estudiadas, incluyéndose sus respectivos rangos relativos de abundancia sobre la base de la búsqueda bibliográfica seleccionada.






Especies	Componentes mayoritarios del AE	Referencias
 <p>CANELA <i>Cinnamomum Zeylanicum</i></p>	cinamaldehído (68-78%) eugenol (2-7%) β-cariofileno (0-6%)	[154], [155], [156]
 <p>NUEZ MOSCADA <i>Myristica Fragans</i></p>	sabineno (16-23%) α-pineno (9-21%) β-pineno (5-15%) terpinen-4-ol (3-14%)	[154], [157], [158], [159]
 <p>CLAVO <i>Caryophyllus Aromaticus</i></p>	eugenol (63-88%) acetileugenol (1-13%) β-cariofileno (1-17%)	[151], [154], [160], [161]
 <p>ORÉGANO <i>Origanum Vulgare</i></p>	carvacrol (48-89%) <i>p</i> -cimeno (0-12%) timol (0-9%) γ-terpineno (0-6%)	[151], [154], [162], [163], [164]
 <p>TOMILLO <i>Thymus Vulgaris</i></p>	timol (46-64%) <i>p</i> -cimeno (18-27%) linalool (0-6%)	[154], [162], [165], [166]

Tabla 2. Principales compuestos volátiles del AE de las especias estudiadas.

3.2.2.2. TÉS E INFUSIONES

El té y sus infusiones derivadas constituyen una de las fuentes naturales de compuestos fenólicos más importantes. Desde la Antigüedad se ha considerado una bebida esencial, tanto en la cultura china como en la japonesa, y, en la

actualidad, es un elemento básico en la vida cotidiana de aproximadamente la mitad de la población mundial, considerándose la segunda bebida más consumida del planeta por detrás del agua. Su creciente popularidad es consecuencia de sus propiedades beneficiosas para la salud,^[167-169] así como de las características organolépticas propias de este tipo de infusiones, asociadas, en gran medida, a las propiedades antioxidantes características de los polifenoles, entre otros compuestos, presentes en las hojas del té.^[170-172]

El té es una infusión realizada a partir de los brotes y hojas secas de una planta de hoja perenne nativa del sur de China, parte de la India, Birmania, Tailandia, Laos y Vietnam, correspondiente a la especie *Camellia sinensis*, cuyas variedades *sinensis* y *assamica* son las dos principales utilizadas en la producción del té.^[173] Los cuatro principales tipos de té: blanco, verde, negro y rojo o pu-erh, así como las múltiples variedades de infusiones existentes dentro de cada categoría, son el resultado de los diferentes métodos de industrialización de dicha planta (Figura 12). Encontramos desde procesos no fermentativos (té verde, té blanco), pasando por procesos semifermentados (té oolong), producidos al someter las hojas frescas del té a una etapa de fermentación parcial antes del secado, hasta procesos de fermentación completos que originan tés totalmente oxidados (té negro), e incluso, procesos de post-fermentación (té rojo o pu-erh) que engloban, a su vez, una etapa de maduración posterior, similar a la fermentación del vino con la participación de microorganismos.^[174]

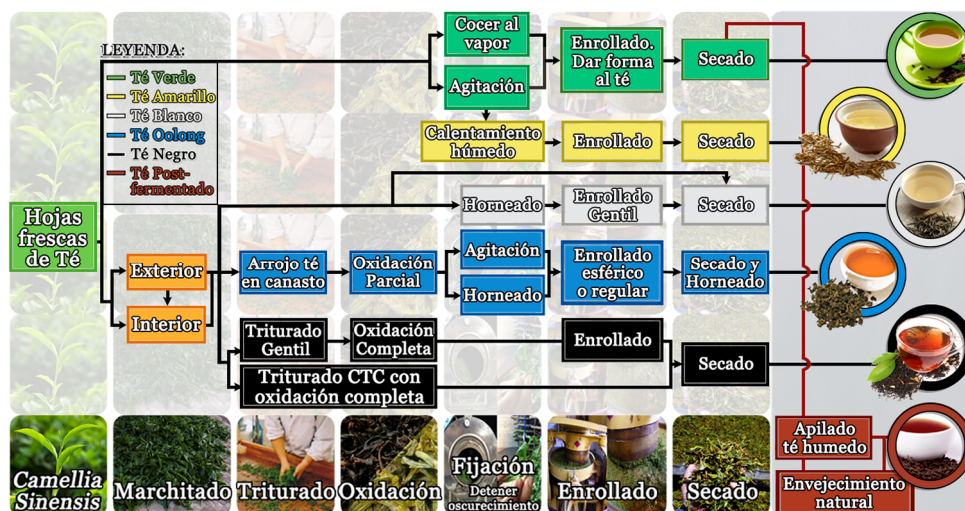


Figura 12. Diagrama de flujo del procesamiento de los diferentes tipos de té.

El proceso de fermentación involucra la oxidación enzimática de catequinas y conduce a la formación de teaflavinas y terubiginas, principales responsables de la coloración del té negro. Esta reacción es catalizada por el complejo enzimático polifenol oxidasa presente en las hojas del té.^[175]

La composición química del té es compleja; polifenoles, alcaloides (cafeína, teofilina y teobromina), aminoácidos, hidratos de carbono, proteínas, clorofila, flúor, minerales y oligoelementos, compuestos volátiles y otros compuestos indefinidos. Sin embargo, son varios los principales compuestos responsables de la actividad antioxidante de las múltiples variedades de té conocidas.^[176]

3.2.2.2.1. FLAVAN-3-OLES

Los flavan-3-oles representan más del 90% del contenido total de flavonoides presentes en el té, el resto está constituido por flavonoles.^[177] El tipo de flavonoides que se encuentran en las distintas variedades de té responde a los diferentes niveles de procesamiento descritos en la Figura 12. El té verde, al sufrir una oxidación mínima de las hojas, constituye una de las fuentes alimentarias más abundantes de catequinas, familia de compuestos pertenecientes a los flavan-3-oles. Las catequinas son compuestos hidrosolubles sin color que imparten amargor y astringencia a las infusiones de té verde. Gran parte de las características del té manufacturado, incluyendo el sabor, color y aroma, están asociadas directa o indirectamente con modificaciones de las catequinas.

Durante el proceso oxidativo a temperatura y humedad controlada al que tiene lugar la fabricación del té negro, se genera una actividad enzimática que al mismo tiempo que origina un oscurecimiento sustancial de las hojas, permite la polimerización de catequinas en teaflavinas y terubiginas.

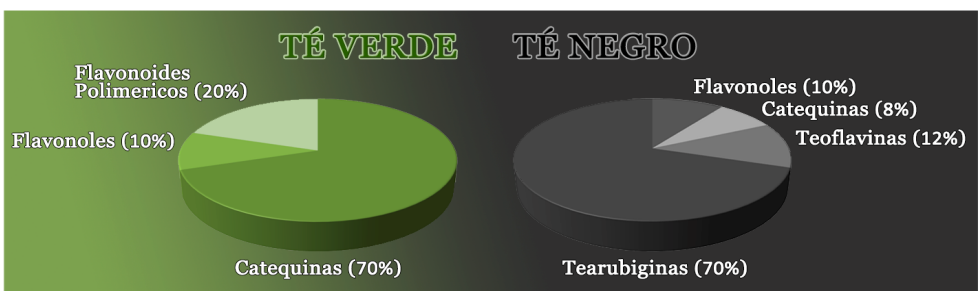


Figura 13. Flavonoides del té verde y té negro.^[178]

Los flavan-3-oles poseen dos centros quirales (C-2 y C-3), que se traduce a su vez en cuatro isómeros para cada nivel de hidroxilación del anillo B. Los isómeros (+)-catequina ($2R,3S$) y (-)-epicatequina ($2R,3R$) están muy extendidos en la naturaleza. Las catequinas se caracterizan por la presencia de 2 ó 3 grupos hidroxilos en el anillo B y por la dihidroxisustitución de las posiciones 5 y 7 del anillo A (Figura 14). Las catequinas más abundantes presentes en la composición de las hojas frescas del té son: (-)-epigalocatequina-3-galato (EGCG), (-)-epicatequina-3-galato (ECG), (-)-epigalocatequina (EGC), (-)-epicatequina (EC), (+)-catequina (C) y (+)-galocatequina (GC).^[174,176,179,180]

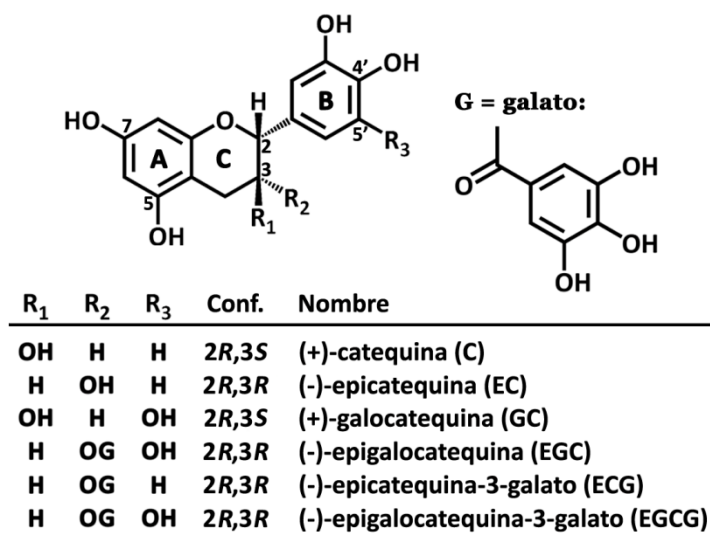
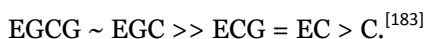


Figura 14. Estructura química de las principales catequinas del té.

La EGCG presenta una mayor actividad captadora de RL respecto del resto de catequinas debido a la presencia de un radical galato en el anillo C.^[181] El número de hidroxilos es el principal factor que contribuye al potencial antioxidante de las catequinas,^[182] traduciéndose en el siguiente orden de actividad:



3.2.2.2. ÁCIDOS FENÓLICOS

El ácido gálico y su éster del ácido quínico, teogalina, son los polifenoles simples más abundantes presentes en el té. Durante el procesado del té negro, concretamente en la etapa fermentativa, la cantidad de ácido gálico aumenta significativamente debido a la eliminación oxidativa de galatos fenólicos. Recientemente, hasta un total de 15 derivados diferentes del ácido fenólico se han identificado en el té negro.^[184]

3.2.2.3. FLAVONES Y FLAVONAS

La quercetina, miricetina, kaempferol y sus mono-, di- y tri-glucósidos representan la fracción más abundante de flavonoides del té. En los últimos años, 3 flavonoles, 19 flavonoles O-glicosilados, 28 flavonoles glicosilados acilados y 7 flavonoles C-glicosilados han sido identificados en muestras de té blanco, verde, oolong y negro.^[180]

3.2.2.4. TEAFLAVINAS, TERUBIGINAS Y THEABROWNINS

Teaflavinas y terubiginas son polifenoles de mayor tamaño formados a partir de los procesos fermentativos de oxidación y polimerización de los monómeros de catequinas presentes en el té.^[175] Las teaflavinas proporcionan al té astringencia en boca, así como una coloración anaranjada, y en ocasiones rojiza, al té. Son compuestos diméricos que poseen un esqueleto benzotropolona que se forma a partir de la co-oxidación adecuada de pares apropiados de catequinas. La oxidación del anillo B de EGCG o EGC es continuada por la pérdida de CO₂ y la fusión simultánea con el anillo B de EC o ECG. Cuatro principales teaflavinas se han identificado en el té negro: teaflavina (TF), teaflavina-3-galato (TF3G), teaflavina-3'-galato (TF3'G) y teaflavina-3,3'-galato (TFDG). Sus estereoisómeros y derivados también pueden estar presentes. Recientemente, se informó de la presencia de teaflavinas tri- y treta-galato en el té negro.^[185] La actividad antioxidante de las teaflavinas es comparable a la de las catequinas.^[183] Las teaflavinas pueden continuar oxidándose, constituyendo probablemente los precursores para la formación de terubiginas poliméricas, pese al desconocimiento actual del mecanismo de reacción implicado. Las terubiginas son pigmentos de color marrón rojizo o marrón oscuro presentes en el té negro que constituyen un máximo del 60% del peso seco de su infusión.^[186] La química de estos compuestos

ha sido evaluada recientemente, no obstante, sus estructuras no han sido aún elucidadas.^[187,188]

Theabrownins son compuestos solubles en agua formados durante la oxidación de pigmentos de las hojas del té y, además, son considerados como los principales componentes bioactivos presentes en el té pu-erh. Presentan una estructura química compleja, originada por la oxidación de los polifenoles mediante un mecanismo de formación incierto.^[189]

3.2.2.2.5. TEASINESINAS

Teasinesinas son dímeros de galocatequinas unidos por enlaces C-C entre sus anillos B formando un bifenilo. Están presentes principalmente en el té oolong. Existen diferentes tipos de teasinesinas: la teasinensina A es un producto de oxidación de dos moléculas de EGCG; la “B”, de EGCG y EGC; la “C”, de dos moléculas de EGC; y la “F”, de EGCG y EGC. La actividad radical de captación de teasinas A es comparable con la de EGCG sobre una base molar.^[190]

La composición de los compuestos bioactivos descritos y, por consiguiente, la capacidad antioxidante del té, al igual que sucedía con las especias y condimentos, se ve influenciada por una serie de parámetros asociados directamente a las condiciones de crecimiento de la planta: cepa genética, condiciones climáticas, perfil del suelo, altitud de crecimiento, prácticas hortícolas, temporada de recogida, etc. En este sentido, se han obtenido resultados interesantes sobre el crecimiento a la sombra del té en la composición fitoquímica y en la actividad antioxidante del mismo.^[191] Otros factores que pueden tener gran influencia en el perfil de componentes bioactivos del té son las prácticas de procesamiento, almacenamiento y modo de preparación en el hogar.

3.2.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos poseen una estructura química idónea para la captura de RL, atribuyéndose, en consecuencia, su elevada actividad antioxidante a su gran reactividad, fundamentada en la facilidad de donar electrones, o bien, átomos de hidrógeno del grupo –OH aromático^[192] y en la capacidad del nuevo radical originado para deslocalizar el electrón desapareado (efecto resonante) en el sistema de dobles enlaces característico del anillo aromático,^[193] estabilizándose mediante la formación de quinonas^[194] y finalizando, de este modo, la reacción en

cadena. Su capacidad de captación de iones metálicos, principalmente hierro y cobre, inhibe la formación de RL a través de la reacción de Fenton.

El grado de metoxilación e hidroxilación^[195] adquiere una importancia notoria, directamente relacionada con la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos, junto con otros factores como la concentración, el número y la localización de grupos hidroxilos contenidos en la estructura y el nivel de oxidación del antioxidante fenólico.^[195,196]

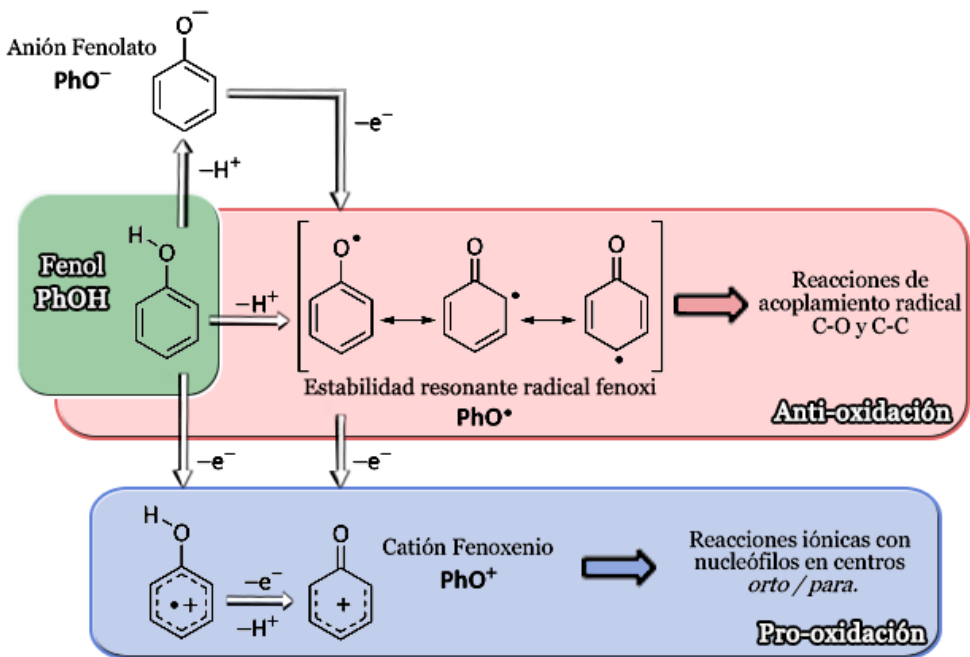


Figura 15. Reactividad físico-química básica del grupo funcional fenol.

3.3. SINERGIA ANTIOXIDANTE

Con la finalidad de generar una molécula relativamente estable derivada de un RL activo, una vez finalizado el proceso que posibilita este fin, la cesión de un electrón o un protón por parte de un antioxidante de carácter no enzimático a dicho radical, el antioxidante, además de adquirir naturaleza radicalaria, con una actividad residual inerte o ligeramente activa, presenta su correspondiente forma oxidada, la cual es incapaz de ejercer nuevamente su actividad antirradical. Este hecho desfavorable es solventado por un

modo de actuación sinérgico entre los diversos sistemas antioxidantes de los que dispone nuestro organismo. La colaboración activa de los mismos permite la reducción química de unos antioxidantes a otros (también pueden verse involucradas diversas enzimas en el proceso de regeneración de los distintos antioxidantes), lográndose así una disminución importante en la reactividad del radical antioxidante generado y la recuperación del propio antioxidante reducido durante el proceso, permitiéndole, de esta manera, participar nuevamente de manera activa en una posterior defensa frente a especies reactivas indeseadas.^[197] De este modo, se incrementa la eficacia biológica al verse disminuida sustancialmente la necesidad de síntesis o incorporación, a través de la dieta, de los antioxidantes oxidados.

La importancia relativa de las interacciones entre los diferentes tipos de antioxidantes constituye un campo complejo de la ciencia, ya que se ha convertido en uno de los puntos básicos del desarrollo de las denominadas “terapias antioxidantes”, las cuales examinan los posibles efectos beneficiosos sobre la salud que pueden llevar implícitos determinados suplementos constituidos por antioxidantes.^[198] La acción realizada por un antioxidante en presencia de otros no depende exclusivamente de su concentración y reactividad hacia las especies radicales; sino que esta acción se ve influenciada, sobre todo, por el estado del resto de los antioxidantes presentes con los cuales interactúa (microambiente), traduciéndose, en múltiples ocasiones, en un efecto final diferente al que se hubiera predicho para los mismos de manera independiente.

El efecto de la exposición simultánea de una combinación de dos o más antioxidantes puede ser clasificado en tres tipos generales:

1. **Aditivo:** efecto combinado de dos o más antioxidantes equivalente a la suma de sus capacidades antioxidantes de manera aislada, es decir, desarrollan sus actividades de manera individualizada sin contribución alguna por la presencia de otras sustancias antioxidantes.
2. **Sinérgico:** fenómeno cooperativo entre dos o más antioxidantes traducido en un efecto antioxidante superior al estimado por una simple adición de las efectividades individuales de los mismos englobadas en el sistema. Un tipo particular de sinergia es la *Potenciación*, en el que una determinada sustancia, aún no ejerciendo ningún efecto antioxidante de manera individual, provoca un aumento en la actividad de un antioxidante adyacente.

3. **Antagónico:** interferencias generadas por los distintos antioxidantes combinados entre sí sobre sus propias acciones antioxidantes que conllevan a una capacidad antioxidante global inferior a la suma de las actividades antioxidantes individuales, es decir, sus respectivos efectos antioxidantes son contrarrestados.

Actualmente se desconoce la naturaleza de muchas interacciones, incluso cuando son conocidos los efectos resultantes de la combinación de dos antioxidantes, la adición de un tercero hace que los efectos finales sean inciertos, requiriéndose un continuo estudio sobre bases empíricas. Por otra parte, la determinación de la actividad antioxidante de mezclas antioxidantes realizadas *in vitro* tan sólo aporta una idea aproximada de lo que sucede en situaciones complejas *in vivo*, siendo necesario considerar la posibilidad de que se presenten ciertos problemas, como la adaptación de la respuesta al aumento del estrés oxidativo.^[199]

3.3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL APLICADO AL ESTUDIO SINÉRGICO

El diseño y análisis de experimentos constituyen una herramienta estadística robusta aplicable a toda investigación científica donde se pretenda observar los posibles efectos ocasionados por diversas variables experimentales (variables independientes), sobre una variable respuesta (variable dependiente).

El objetivo del diseño experimental (DoE) es la selección óptima de los puntos que han de ser evaluados, los cuales están asociados al modelo matemático del proceso en cuestión. De manera genérica, estos modelos matemáticos se corresponden con polinomios de estructura desconocida, lo que implica un diseño particular de los experimentos asignados en función del estudio que se vaya a realizar. Por consiguiente, la elección del DoE posee una gran influencia en la exactitud de la aproximación y en el establecimiento de las superficies de respuestas finales obtenidas.

El procedimiento optimizado, basado en la aplicación de un algoritmo matemático estadístico del diseño experimental factorial completo o fraccionado (Figura 16) a partir de lo descrito por Akhnazarova y Kafarov (1982),^[200] permite describir cualitativa y cuantitativamente el efecto que presenta la combinación de

antioxidantes sobre la actividad antioxidante final de la mezcla. Dado que el algoritmo también posibilita identificar las interacciones que existen entre las variables estudiadas, constituidas por los antioxidantes seleccionados en el estudio, es posible definir la existencia de efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos, lo que contribuye, además, a optimizar las mezclas que maximizan la actividad antioxidante final.

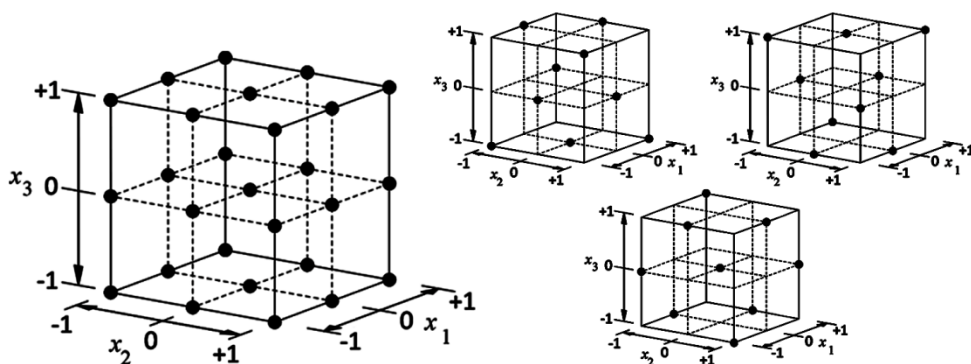


Figura 16. Diseño experimental factorial completo 3^3 (Izquierda).
Fracciones del diseño factorial fraccionado 3^{3-1} (Derecha).

3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La determinación de la actividad antioxidante de compuestos puros resulta imprescindible para predecir el potencial antioxidante *in vitro* de los mismos de manera previa a su ingesta, asimismo, nos permite conocer la protección frente a la oxidación o el deterioro del alimento que lo alberga en su composición. Sin embargo, se trata de una tarea ardua y compleja, acrecentándose de manera notoria en el caso de mezclas de antioxidantes con diferentes concentraciones y actividades.

En junio de 2004 en Orlando (Florida) se llevó a cabo el Primer Congreso Internacional sobre Métodos Antioxidantes, lo que puso de manifiesto la necesidad de establecer métodos unificados para medir la capacidad antioxidante de alimentos, de fitoterapéuticos, de nutraceuticos y de suplementos dietarios. Existía la necesidad imperiosa de proponer metodologías analíticas capaces de ser estandarizadas como procedimientos rutinarios, solucionando así problemas relacionados con la existencia de equivalencias entre unos métodos y otro, la

inconsistencia de los resultados y las interpretaciones de las conclusiones, las cuales, en ocasiones, exceden el propio significado de los resultados.

La propuesta está fundamentada en el creciente auge acerca de la temática sobre los antioxidantes, la continua aparición de nuevos productos comerciales que aluden intencionadamente a sus efectos antioxidantes beneficiosos y, sobre todo, a la propia demanda por parte de los consumidores. En consecuencia, se impone la necesidad de adquirir métodos unificados estandarizados que permitan servir de protocolo para una correcta aplicación del ensayo, comparar los resultados entre alimentos o productos comerciales, su aplicación útil como herramienta en el control de calidad, así como proveer de estándares para la regulación y las declaraciones de efectos en la salud.^[201] De manera adicional, debe exigirse el cumplimiento de otros requisitos, como pueden ser la utilización de un radical biológicamente relevante, la capacidad de medición de antioxidantes lipofílicos e hidrofóbicos, la utilidad para el control de calidad de rutina de un volumen amplio de muestras, la presentación de un punto final de ensayo definido con mecanismo conocido, una instrumentación fácilmente accesible, alta sensibilidad, alta reproducibilidad, simplicidad, rapidez y bajo coste, entre otros.

Las elevadas exigencias requeridas constituyen el principal motivo por el cual, de manera generalizada, ningún método o ensayo expresa con precisión por sí sólo la capacidad antioxidante total de una muestra, dado que este parámetro deberá expresar tanto la capacidad antioxidante de compuestos lipofílicos como hidrofóbicos, reflejar y diferenciar los diferentes mecanismos antioxidantes y evaluar la reactividad del antioxidante frente a diferentes especies reactivas, hechos que, a día de hoy, imposibilitan la existencia de métodos mundialmente unificados para tal propósito. Con el fin de esclarecer en toda su extensión la capacidad antioxidante, tratando así de facilitar la comparación e interpretación de los resultados, se opta por la planificación de diseños que involucren diferentes metodologías,^[202] permitiendo minimizar la problemática ocasionada por la disparidad en las condiciones experimentales de éstas, la alta complejidad de los sistemas estudiados (presencia de AO con dependencia de la zona de muestra analizada, amplio número y variedad de estructuras químicas antioxidantes y existencia de posibles efectos sinérgicos) y la gran diversidad de matrices que requieren ser evaluadas.

3.4.1. REACCIONES SET Y REACCIONES HAT

Los ensayos para determinar la capacidad antioxidante *in vitro* pueden ser clasificados, en base a las reacciones químicas implicadas, en dos categorías: ensayos basados en reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT, del inglés *Hydrogen Atom Transfer*) y ensayos basados en reacciones de transferencia de electrones (SET, del inglés *Single Electron Transfer*).^[201,203]

Categoría	Ensayo	Acrón.
SET	Poder de reducción antioxidante del hierro	FRAP
	Capacidad antioxidante reductor de ión cúprico	CUPRAC
	N,N- dimetil- <i>p</i> -fenilendiamina	DMPD
HAT	Capacidad de absorción del radical oxígeno	ORAC
	Parámetro antioxidante de captura de radicales	TRAP
	Oxidación de la crocina	CBA
	Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico	TBARS
	Capacidad de eliminación total de oxiradicales	TOSC
	Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad	LDL's
	Deoxirribosa	-
Xantina oxidasa	-	
SET y HAT	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico	ABTS
	Capacidad antioxidante equivalente al Trolox	TEAC
	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo	DPPH

Tabla 3. Clasificación de los ensayos de actividad antioxidante.

Las reacciones SET consisten en la transferencia de un electrón para reducir un compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales. La reactividad relativa de un antioxidante que involucra este tipo de reacciones está basada, fundamentalmente, en la desprotonación y, por consiguiente, está gobernada por el potencial de ionización (PI),^[204] de tal manera que estos valores disminuyen con el aumento del pH, reflejando un incremento en la capacidad electrodonante con la desprotonación.

Las reacciones HAT miden la capacidad de un antioxidante para estabilizar un RL mediante la transferencia de átomos de hidrógeno. La reactividad del AO dependerá de la energía de disociación de enlace del grupo que contiene el hidrógeno a transferir. En este sentido, ciertos aspectos estructurales como la presencia de un grupo hidroxilo en posición *orto* o la posible formación de enlaces intermoleculares entre distintos sustituyentes pueden contribuir a reducir la entalpía de disociación, facilitando la formación de un radical estable. Este tipo de reacciones son rápidas e independientes del pH y del disolvente; no obstante, resultan sensibles a la presencia de metales y agentes reductores, lo que puede generar una aparente mayor reactividad del antioxidante. En determinadas ocasiones, el disolvente puede ejercer una marcada influencia en métodos como el ORAC y el ABTS.^[205]

Así pues, los métodos basados en reacciones SET hacen referencia a la reacción redox del antioxidante como indicador del punto final del ensayo, mientras que la mayoría de los métodos que responden a un mecanismo HAT consisten en la monitorización de una cinética competitiva entre, generalmente, un generador de RL sintético, un compuesto molecular fácilmente oxidable y el respectivo antioxidante objeto del estudio. De una u otra manera, las metodologías basadas en ambos tipos de reacciones fueron desarrolladas con el fin de determinar satisfactoriamente la capacidad de captura radical, no así la capacidad antioxidante preventiva que pueda poseer cierta muestra.

A continuación, se describen brevemente los principales métodos utilizados en la determinación de la capacidad antioxidante en base a sus mecanismos de reacción: SET, HAT, o ambas.

3.4.1.1. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE QUE UTILIZAN MECANISMOS DE REACCIONES SET

3.4.1.1.1. FRAP (*FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER*)

Metodología basada en la reducción del complejo de la tripiridiltriazina (TPTZ) férrica a su forma ferrosa por la acción de un antioxidante en medio ácido.^[206] La reacción provoca un cambio de color de intensidad proporcional a la actividad reductora de la muestra antioxidante que puede ser monitorizado a través de la medida de la absorbancia a 595 nm durante 30 minutos.^[207] Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-

carboxílico) ($\mu\text{mol Trolox/g}$ o $\mu\text{mol Trolox/L}$), análogo hidrosoluble de la vitamina E, tras previa realización de la curva de calibrado del mismo.

La reducida aplicación del método responde al planteamiento de diversas críticas, entre las que destacan el pH no fisiológico al que se realiza,^[203] el valor sobreestimado adquirido por parte de cualquier compuesto donante de electrones, incluso sin propiedades antioxidantes, con un potencial redox inferior al par redox del complejo Fe(III)-TPTZ a Fe(II)-TPTZ ($E_{\text{Red}} = 0.77 \text{ V}$),^[203] o bien, que exista absorción a 573 nm por parte de compuestos antioxidantes como la bilirrubina oxidada.^[126] Asimismo, hay compuestos como el ácido ascórbico que, además de reducir el ion férrico a ferroso, pueden reaccionar con este último para generar nuevos radicales libres.^[126]

Finalmente, dado que el parámetro FRAP se define como una medida del poder antioxidante total, se tratan indistintamente sustancias reductoras y antioxidantes. Sin embargo, dicho ensayo no implica a ningún prooxidante, ni a ningún sustrato oxidable. De igual forma que ciertos reductores que transforman el ión Fe(II) a ión Fe(III) no son antioxidantes, hay antioxidantes que no son capaces de llevar a cabo esta reacción, por ejemplo, el glutatión (GSH), un importante antioxidante natural que da resultados negativos en el ensayo FRAP.^[199]

3.4.1.1.2. CUPRAC (CUPRIC REDUCING ANTIOXIDANT CAPACITY)

Recientemente se han estudiado variantes al método FRAP usando cobre en lugar de hierro: método CUPRAC.^[208] Este ensayo está basado en la reducción de Cu(II) a Cu(I) por la acción combinada de los antioxidantes presentes en la muestra. La molécula neocuproína forma un complejo con el Cu(I), el cual absorbe a 450 nm. La medida de absorbancia de la muestra antioxidante analizada es convertida a equivalentes de ácido úrico mediante una curva de dilución generada por los estándares del mismo. El cobre tiene un potencial redox más bajo que el hierro, lo que se traduce en reacciones más selectivas: azúcares y ácidos cítricos, que comúnmente interfieren en el ensayo FRAP, no son oxidados en el ensayo CUPRAC. No obstante, es conveniente tener en cuenta que para potenciales redox bajos se incrementa el ciclo redox, así que la reducción de cobre puede ser, incluso, un indicador más sensible del potencial de la actividad prooxidante de los antioxidantes.^[201]

3.4.1.1.3. DMPD (*N,N*-DIMETHYLPHENYLENEDIAMINE DIHYDROCHLORIDE)

Requiere de un radical libre, $\text{DMPD}^{*\cdot}$ generado a partir de dicloridrato de *N,N*-dimetilfenilendiamina (DMPD) que, en presencia de una disolución oxidante de cloruro férrico en medio ácido, se convierte en un radical catiónico coloreado y estable, el cual presenta un máximo de absorbancia a 505 nm. La monitorización del descenso de la absorbancia durante 10 minutos tras la adición de una determinada muestra antioxidante sobre la disolución del radical y, tras comparación con la de un blanco, es indicativa de la actividad antioxidante del mismo, expresándose los resultados en equivalentes de Trolox.^[209]

3.4.1.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE QUE UTILIZAN MECANISMOS DE REACCIONES HAT

3.4.1.2.1. ORAC (*OXYGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY*)

Determina la capacidad de captación del radical peroxilo, generado a partir de la molécula orgánica dihidrocloruro de 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (AAPH). Dicho radical ataca a la molécula de fluoresceína produciendo su oxidación. La molécula oxidada ya no emite fluorescencia y, por consiguiente, se observa un descenso de la misma (longitud de onda de excitación y emisión de 493 y 515 nm, respectivamente). En presencia de antioxidantes, éstos reaccionan con los radicales peroxilo, por tanto, la fluoresceína mantiene la misma emisión de fluorescencia permitiendo determinar la capacidad antioxidante mediante la comparación del descenso en la fluorescencia producido en presencia y ausencia del antioxidante.^[210] La cinética de la reacción puede sufrir variaciones en función de la concentración de antioxidante, hecho que limita su aplicación.

3.4.1.2.2. TRAP (*TOTAL RADICAL-TRAPPING ANTIOXIDANT PARAMETER*)

El ensayo TRAP, al igual que sucede en el ensayo ORAC, determina la captación del radical peroxilo, en este caso, generado a partir de la molécula 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP). En una etapa inicial, la oxidación es inhibida por el antioxidante durante un periodo de tiempo denominado *lag phase*. La capacidad de captación es medida mediante la comparación de la duración de dicho periodo en la muestra y en el Trolox utilizado como referencia.^[211] Su aplicación también se ve limitada por varios inconvenientes como son la existencia de distintos

puntos finales de medida establecidos por distintos autores y el hecho de que no todos los AO poseen una *lag phase* claramente establecida, lo que dificulta la comparación de resultados.^[203,212]

3.4.1.2.3. CBA (CROCIN BLEACHING ASSAY)

Ensayo que consiste en la oxidación (decoloración) de la crocina, un derivado natural de carotenoides, por radicales peroxilo generados a partir del AAPH. La actividad antioxidante se obtiene de la medida de la tasa de decoloración de la crocina en presencia y ausencia de antioxidante a 443 nm. Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox.^[213]

Al igual que sucede en los ensayos anteriormente descritos, se han planteado diversas críticas del método.^[126,201,203] La crocina es una mezcla de pigmentos naturales extraídos del azafrán que presenta una gran variabilidad entre distintos lotes, lo que limita su aplicación a gran escala. La coincidencia de la longitud de onda a la que se mide con la de muchos pigmentos alimentarios como los propios carotenoides, así como la alta variabilidad de los mecanismos de reacción entre la crocina y los diferentes antioxidantes, dificulta en exceso la interpretación de los resultados. No obstante, y dada la variabilidad existente entre los distintos protocolos publicados para este método, un trabajo reciente analizó, paso a paso, este método solventando alguno de los problemas anteriormente indicados, como los productos que se pueden utilizar como fuente de crocina, y proponiendo, a su vez, la aplicación de nuevos parámetros de medida.^[213]

3.4.1.2.4. TBARS (TIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES)

Medida de la absorbancia a 532 nm de un complejo cromógeno formado entre el ácido tiobarbitúrico (TBA) y el ácido malondialdehído (MDA), siendo éste último un producto secundario de la oxidación lipídica. La presencia de antioxidantes con elevada actividad en las muestras analizadas está asociada con una menor cantidad generada de MDA y, por consiguiente, con una menor absorbancia registrada.^[214] El MDA puede reaccionar con otros compuestos presentes en la muestra, provocando interferencias en la medida de absorbancia asociada a los compuestos antioxidantes.^[215]

3.4.1.2.5. TOSC (*TOTAL OXYRADICAL SCAVENGING CAPACITY*)

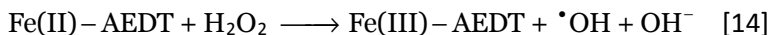
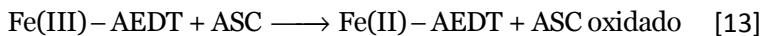
Se basa en la oxidación del ácido α -ceto- γ -metilbutírico (KMBA) a etileno por la acción de radicales hidroxilo, peroxilo y peroxinitrito generados a partir del ABAP. La formación de etileno es analizada mediante cromatografía de gases. La determinación de la capacidad antioxidante se basa en la cuantificación del área bajo la curva que define la inhibición de la formación de etileno por la presencia de antioxidantes en función del tiempo, en comparación con la obtenida para un compuesto patrón.^[216] Recientemente, MacLean y sus colaboradores propusieron una modificación del método para expresar los resultados en equivalentes de Trolox, solucionando uno de los principales problemas del método original que, pese a ser una técnica muy rápida, no tenía una expresión clara de los resultados.^[217] No obstante, existen dificultades a la hora de establecer comparaciones entre los resultados debido a que la cinética de la reacción no tiene una relación dosis-respuesta establecida, entre la cantidad de antioxidante y el porcentaje de inhibición.

3.4.1.2.6. ENSAYO DE OXIDACIÓN DE LAS LDL'S (*LOW-DENSITY LIPOPROTEIN*)

La oxidación de las lipoproteínas LDL's por los RL es un proceso que ocurre en los seres vivos y que constituye, a su vez, una de las primeras etapas del proceso de la aterosclerosis. En este método se induce la oxidación de LDL's aisladas de distintos individuos mediante diferentes elementos y compuestos como Cu(II) o AAPH, midiéndose posteriormente la absorbancia a 234 nm, longitud de onda a la cual absorben los dienos conjugados, generados durante el proceso de oxidación de las LDL's.^[218] La modificación de la absorbancia con el tiempo puede dividirse en tres fases: una *lag phase* en la que los dienos no se han comenzado a formar por la presencia de antioxidantes en la muestra y, por tanto, no aumenta; una fase de propagación en la que aumenta de manera exponencial por la formación de dienos; y una fase final de descomposición de los mismos, en la que la absorbancia tiende a bajar lentamente. Los resultados del ensayo se pueden expresar a través de varios parámetros de medida: la comparación de la duración de la *lag phase* entre un blanco y una muestra antioxidante; la cantidad inicial de dienos conjugados; la cantidad máxima de los mismos;^[219] hasta concluir en el denominado parámetro CLT₅₀, el cual mide la cantidad de antioxidante necesaria para aumentar la *lag phase* en un 50% respecto al control.^[220]

3.4.1.2.7. ENSAYO DE LA DEOXIRRIBOSA

Se determina la capacidad de captura de radicales hidroxilo por parte de una muestra antioxidante. Dicho ensayo se basa en las siguientes reacciones:



La deoxirribosa (DR) adicionada capta el radical generado previamente:



Cuando el antioxidante está presente en la muestra, éste es quien capta los radicales $\cdot\text{OH}$, evitando así la formación del cromógeno, lo que se traduce en una disminución de su valor de absorbancia medida a 533 nm.^[221] Si se elimina el ascorbato (ASC) del medio, es posible medir la capacidad del antioxidante para reducir el Fe(III)-AEDT a Fe(II)-AEDT.

3.4.1.2.8. ENSAYO DE LA XANTINA OXIDASA

La xantina oxidasa es una de las principales fuentes *in vivo* de ROS. Es una deshidrogenasa que transfiere el electrón al NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) lo que produce la oxidación de la xantina o la hipoxantina a ácido úrico.^[222] Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo, se transforma en una oxidasa por proteólisis limitada y, en este caso, reacciona con el oxígeno, en lugar de con el NAD, produciendo superóxido y peróxido de hidrógeno. La capacidad de captura de superóxido por parte de multitud de antioxidantes se mide a partir de la inhibición de la generación de superóxido, a través del sistema hipoxantina-xantina.^[223] Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición de la actividad enzimática, a partir de los cambios producidos en la absorbancia a 295 nm tras la adición de la muestra antioxidante en comparación con los producidos en presencia de un blanco.

Recientemente, se han desarrollado modificaciones del método en las que la reacción no se monitoriza mediante la medida de cambios en la absorbancia, sino por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC),^[224] o bien, por la evolución en la formación de ácido úrico.^[225]

3.4.1.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE QUE UTILIZAN MECANISMOS DE REACCIONES SET Y HAT

3.4.1.3.1. ABTS (2,2'-AZINO-BIS-3-ETHYLBENZOTHAZOLINE-6-SULPHONIC ACID) O TEAC (TROLOX EQUIVALENT ANTIOXIDANT CAPACITY)

Ensayo basado en la capacidad de los antioxidantes para capturar el radical catiónico ABTS^{•+}. Dicho radical posee una coloración verde-azulada con un máximo de absorción a 415 nm y una serie de máximos secundarios a 645, 660, 734, 815 y 820 nm.^[220] Dependiendo de la variante del método TEAC utilizada se emplean distintas longitudes de onda, siendo las más frecuentes 415 nm y 734 nm.^[193] En el desarrollo del método se suelen emplear dos estrategias: inhibición y decoloración. En la primera, los antioxidantes se añaden previamente a la generación del radical ABTS^{•+} y se determina la inhibición de la formación del radical, la cual se traduce en un retraso en la aparición de la coloración verde-azulada. En la segunda estrategia, los antioxidantes se añaden una vez el ABTS^{•+} se ha formado y se determina entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir, la decoloración de éste. El ensayo TEAC presenta, además, variaciones en el modo mediante el cual se genera el radical catiónico ABTS^{•+}: puede ser de manera enzimática con mioglobina o peroxidasa de rábano, o bien químicamente con MnO₂, K₂S₂O₈ o el radical peróxido (O₂^{•-}); por último, también se puede generar electroquímicamente.^[226] En el método original^[227] se generaba el radical directamente en presencia del antioxidante con metamioglobina y peróxido de hidrógeno, oxidando éste la metamioglobina que, a su vez, oxidaba el ABTS. Sin embargo, se observó que determinados polifenoles como la quercetina podían interactuar con los reactivos, impidiendo la formación del radical y dando un valor de capacidad antioxidante sobreestimado, por lo que se pasó a generar el radical previamente a la adición del antioxidante.^[228] El descenso producido por el Trolox, empleado como patrón, es comparado con el producido en el mismo periodo de tiempo por el antioxidante analizado.^[226]

Aún así, se han planteado ciertas críticas a esta modificación, en el sentido de que los polifenoles, además de reaccionar con el radical para dar lugar a la molécula original, pueden dar lugar a otros compuestos, generando de esta forma problemas a la hora de determinar la estequiometría de la reacción entre el ABTS y el antioxidante, o bien, a la hora de establecer las relaciones estructura-actividad,

puesto que el cálculo no se podría basar en los moles de molécula no radicálica.^[229,230] También puede ocurrir que los compuestos polifenólicos formen aductos con el radical, por lo que no toda la pérdida de absorbancia se debería a que el radical volviera a su forma inicial. En este sentido, se ha observado la formación de estructuras de este tipo entre el radical ABTS^{•+} y la catequina.^[230]

3.4.1.3.2. DPPH (1,1-DIPHENYL-2-PICRYLHYDRAZYL)

El ensayo de captura del radical DPPH[•], propuesto por Marsden Blois en el año 1958,^[231] demostró, por primera vez, la capacidad del radical libre DPPH[•] para aceptar un átomo de hidrógeno proveniente de una molécula de cisteína. Actualmente, la comunidad científica hace uso mayoritario del protocolo de ensayo propuesto en el año 1995 por Williams y sus colaboradores.^[232]

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH[•]), de origen sintético y comercial, es uno de los pocos radicales orgánicos con átomos de nitrógeno en su estructura que presenta estabilidad, originada por la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula, y por tanto, a diferencia de la mayoría de los RL, no sufre proceso de dimerización. Adicionalmente, la deslocalización del electrón provoca una intensificación en el, ya de por sí, intenso color violáceo característico del radical, el cual disuelto en medio metanólico absorbe a una longitud de onda de 515 nm. En presencia de un sustrato antioxidante, que pueda donarle o transferirle un átomo de hidrógeno, se produce la reducción del mismo, desvaneciéndose así la coloración violácea de la disolución y dando paso a su forma reducida (DPPH-H) de color amarillenta (Figura 17).

Como se ha comentado con anterioridad, prevalecía el pensamiento de que el ensayo DPPH[•] involucraba una reacción HAT; sin embargo, M.C. Foti y sus colaboradores sugirieron que la reacción que tiene lugar se corresponde con un mecanismo SET.^[233] Los autores determinaron que, en la reacción del DPPH[•] con polifenoles, la etapa determinante de la velocidad consiste en un proceso rápido de transferencia electrónica de un anión fenóxido al DPPH[•], desplazando a una vía secundaria de la reacción la sustracción de un átomo de H, por parte del radical al antioxidante fenólico neutral, debido a la lentitud con la que transcurre este proceso en disolventes con fuertes enlaces capaces de aceptar hidrógenos, tales como etanol y metanol. Este último, el disolvente habitual empleado en los ensayos. Adicionalmente, los autores indicaron que la aparición de ácidos o bases

presentes como contaminantes en el disolvente pueden influenciar drásticamente el equilibrio de ionización de fenoles, alterando los valores de las constantes de velocidad de la reacción.^[234] Por consiguiente, la reacción de estabilización del radical transcurre, principalmente, mediante un mecanismo SET, con un aporte marginal de un mecanismo HAT con metanol como disolvente.^[126]

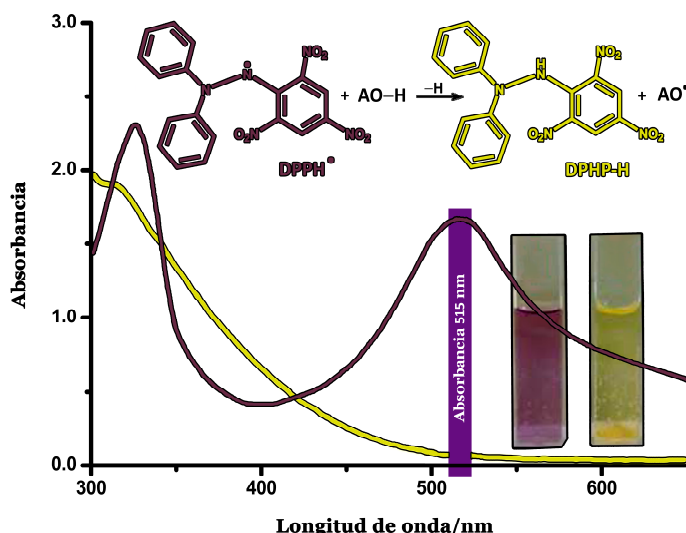


Figura 17. Espectro de absorción del radical DPPH^\bullet y de su especie reducida DPPH-H tras la reacción del radical DPPH^\bullet con el antioxidante (AO-H).^[235]

Un simple seguimiento de la disminución de absorbancia asociado al proceso de interacción entre el AO y el radical DPPH^\bullet permite evaluar eficazmente la actividad antioxidante del mismo. Pese a que existen diversas propuestas a la hora de presentar los resultados, la mayoría de los estudios coinciden en el uso del parámetro EC_{50} , denominado *concentración efectiva* y cuyo significado se corresponde con la cantidad de AO requerida para disminuir en un 50% la concentración inicial del radical en el estado estacionario. Por razones de claridad, es preferible hablar en términos de $1/\text{EC}_{50}$ o *poder antirradical* (ARP, del inglés *Anti-Radical Power*).

La simplicidad y disponibilidad instrumental son características determinantes que establecen este método como prueba habitual en la determinación de la eficacia antirradicalaria de multitud de compuestos aislados y extractos de naturaleza y origen variado (vinos, zumos, compuestos polifenólicos, etc.).

El ensayo DPPH[•] presenta algunas desventajas que limitan, en cierta manera, su aplicación. Los altos potenciales que poseen los monómeros de la anilina y del pirrol se relacionaron con una mayor dificultad para interactuar con radicales DPPH[•],^[236] lo que significa que dicho ensayo es válido para compuestos termodinámicamente capaces de reaccionar con él; aquellos que poseen un potencial de oxidación inferior al potencial formal de reducción del radical DPPH[•], 0.340 V frente al electrodo de Ag/AgCl a pH 7.0, condiciones idénticas a las utilizadas en nuestro estudio. Sin embargo, otros radicales menos estables y de interés biológico, como el radical peroxilo o hidroxilo, muestran potenciales formales de reducción superiores^[237] pudiendo reaccionar, normalmente con un mecanismo de reacción diferente, con especies que presenten potenciales de oxidación bajos, hecho que impide la viabilidad del ensayo. La diferencia de estabilidad entre el radical DPPH[•] y el radical ROO[•], altamente reactivo frente a AO, se refleja en la cinética lenta de la interacción, por lo que, en algunos casos concretos, resulta el AO inerte frente a él. Existen algunos métodos acertados para el estudio de ROS, tales como el ensayo fluorométrico para el H₂O₂, los métodos RSE/RPE (resonancia de *spin* electrónico y resonancia paramagnética electrónica, respectivamente), etc.^[238-242] Asimismo, al ser una longitud de onda próxima a la región visible, la capacidad antioxidante de la muestra puede ser subestimada debido a la interferencia de compuestos como los carotenoides u otros compuestos presentes en la muestra que también absorben en la región próxima del radical.^[201]

Otras desventajas adicionales a la dificultad de la interpretación de los resultados por posibles subestimaciones son el impedimento estérico en las moléculas con mayor peso molecular,^[243] o bien, la relación no lineal existente entre la concentración de AO y la cinética de reacción asociada a la interacción,^[244] por lo que resulta un tanto arbitrario medir la capacidad antioxidante mediante el uso del parámetro EC₅₀.

Finalmente, se ha descrito la reacción reversible generada por el isoeugenol con el DPPH[•],^[245] lo que podría ocasionar lecturas de capacidad antioxidante bajas en aquellas muestras que lo contienen a él o a otros fenoles con una estructura similar (*o*-metoxifenoles), restando validez a dichos resultados.

3.4.2. TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS VOLTAMÉTRICAS

En los últimos años, los métodos espectrofotométricos han adquirido cierta repercusión en el análisis *in vitro* de la capacidad antioxidante de muestras biológicas y extractos vegetales. La sencillez y el bajo coste asociado al ensayo de captura radical DPPH[•] lo destaca como una de las metodologías más empleadas en este campo. De manera aún más reciente, el empleo de diversas técnicas electroquímicas han demostrado ser una alternativa válida para llevar a cabo la evaluación del poder antioxidante de diferentes muestras con similares ventajas al ensayo DPPH[•] en cuanto a sencillez y bajo coste de los análisis, pero extremadamente más rápidas.^[246] En general, los compuestos antioxidantes actúan como agentes reductores y, en disoluciones, tienden a ser fácilmente oxidados sobre la superficie de un electrodo. Basado en este hecho, se establece una relación intrínseca entre el comportamiento electroquímico del compuesto antioxidante y su consiguiente actividad antioxidante.^[246,247]

Se han propuesto métodos directos e indirectos para evaluar la actividad antioxidante de productos naturales.^[239] Las medidas electroquímicas son una prueba rápida para estimar la capacidad antioxidante de muchas moléculas orgánicas,^[246-250] lo que posibilita el análisis de la interacción entre el AO y las ROS, tal y como se estudió en el caso concreto de las dihidropiridinas, con el radical superóxido generado electroquímicamente.^[251,252]

Los análisis electroquímicos permiten correlacionar potenciales de oxidación, intensidades de corriente u otros parámetros electroquímicos como el potencial de onda media, con la capacidad antioxidante, mostrándose más selectivos y sensibles que los métodos espectrométricos^[246,249] y más reproducibles que los análisis biológicos para la evaluación del poder antioxidante. La sensibilidad, selectividad y reproducibilidad del método varían en función de los distintos tipos de electrodos que puedan ser empleados en el análisis, en ciertos casos, comprometido por la gran capacidad de adsorción de las especies, como sucede con los compuestos polifenólicos estudiados.

La voltametría engloba un conjunto de técnicas electroquímicas aplicables como métodos electroanalíticos con gran variedad de aplicaciones en diversos campos de la ciencia, considerándose las más eficaces en el estudio de las propiedades antioxidantes.^[253] Las técnicas voltamétricas fueron desarrolladas en respuesta a los múltiples problemas que planteaba el uso de las técnicas

polarográficas acerca de la sensibilidad y la selectividad, hecho que limita, en gran medida, su viabilidad como técnica de análisis rutinario. Estas técnicas basan su funcionamiento en la respuesta intensidad-potencial de un electrodo polarizable, generalmente de dimensiones reducidas, sumergido en una disolución electrolítica que contiene la sustancia electroactiva que desea ser analizada. En función del tipo de señal de excitación aplicada, pueden distinguirse diversas técnicas, entre ellas, la voltametría cíclica y la voltametría de pulso diferencial utilizadas en la presente Tesis.

Con independencia de la técnica voltamétrica seleccionada, el proceso estudiado involucra la electrólisis de una o más especies electroactivas, la cual implica una transferencia electrónica en el electrodo y transporte de materia hacia el electrodo. Este transporte está ocasionado bien por migración (movimiento de especies por diferencia de carga), convección (movimiento de la materia por cambios físicos) o difusión (movimiento de las especies por gradiente de concentración). En la mayoría de los casos, la electrólisis se efectúa bajo condiciones tales que la difusión sea el modo fundamental de transporte de la especie electroactiva, minimizando la migración y la convección mediante la adición de un exceso de electrolito soporte y evitando el movimiento de agitación y los gradientes de temperatura.

Las técnicas voltamétricas utilizan un sistema de tres electrodos sumergidos en la disolución de electrolito soporte conteniendo la especie que pretende ser analizada. Los electrodos empleados deben cumplir funciones características dentro del montaje experimental. Así pues, el electrodo de trabajo utilizado, sobre el que se varía el potencial con el tiempo, debe ser fácilmente polarizable; el electrodo de referencia debe presentar un potencial constante durante el proceso de medida; finalmente, el electrodo auxiliar o contraelectrodo ha de conducir de manera adecuada la electricidad a través de la disolución, desde la fuente generadora hasta el electrodo de trabajo.

3.4.2.1. VOLTAMETRÍA CÍCLICA

La voltametría cíclica (VC) es un procedimiento utilizado recientemente como una herramienta prometedora para la evaluación de la actividad antioxidante,^[247,253-255] ya que ofrece una ubicación rápida de los potenciales redox de las especies electroactivas, pero, también, determina el número de éstas, facilita información acerca de la posible evaluación del efecto del medio en dichos procesos, otorga

datos cualitativos acerca de la estabilidad de los estados de oxidación y permite el conocimiento de la cinética de transferencia electrónica. La VC resulta una técnica acertada en el estudio de compuestos antioxidantes de manera individualizada. Sin embargo, cuando se aplica a mezclas complejas no permite la determinación específica de cada compuesto, sino que aporta información valiosa en cuanto a la cantidad de grupos funcionales diferentes responsables de cada pico registrado.^[246,250]

La VC es una medida electroquímica consistente en la variación del potencial, provocada por una señal de excitación de forma triangular, sobre un electrodo estacionario colocado en una disolución no agitada, es decir, una variación del potencial aplicado desde un valor inicial (E_i) hasta un vértice de potencial (E_λ), seguido de un barrido inverso (la inversión puede ocurrir varias veces durante un mismo experimento) hasta alcanzar un potencial final (E_f), el cual, normalmente, es idéntico al inicial (Figura 18). La corriente resultante (i) es monitorizada en función del potencial aplicado (E) originando la correspondiente curva i - E , la cual es representada en un gráfico característico denominado voltagrama cíclico (Figura 15).

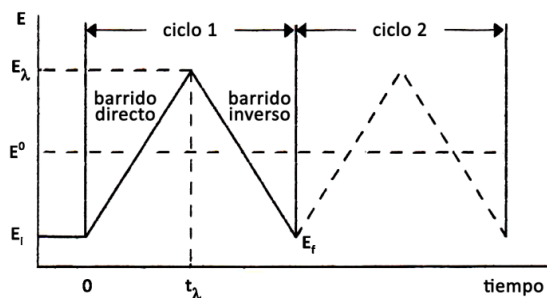


Figura 18. Señal triangular de excitación del potencial en VC.

Los potenciales de oxidación determinados por los picos registrados por VC han sido utilizados en la comparación de actividades antioxidantes de diversos compuestos, tales como ácidos fenólicos, flavonoides, ácidos cinámicos, etc.^[255,256] Para ello se ha empleado un electrodo de carbón vitrificado (ECV), electrodo de trabajo característico en VC debido a que presenta una ventana de potencial idónea para el estudio de oxidaciones (lo que lo ha convertido en el electrodo más adecuado para la determinación de la capacidad

antioxidante). La VC resulta especialmente adecuada debido a su simplicidad instrumental y de preparación de muestras, rapidez y, fundamentalmente, a la posibilidad, tanto de analizar capacidades antioxidantes en mezclas sin necesidad de medir la actividad específica de cada componente, como de poder ser utilizada directamente sobre muestras biológicas,^[55-57] siempre con sensibilidades superiores a las requeridas para las concentraciones de antioxidantes fisiológicas.

Si un sistema redox determinado se mantiene en equilibrio al ser sometido a un barrido de potencial, se dice que el proceso redox es **reversible**. La Figura 19 ilustra la respuesta de un par redox reversible durante un ciclo simple de barrido de potencial. En primera instancia, el voltaje se sitúa en un valor de potencial inicial negativo donde no tiene lugar ningún proceso de electrólisis y, por tanto, no existe flujo de corriente faradaica.

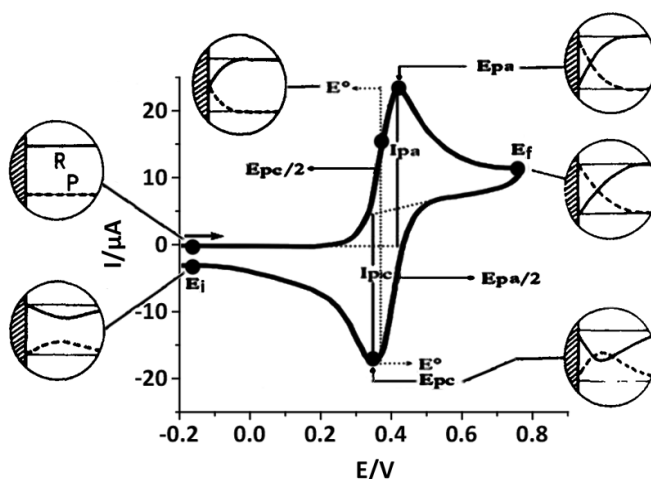


Figura 19. Voltagrama cíclico reversible. Perfiles de concentración de la especie reducida y oxidada en las proximidades del ECV.

Si se supone que inicialmente sólo está presente la forma reducida de la especie que hay en disolución, a medida que se realiza para la primera mitad del ciclo un barrido de potencial positivo, la corriente anódica comienza a incrementarse hasta alcanzar el potencial de pico anódico ($E_{p,a}$), donde la especie electroactiva es instantáneamente oxidada al entrar en contacto con

la superficie del ECV. Una vez superada la región de potencial en la cual se lleva a cabo el proceso oxidativo, al menos en $90/n$ mV (siendo n el número de electrones implicados en la oxidación) y, mientras que la corriente disminuye paulatinamente como consecuencia del agotamiento de la concentración del analito cerca de la superficie del electrodo, se invierte la dirección del barrido de potencial. Durante el barrido inverso, las moléculas oxidadas acumuladas cerca de la superficie del electrodo son nuevamente reducidas a un valor de potencial denominado potencial de pico catódico, $E_{p,c}$, originando un pico de vuelta en el voltograma cíclico característico.

Para un sistema reversible, la corriente de pico (a 25 °C) viene definida por la ecuación de Randles-Sevcik:

$$i_p = 2.69 \cdot 10^5 n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad [17]$$

donde n es el número de electrones transferidos, A el área de la superficie del electrodo (cm^2), C la concentración de la especie electroactiva ($\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$), D el coeficiente de difusión ($\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$) y v la velocidad de barrido de la especie electroactiva ($\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$).

La corriente de pico es directamente proporcional a la concentración y decrece con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. La razón existente entre las corrientes de los picos anódico y catódico, $i_{p,a}/i_{p,c}$, en un proceso redox reversible es la unidad. En cuanto al potencial de pico, la deducción de su ecuación está estrechamente relacionada con el potencial de semipico ($E_{p/2}$). Sus ecuaciones responden a las siguientes expresiones (en mV a 25 °C):

$$E_p = E_{1/2} - \frac{28.5}{n} \quad ; \quad E_{p/2} = E_{1/2} + \frac{28.0}{n} \quad ; \quad |E_p - E_{p/2}| = \frac{56.5}{n} \quad [18]$$

En determinadas ocasiones, el pico resulta demasiado ancho, complicando en exceso determinar el E_p , por lo que es más conveniente anotar el $E_{p/2}$, a pesar de carecer de significado termodinámico. Una estimación del valor del potencial de onda media es el correspondiente a un valor de corriente del 85.17% de I_p . Finalmente, el potencial formal (E^0) para un conjunto reversible se ubica en una posición centrada entre los valores del $E_{p,a}$ y $E_{p,c}$:

$$E^0 = \frac{E_{p,a} + E_{p,c}}{2} \quad [19]$$

A diferencia de la intensidad de corriente, el E_p es independiente de la velocidad de barrido, lo que permite diferenciar los sistemas reversibles de los irreversibles al presentar una dependencia lineal con la velocidad de barrido, únicamente, para los sistemas irreversibles.

Si se analizan con detenimiento los procesos redox **cuasi-irreversibles** en los que tiene lugar un intercambio lento de los electrones implicados en el proceso, se observa una reducción considerable del valor de los potenciales de pico, relacionado intrínsecamente con una mayor separación de los valores esperados, según la ecuación del proceso reversible a bajas velocidades de barrido:

$$\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c} \approx \frac{0.059}{n} \text{ (mV)} \quad [20]$$

En los sistemas con transferencia de carga **irreversible** es posible no presenciar el pico asociado al barrido inverso del potencial, o bien, observar que la separación entre ellos resulta muy superior a los sistemas anteriores. La resolución de las ecuaciones que modelan este comportamiento debe realizarse numéricamente, gracias a las aportaciones realizadas por Nicholson y Shain^[257], por el análisis mediante programas de ajuste, a Reinmuth,^[258] que trabajó mediante desarrollos en serie y a Matsuda y Ayabe,^[259] que lo hizo de forma semianalítica; de esta forma, se obtuvieron las respectivas ecuaciones del potencial e intensidad de pico. Estos sistemas, como se ha comentado recientemente, se caracterizan por un cambio en el potencial de pico con la velocidad de barrido:

$$E_p = E^0 - \frac{RT}{\alpha n_a F} \left[0.78 - \ln \frac{k^0}{D^{1/2}} + \ln \left(\frac{\alpha n_a F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad [21]$$

donde α es el coeficiente de transferencia y n_a el número de electrones involucrado en el proceso de transferencia electrónica de la reacción anódica, k^0 la constante de velocidad estándar y E^0 el potencial estándar. Así, el E_p ocurre a un potencial más alto que el E^0 , con el sobrepotencial de activación relacionado con la constante heterogénea de velocidad k^0 y con α . Independiente del valor de k^0 , cada desplazamiento de pico puede ser compensado por un cambio apropiado en la velocidad de barrido. El E_p y $E_{p/2}$ (a 25 °C) difieren en un valor, en mV, definido según la ecuación [22].

$$\left| E_p - E_{p/2} \right| = \frac{47.7}{\alpha n_a} \quad [22]$$

Por consiguiente, el voltagrama se vuelve más alargado a medida que $\alpha \cdot n_a$ decrece.

La corriente de pico viene definida por la ecuación:

$$i_p = 2.99 \cdot 10^5 n (\alpha n_a)^{1/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad [23]$$

De la misma manera que ocurre en el proceso reversible, la i_p permanece proporcional a la concentración de AO; sin embargo, su intensidad será menor dependiendo, en gran medida, del valor de α .

Un voltagrama cíclico es función del cociente $k^0/(\pi a D)^{1/2}$, donde $a = nFv/RT$. Se deduce que, a velocidades de barrido elevadas, se obtienen valores pequeños de dicho cociente asociado con un comportamiento irreversible, exhibiendo un comportamiento reversible en la situación opuesta. La irreversibilidad del voltagrama cíclico correspondiente al proceso anódico es indicativa de una buena actividad antioxidante.^[247]

Como cualquier técnica analítica, la VC tiene una serie de desventajas asociadas a su uso, entre las que se encuentra el hecho de que no todos los AO llevan a cabo el proceso de donación electrónica al ECV generalmente utilizado. Una limitación adicional es que requiere que el AO sea inactivo en el rango de potencial donde ocurre la reducción del O_2 en las condiciones experimentales utilizadas.^[260]

3.4.2.2. VOLTAMETRÍA DE PULSO DIFERENCIAL

Las técnicas voltamétricas de pulso fueron ideadas con el propósito fundamental de corregir los problemas e inconvenientes derivados de la polarografía de corriente continua (dc). En este contexto, la polarografía de pulso diferencial fue la primera en desarrollarse, venciendo, gracias a ella, las deficiencias asociadas al uso del electrodo de gota de mercurio (EGM). La aplicación de pulsos de potencial supuso maximizar los registros de intensidades gracias a las mediciones en el instante final del proceso de la vida de la gota, lográndose, además, minimizar la corriente no faradaica. Tales avances consiguieron disminuir considerablemente los límites de detección, así como obtener una mejora sustancial en la representación de los resultados.^[261]

Las mejoras adquiridas no eran exclusivas del EGM, sino que podían ser

aplicables a electrodos sólidos y a electrodos de película de Hg. Surge, de esta forma, la técnica voltametría de pulso diferencial (VPD) que consiste en aplicar un pulso de potencial constante (ΔE_p) de duración t_p (s) al final de cada escalón de altura ΔE_s de una escalera de potencial definida y con una duración T (s). El hecho de aplicar una escalera de potencial, como alternativa viable de la rampa de potencial, se debe a la irrupción de la instrumentación digital en los experimentos electroquímicos, ya que con ella no es posible generar una rampa ideal de potencial y, en consecuencia, se opta por realizar una aproximación a ella, generando series de pequeños pasos de potencial. Dicha aproximación tiene la ventaja de aportar mejoras considerables gracias a que el muestreo de intensidad de corriente se realiza al final de cada paso o escalón, cuando ha desaparecido la corriente no faradaica, por tanto, sólo debería existir corriente faradaica. Se registran los valores de intensidad de corriente en dos puntos: justo antes de aplicar el pulso de potencial (S_1) y justo al final de éste (S_2), tal y como se observa en la Figura 20:

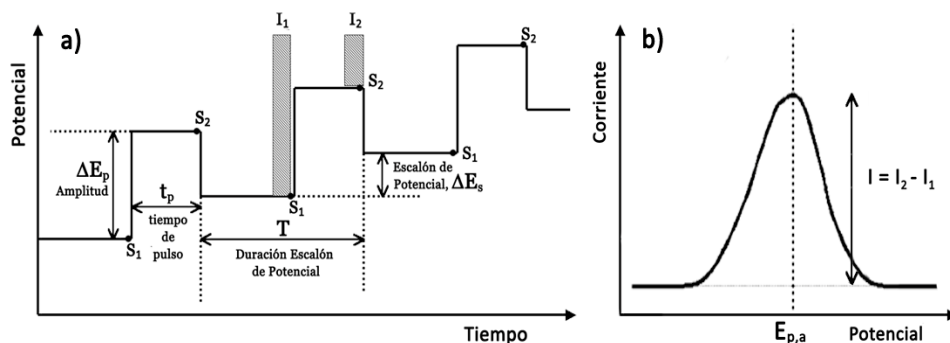


Figura 20. Señal de excitación y voltograma característico en VPD.

Los voltagramas PD están constituidos por picos, por lo que resulta fácil su interpretación y se obtiene, de forma relativamente sencilla, información a nivel cualitativo y cuantitativo de compuestos aislados y de mezclas. Cuando se persiguen fines analíticos, la amplitud del pulso debe incrementarse hasta los 100 mV, por encima de dicho valor se generan intensidades de corriente mayores; sin embargo, conlleva una pérdida de resolución y un aumento de la corriente de carga. Valores cercanos al límite establecido consiguen un buen compromiso entre tales efectos^[261] y proporcionan una elevada sensibilidad, que alcanza límites de detección del orden de 10^{-7} - 10^{-8} mol·L⁻¹.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Halliwell, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.* **1991**, 91, 145-225.
2. Gilbert, D.L. Fifty years of radical ideas. *Ann. N.Y. Academ. Sci.* **2000**, 899, 1-14.
3. Halliwell, B. The chemistry of free radicals. *Toxicol. Ind. Health.* **1993**, 9, 1-21.
4. Marquina, E. Teoría de orbitales y oxígeno molecular: estructura electrónica del átomo de oxígeno y de las moléculas de oxígeno diatómicas. Ed. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados.; Valencia. **2000**.
5. Cañizo, A.; Eyler, G.; Morales, G.; Cerna, J. Diethyl ketone triperoxide: thermal decomposition reaction in chlorobenzene solution and its application as initiator of polymerization. *J. Phys. Org. Chem.* **2004**, 17, 215-220.
6. Mitjavila, M.T.; López, D.; Sáiz, M.P. Los radicales libres y su implicación en procesos fisiológicos y patológicos. *NCP Documenta.* **2001**, 258, 5-11.
7. Boots, A.W.; Haenen, G.R.; Bast, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eu J. Pharmacol.* **2008**, 585, 325-337.
8. Harman, D. Free radicals in aging. *Mol. Cell. Biochem.* **1988**, 84, 155-161.
9. Gupta, S.C.; Hevia, D.; Patchva, S.; Park, B.; Koh, W.; Aggarwal, B.B. Upsides and downsides of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid. Redox. Signal.* **2012**, 16, 1295-1322.
10. Halliwell, B.; Gutterbridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. En: *Free radicals in biology and Medicine*, 4th edn; Clarendon Press, Oxford, **2007**.
11. Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol.* **2006**, 160, 1-40.
12. Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* **2006**, 141, 312-322.

13. Kohen, R.; Nyska, A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* **2002**, 30, 620-650.
14. Chandel, N.S.; Budinger, G.R. The cellular basis for diverse responses to oxygen. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, 42, 165-174.
15. Guzy, R.D.; Schumacker, P.T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol.* **2006**, 91, 807-819.
16. Lewis, G.N. The magnetochemical theory. *Chem. Rev.* **1924**, 1, 231-248.
17. Turrens, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* **2003**, 552, 335-344.
18. Adam-Vizi, V.; Chinopoulos, C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, 27, 639-645.
19. Murphy, M.P. How mitochondria produce oxygen species. *Biochem. J.* **2009**, 417, 1-13.
20. Davies, K.J.A. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* **1995**, 61, 1-31.
21. Fernández, J.M.; Da Silva-Grigoletto, M.E.; Túnez-Fiñana, I. Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. *Rev. Andal. Med. Deporte.* **2009**, 2, 19-34.
22. Zhang, M.; Shah, A.M. Reactive oxygen species in heart failure. En: *Acute heart failure, cap. 12*, Ed. Springer, London. **2008**.
23. Zigler, J.S.; Goosey, J.D. Photosensitized oxidation in the ocular lens: evidence for photosensitizers endogenous to the human lens. *Photochem. Photobiol.* **1981**, 33, 869-874.
24. Six, R.H.; Paschall, C.S. The phototoxic effect of benoxapofen and its analogs on human erythrocytes and rat peritoneal mast cells. *Photochem. Photobiol.* **1983**, 38, 411-415.

25. Bhandary, B.; Marahatta, A.; Kin, H.R.; Chae, H.J. An involvement of oxidative stress in endoplasmatic reticulum stress and its associated diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 434-456.
26. Behar, D.; Czaspski, G.; Rabami, J.; Dorfman, L.M.; Schwarz, H.A. The acid dissociation constant and decay kinetics of parthydroxyl radical. *J. Phys. Chem.* **1979**, *74*, 3209-3215.
27. Halliwell, B.R.; Wong, R.; Gutteridge, J.M.C. The biological significance of the Haber-Weiss reaction. Developments in biochemistry. En: *Biological and clinical aspects of superoxide and superoxide dismutase*, vol. 11B. Ed. Bannister, W.H and Bannister, J.V. New York. **1980**.
28. Korycka-Dahi, M.; Richardson, T. Initiation of oxidative changes in foods. Symposium: oxidative changes in milk. *J. Dairy. Sci.* **1981**, *63*, 1181-1208.
29. Halliwell, B.; Grootveld, M. The measurement of free radical reactions in humans. Some thoughts for future experimentation. *FEBS Lett.* **1987**, *213*, 9-14.
30. McCord, J.M. free radicals and heart disease. *Bibl. Nutr. Dieta.* **1989**, *43*, 327-337.
31. Ames, B.N.; Shigenaga, M.K.; Hagen, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 7915-7922.
32. Auten, R.L.; Davis, J.M. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatr. Res.* **2009**, *66*, 121-127.
33. Frei, B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am. J. Med.* **1994**, *97*, 55-135.
34. Liochev, S.I.; Fridovich, I. The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. *Free Radic. Biol. Chem.* **2007**, *42*, 1465-1469.
35. Fridovich, I.; Freeman, B. Antioxidant defenses in the lung. *Annu. Rev. Physiol.* **1986**, *48*, 693-702.
36. Das, T.K.; Wati, M.R.; Fatima-Shad, K. Oxidative stress gated by Fenton and Haber Weiss reactions and its association with Alzheimer's disease. *Arch. Neurosci.* **2014**, *2*, 1-8.

37. Liochev, S.I.; Fridovich, I. The role of $O_2^{\cdot -}$ in the production of $\cdot OH$: in vitro and in vivo. *Free Rad. Biol. Med.* **1994**, 16, 29-33.
38. Sastre, J.; Pallardó, F.V.; García de la Asunción, J.; Viña, J. Mitochondrial, oxidative stress and aging. *Free Radic. Res.* **2000**, 32, 189-198.
39. Dix, T.A.; Aikens, J. Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, 6, 2-18.
40. Yu, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* **1994**, 74, 139-162.
41. Termini, J. Peroxyl and alkoxyl radical mediated DNA damage. En: *Reviews of Oxidative Stress and Aging; vol. 2*, chapter 3. **2002**, 39-53.
42. Circu, M.L.; Aw, T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, 48, 749-762.
43. Facchinetti, F.; Dawson, V.L.; Dawson, T.M. Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cell. Mol. Neurobiol.* **1998**, 18, 667-682.
44. Bailly, C.; Ei-Maarouf-Bouteau, H.; Corbineau, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C. R. Biol.* **2008**, 331, 806-814.
45. Rahman, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Inter. Aging.* **2007**, 2, 219-236.
46. Closa, D.; Folch-Puy, E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life.* **2004**, 56, 185-191.
47. Weinberg, F.; Hamanaka, R.; Wheaton, W.W.; Weinberg, S.; Joseph, J.; Lopez, M.; Kalyanaraman, B.; Multu, G.M.; Budinger, G.R.S.; Chandel, N.S. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, 107, 8788-8793.
48. Pham-Huy, L.A.; He, H.; Pham-Huy, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* **2008**, 4, 89-96.
49. Pryor, W.A. Biological effects of cigarette smoke, wood smoke, and the smoke from plastics: the use of electron spin resonance. *Free Radic. Biol. Med.* **1992**, 13, 659-676.

50. Doroshow, J.H.; Davies, K.J. Comparative cardiac oxygen radical metabolism by anthracycline antibiotics, mitoxantrone, bisantrene, 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide and neocarzinostatin. *Biochem. Pharmacol.* **1983**, 32, 2935-2939.
51. Von Sonntag, C. Radiation chemistry in the 1990s: pressing questions relating to the areas of radiation biology and environmental research. *Int. J. Radiat. Biol.* **1994**, 65, 19-26.
52. Reyrfeldt, A.; Bannenberg, G.; Moldeus, P. Free radicals and lung disease. *Br. Med. Bull.* **1993**, 49, 588-603.
53. Gruber, J.; Schaffer, S.; Halliwell, B. The mitochondrial free radical theory of ageing-where do we stand? *Front Biosci.* **2008**, 13, 6554-6579.
54. Jauniaux, E.; Burton, G.J. Oxygen delivery at deciduoplacental interface. En: *Placental Bed Disorders, section 8*, Ed. Cambridge University Press. **2010**.
55. Tiidus, P.M.; Pushkarenko, J.; Houston, M.E. Lack of antioxidant adaptation to short-term aerobic training in human muscle. *Am. J. Physiol.* **1996**, 271, 832-836.
56. Starkov, A.A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2008**, 1147, 37-52.
57. Han, D.; Antunes, F.; Canali, R.; Rettori, D. Cadenas, E. Voltage dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 5557-5563.
58. Gomes, E.C.; Silva, A.N.; de Oliveira, M.R. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, 2012, 1-12.
59. Hampton, M.B.; Orrenius, S. Redox regulation of apoptotic cell death in the immune system. *Toxicol Lett.* **1998**, 102-103, 355-358.
60. Fehrenbach, E.; Northoff, H. Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc. Immunol. Rev.* **2001**, 7, 66-89.
61. Winterbourn, C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, 4, 278-286.

62. Birben, E.; Sahiner, U.M.; Sackesen, C.; Erzurum, S. Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* **2012**, 5, 9-19.
63. Gomez-Cabrera, M.C.; Martinez, A.; Santangelo, G.; Pallardo, F.V.; Sastre, J.; Vina, J. Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br. J. Nutr.* **2006**, 96, 31-33.
64. Perez, V.I.; Bokov, A.; Van Remmen, H.; Mele, J.; Ran, Q.; Ikeno, Y.; Richardson, A. Is the oxidative stress theory of aging dead?. *Biochim. Biophys. Acta.* **2009**, 1790, 1005-1014.
65. Salmon, A.B.; Richardson, A.; Perez, V.I. Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging?. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, 48, 642-655.
66. Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, 35, 1147-1150.
67. Barzilai, A.; Yamamoto, K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair.* **2004**, 3, 1109-1115.
68. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2007**, 39, 44-84.
69. Kell, D.B. Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the etiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Med. Genomics.* **2009**, 2, (Art. 2).
70. Chauhan, V.; Chauhan, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiol.* **2006**, 13, 195-208.
71. Tretter, L.; Sipos, I.; Adam-Vizi, V. Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochem. Res.* **2004**, 29, 569-577.
72. Iborra, M.; Moret, I.; Rausell, F.; Bastida, G.; Aguas, M.; Cerrillo, E.; Nos, P.; Beltrán, B. Role of oxidative stress and antioxidant enzymes in Crohn's disease. *Biochem. Soc. Trans.* **2011**, 39, 1102-1106.
73. Giacco, F.; Brownlee, M. Oxidative stress and diabetes complications. *Circ. Res.* **2010**, 107, 1058-1070.

74. Dhalla, N.S.; Temsah, R.M.; Netticada, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens.* **2000**, *18*, 665-673.
75. Singh, U.; Jialal, I. Oxidative stress and atherosclerosis. *J. Phathophysiol.* **2006**, *13*, 129-142.
76. Hitchon, C.A.; El-Gabalawy, S. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2004**, *6*, 265-278.
77. Suzuki, H.; Nishizawa, T.; Tsugawa, H.; Mogami, S.; Hibi, T. Roles of oxidative stress in stomach disorders. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2012**, *50*, 35-39.
78. Saugstad, O.D. Broncopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidant. *Semin. Neonatol.* **2003**, *8*, 39-49.
79. Kregel, K.C.; Zhang, H.J. An integral view of oxidative stress in aging: basic mechanisms functional effects, and pathological considerations. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp.* **2007**, *292*, 18-36.
80. Agustín, V.T.; Yoryana, V. Relaciones del estrés oxidativo con el catabolismo de proteínas. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* **2000**, *19*, 206-212.
81. Sohal, R.S. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33*, 37-44.
82. Levine, R.L.; Stadtman, E.R. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp. Gerontol.* **2001**, *36*, 1495-1502.
83. Levine, R.L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *32*, 790-796.
84. Stadtman, E.R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.* **1990**, *9*, 315-325.
85. Stadtman, E.R. Biochemical markers of aging. *Exp. Gerontol.* **1988**, *23*, 327-347.
86. Stadtman, E.R.; Starke-Reed, P.E.; Oliver, C.N.; Carney, J.M.; Floyd, R.A. Protein modification in aging. *Exs.* **1992**, *62*, 64-72.
87. Halliwell, B.; Chirico, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **1993**, *57*, 715-725.

88. Montine, T.J.; Neely, M.D.; Quinn, J.F.; Beal, M.F.; Markesbery, W.R.; Roberts, L.J.; Morrow, J.D. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, 33, 620-626.
89. Davi, G.; Falco, A.; Patrono, C. Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxid. Redox Signal.* **2005**, 7, 256-268.
90. López-Jaén, A.B.; Codoñer-Franch, P.; Valls-Bellés, V. Free radicals: a review. *J. Pediatr. Biochem.* **2013**, 3, 115-121.
91. Dizdaroglu, M.; Jaruga, P.; Birincioglu, M.; Rodríguez, H. free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, 32, 1102-1115.
92. Ballinger, S.W.; Houten, B.V.; Conklin, C.A.; Jin, G.F.; Godley, b.F. Hydrogen peroxide causes significant mitochondrial DNA damage in human RPE cells. *Exp. Eye Res.* **1999**, 68, 765-772.
93. Roche, E.; Romero-Alvira, D. Changes in DNA induced by oxidative stress. *Med. Clin.* **1996**, 106, 144-153.
94. Kasai, H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat. Res.* **1997**, 387, 147-163.
95. Vassilyev, D.G.; Morikawa, K. DNA-repair enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 103-109.
96. Fukui, H.; Moraes, C.T. Mechanisms of formation and accumulation of mitochondrial DNA deletions in aging neurons. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, 18, 1028-1036.
97. Perez, V.I.; Lew, C.M.; Cortez, L.A.; Webb, C.R.; Rodriguez, M. Liu, Y.; Qi, W.; Li, Y.; Chaudhuri, A.; Van Remmen, H.; et al. Thioredoxin 2 haploinsufficiency in mice results in impaired mitochondrial function and increased oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, 44, 882-892.
98. Sacher, G.A. Evolutionary theory in gerontology. *Perspect. Biol. Med.* **1982**, 25, 339-353.
99. Brack, C.; Lithgow, G.; Osiewacz, H.; Toussaint, O. Molecular cellular gerontology. *EMBO. J.* **2000**, 19, 1929-1934.

100. Medvedev, Z. An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol. Rev.* **1990**, 65, 375-398.
101. Orgel, L. The maintenance of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1963**, 49, 517-521.
102. Hayflick, L. The limited in vitro life span of human diploid cell strains. *Exp. Cell. Res.* **1965**, 37, 614-636.
103. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **1956**, 11, 298-300.
104. Gerschman, R. Man's dependence on the earthly atmosphere. En: *Proc. 1st symp. Submarine and space medicine*. Schaeffer, K.S. Ed. McMillan, New York. **1962**, 475.
105. Harman, D. Ageing Overview. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2001**, 928, 1-21.
106. Troen, B.R. The Biology of aging. *Mt. Sinai J. Med.* **2003**, 70, 3-22.
107. Vina, J.; Borras, C.; Miquel, J. Theories of ageing. *IUBMB Life.* **2007**, 59, 249-254.
108. Piedras-Jorge, C.; Meléndez, J.C.; Tomás, J.M. Beneficios del ejercicio físico en población mayor institucionalizada. *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.* **2010**, 45, 131-135.
109. Pearl, R. The rate of living. *University of London Press*. London, **1928**.
110. Rubner, M. Das problem der lebensdauer und seine beziehungen zu wachstum und ernahrung. *R. Oldenburg. Muenchen*. Germany, **1908**.
111. Cutler, R.G. Antioxidant, aging and longevity. En: *Free Radicals in Biology*, vol. 11, Ed. W. Pryor, **1984**.
112. Lopez-Torres, M.; Barja, G. Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary restriction. Possible implications for humans. *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**, 1780, 1337-1347.
113. Lambert, A.J.; Boysen, H.M.; Buckingham, J.A.; Yang, T.; Podlutzky, A.; Austad, S.N.; Kunz, T.H.; Buffenstein, R.; Brand, M.D. Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with

- long maximum lifespan in vertebrate homeotherms. *Aging Cell.* **2007**, 6, 607-618.
114. Robert, K.A.; Brunet-Rossinni, A.; Bronikowski, A.M. Testing the “free radical theory of aging” hypothesis: physiological differences in long-live and short-lived colubrid snakes. *Aging Cell.* **2007**, 6, 395-404.
115. Dai, D.F.; Santana, L.F.; Vermulst, M.; Tomazela, D.M.; Emond, M.J.; MacCoss, M.J.; Gollahon, K.; Martin, G.M.; Loeb, L.A.; Ladiges, W.C.; Rabinovitch, P.S. Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. *Circulation.* **2009**, 119, 2789-2797.
116. Muller, F.L.; Lustgarten, M.S.; Jang, Y.; Richardson, A.; Van Remmen, H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, 43, 477-503.
117. Salmon, A.B.; Richardson, A.; Perez, V.I. Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging?. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, 48, 642-655.
118. Huang, T.T.; Carlson, E.J.; Gillespie, A.M.; Shi, Y.; Epstein, C.J. Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **2000**, 55, 5-9.
119. Howes, R.M. The free radical fantasy: a panoply of paradoxes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2006**, 1067, 22-26.
120. Bjelakovic, G.; Nikolova, D.; Gluud, L.L.; Simonetti, R.G.; Gluud, C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA.* **2007**, 297, 842-857.
121. Dorman, H.J.D.; Hiltunen, R. Fe(III) reductive and free radical scavenging properties of summer savory (*Satureja Hortensis L.*) extract and subfractions. *Food. Chem.* **2004**, 88, 193-199.
122. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. The definition and measurement in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, 18, 125-126.
123. Roginsky, V.; Barsukova, T.; Loshadkin, D.; Pliss, E. Substituted p-hydroquinone as inhibitors of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.* **2003**, 125, 49-58.

124. Cos, P.; Bruyne, T.D.; Hermans, N.; Apers, S.; Berghe, D.V.; Vlietinck, A.J. Proanthocyanidins in health Care: current and new trends. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *11*, 1345-1359.
125. Cadenas, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors.* **1997**, *6*, 391-397.
126. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841-1856.
127. Gutteridge, J.M.; Halliwell, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2000**, *899*, 136-144.
128. Mukhtar, H.; Ahmad, N. Green tea in chemoprevention of cancer. *Toxicol. Sci.* **1999**, *52*, 111-117.
129. Owuor, E.D.; Kong, A.T. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 760-770.
130. Charchar, M.; Sharma, N.; Joshi, Y.; Dobhal, M.P. Flavonoids: a versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn. Rev.* **2011**, *5*, 1-12.
131. Vita, J.A. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 292-297.
132. Arranz, S.; Chiva—Blanch, G.; Valderas-martinez, P.; Medina-Remón, A.; Lamuela, R.M.; Estruch, R. Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. *Nutrients.* **2012**, *4*, 759-781.
133. Barreto, G.E.; Guedes, R.C.A. Polyphenols and neurodegenerative diseases. *Nutr. Neurosci.* **2012**, *15*, 92-93.
134. Choi, D.Y.; Lee, Y.J.; Hong, J.T.; Lee, H.T. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* **2012**, *87*, 144-153.
135. Lambert, J.D.; Hong, J.; Yang, G.; Liao, J.; Yang, C.S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 284-291.

136. Rahman, I.; Bismas, S.K.; Kirkham, P.A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *72*, 1439-1452.
137. Yang, C.S.; Landau, J.M.; Huang, M-T.; Newmark, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* **2001**, *21*, 381-406.
138. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *79*, 727-747.
139. Robards, K.; Prentzler, P.D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* **1999**, *66*, 401-436.
140. Martínez-Valverde, I.; Periago, M.J.; Ros, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos en la dieta. *Arch. Latinoam. Nutr.* **2000**, *50*, 5-18.
141. Duthie, G.; Crozier, A. Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr. Opin. Lipidol.* **2000**, *11*, 43-47.
142. Harborne, J.B. En: *Methods in plant biochemistry*, vol. 1: Plant phenolic. Ed. Academic Press, London. **1989**.
143. Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **1998**, *56*, 317-333.
144. Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 965-1096.
145. Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2073-2085.
146. Cherng, J.; Chiang, W.; Chiang, L. Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of umbelliferae and its related coumarins and flavonoids. *Food Chem.* **2008**, *106*, 944-950.
147. Ho, S.; Tang, Y.; Lin, S.; Liew, Y. Evaluation of peroxynitritescavenging capacities of several commonly used fresh spices. *Food Chem.* **2010**, *119*, 1102-1107.

148. Ringman, J. M.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M.; Masterman, D. L.; Cummings, J. L. Potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer's Res.* **2005**, *2*, 131-136.
149. Dragland, S.; Senoo, H.; Wake, K.; Holte K.; Blomhoff, R. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 1286-1290.
150. Yanishlieva, N.V.; Marinova, E.; Pokorný, J. Natural antioxidants from herbs and spices. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2006**, *108*, 776-793.
151. Viuda_Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Fernández-López, J.; Pérez-Álvarez, J.A. Chemical composition of the essential oils obtained from some spices widely used in Mediterranean region. *Acta Chim. Slov.* **2007**, *54*, 921-926.
152. Braga, M.E.M.; Leal, P.F.; Carvalh, J.E.; Meireles, M.A.A. Comparison of yield, composition, and antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa L.*) extracts obtained using various techniques. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6604-6611.
153. Smallfield, B.M.; Van Kink, J.M.; Perry, N.B.; Dodds, K.G. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 118-123.
154. Tomaino, A.; Cimino, F.; Zimbalatti, V.; Venuti, V.; Sulfaro, V.; De Pasquale, A.; Saija, A. Influence of heating on antioxidant activity and chemical composition of some spice essential oils. *Food Chem.* **2005**, *89*, 549-554.
155. Unlu, M.; Ergene, E.; Unlu, G.V.; Zeytinoglu, H.S.; Vural, N. Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomun zeylanicum* Blume (*Lauraceae*). *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 3274-3280.
156. Marongiu, B.; Piras, A.; Porcedda, S.; Tuveri, E.; Sanjst, E.; Meli, M.; Sollai, F.; Zucca, P.; Rescigno, A. Supercritical CO₂ extract of *Cinnamomun zeylanicum*: Chemical characterization and antityrosinase activity. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10022-10027.
157. Singh, G.; Marimuthu, P.; De Heluani, C.S.; Catalan, C. Antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Myristica fragrans* Houtt. (Aril Part). *J. Food Sci.* **2005**, *70*, 141-148.

158. Singh, G.; Marimuthu, P.; De Heluani, C.S.; Catalan, C. Identification of compounds in the essential oil of nutmeg seeds (*Myristica fragrans* Hoult.) that inhibit locomotor activity in mice. *J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 4771-4781.
159. Zachariah, T.J.; Leela, N.K.; Maya, K.M.; Rema, J.; Mathew, P.A.; Vipin, T.M.; Krishnamoorthy, B. Chemical composition of leaf oils of *Myristica beddomeii* (King), *Myristica fragrans* (Hoult.) and *Myristica malabarica* (Lamk.). *J. Spices Aromatic Crops.* **2008**, *17*, 10-15.
160. Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Stoilova, I.; Stoyanova, A.; Krastanov, A.; Schmidt, E. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6303-6307.
161. Omidbeygi, M.; Barzegar, M.; Hamidi, Z.; Naghdibadi, H. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control.* **2007**, *18*, 1518-1523.
162. Giordani, R.; Regli, P.; Kaloustian, J.; Miakaïl, C.; Abou, L.; Portugal, H. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of Amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytother. Res.* **2004**, *18*, 990-995.
163. Chorianopoulos, N.; Kalpoutzakis, E.; Aligiannis, N.; Mitaku, S.; Nychas, G.J.; Haroutounian, S.A. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 8261-8267.
164. Sivropoulou, A.; Papanikolaou, E.; Nikolaou, C.; Kokkini, S.; Lanaras, T.; Arsenakis, M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1202-1205.
165. Peñalver, P.; Huerta, B.; Borge, C.; Astorga, R.; Romero, R.; Perea, A. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. *APMIS.* **2005**, *113*, 1-6.
166. Rota, M.C.; Herrera, A.; Martínez, R.M.; Sotomayor, J.A.; Jordán, M.J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control.* **2008**, *19*, 681-687.

167. Cooper, R. Green tea and theanine: health benefits. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2011**, 63, 90-97.
168. Higdon, J.V.; Frei, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant function. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2003**, 43, 89-143.
169. Sharma, V.K.; Bhattacharya, A.; Kumar, A.; Sharma, H.K. Health benefits of tea consumption. *Trop. J. Pharm.* **2007**, 6, 785-792.
170. Frei, B.; Higdon, J.V. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J. Nutr.* **2003**, 133, 3275-3284.
171. Rietveld, A.; Wiseman, S. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *J. Nutr.* **2003**, 133, 3285-3292.
172. Chan, E.W.C.; Soh, E.Y.; Tie, P.P.; Law, Y.P. Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacognosy Res.* **2011**, 34, 266-272.
173. Zhang, L.Z.; Wang, D.L.; Chen, W.X.; Tan, X.D.; Wang, P.C. Impact of fermentation degree on the antioxidant activity of pu-erh tea in vitro. *J. Food Biochem.* **2012**, 36, 262-267.
174. Zuo, Y.; Chen, H.; Deng, Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta.* **2002**, 57, 307-316.
175. Wheeler, D.S.; Wheeler, W.J. The medicinal chemistry of tea. *Drug Develop. Res.* **2004**, 61, 45-65.
176. Cabrera, C.; Giménez, R.; López, M.C. Determination of tea components with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 4427-4435.
177. Peterson, J.; Dwyer, J.; Bhagmat, S.; Haytowitz, D.; Holden, J.; Eldridge, A.L.; Beecher, G.; Aladesanmi, J. Major flavonoids in dry tea. *J. Food Comp. Anal.* **2005**, 18, 487-501.
178. Tea, flavonoids and cardiovascular health. *Unilever.* **2011**.
179. Yashin, A.; Yashin, Y.; Nemzer, B. Determination of antioxidant activity in tea extracts, and their total antioxidant content. *Am. J. Biomed. Sci.* **2011**, 3, 322-335.

180. Horžić, D.; Komes, D.; Belščak, A.; Ganić, K.K.; Iveković, D.; Karlović, D. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chem.* **2009**, 115, 441-448.
181. Xu, J.Z.; Yeung, S.Y.V.; Chang, Q.; Huang, Y.; Chen, Z.Y. Comparison of antioxidant activity and bioavailability of tea epicatechins with their epimers. *Br. J. Nutr.* **2004**, 91, 873-881.
182. Rice-Evans, C.A.; Miller, J.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trend. Plant. Sci.* **1997**, 2, 152-159.
183. Łuczaj, W.; Skrzydlewska, E. Antioxidative properties of black tea. *Preven. Med.* **2005**, 40, 910-918.
184. Lin, L.Z.; Chen, P.; Harnly, J.M. New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 8130-8140.
185. Chen, H.; Shurlknight, K.; Leung, T.; Sang, S. Structural identification of theaflavin trigallate and tetragallate from black tea using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 10850-10857.
186. Sang, S.; Lambert, J.D.; Ho, C.T.; Yang, C.S. The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacol. Res.* **2011**, 64, 87-99.
187. Drynan, J.W.; Clifford, M.N.; Obuchowicz, J.; Kuhnert, N. The chemistry of low molecular weight black tea polyphenols. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 417-462.
188. Haslam, E. Thoughts on thearubigins. *Phytochem.* **2003**, 64, 61-73.
189. Dong, W.M.; Tan, C.; Gong, J.S. Structural identification of components I and II from Pu-er tea theabrownins. *Food Sci.* **2013**, 34, 32-35.
190. Yoshino, K.; Suzuki, M.; Sasaki, K.; Miyase, T.; Sano, M. Formation of antioxidants from (-)-epigallocatechin gallate in mild alkaline fluids, such as authentic intestinal juice and mouse plasma. *J. Nutr. Biochem.* **1999**, 10, 223-229.

-
191. Ku, K.M.; Choi, J.N.; Kim, J.; Kim, J.K.; Yoo, L.G.; Lee, S.J.; Hong, Y.S.; Lee, C.H. Metabolomics analysis reveals the compositional differences of shade grown tea (*Camellia sinensis* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 418-426.
192. Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. Phenolic compounds in plant and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **2006**, *99*, 191-203.
193. Duthie, G.G.; Gardner, P.T.; Kyle, J.A.M. Plant polyphenols: are they the new magic bullet?. *Proc. Nutr. Soc.* **2003**, *62*, 599-603.
194. Pannala, A.S.; Chan, T.S.; Brien P.; Rice-Evans, C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast-reaction kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **2001**, *282*, 1161-1168.
195. Lorenz, P.; Zeh, M.; Martens-Lobenhoffer, J.; Schmidt, H.; Wolf, G. Natural and newly synthesized hydroxyl-1-aryl-isochromans: a class of potential antioxidants and radical scavengers. *Free Radic. Res.* **2005**, *39*, 535-545.
196. Rice-Evans C.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933-956.
197. Vertuani, S.; Angusti, A.; Manfredini, S. The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 1677-1694.
198. Fusco, D.; Colloca, G.; Monaco, M.R.L.; Cesari, M. Effects of antioxidant supplementation of aging process. *Clin. Interv. Aging.* **2007**, *2*, 377-387.
199. Prior, R.L.; Cao, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, *27*, 1173-1181.
200. Akhnazarova, S.; Kafarov, V. Experiment optimization in chemistry and chemical engineering. *Mir Publisher.* Moscow and Chicago. **1982**, 312 pp.
201. Prior, R.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290-4302.
202. Niki, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Rad. Biol. Med.* **2010**, *49*, 503-515.

203. Karadag, A.; ozcelik, B.; Saner, S. review of methods to determinate antioxidant capacities. *Food Anal. Meth.* **2009**, 2, 41-60.
204. Siquet, C.; Paiva-Martins, F.; Lima, J.L.F.C.; Reis, S.; Borges, F. Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids-. A structure-activity relationship study. *Free Rad. Res.* **2006**, 40, 433-442.
205. Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Int. Res.* **2006**, 39, 791-800.
206. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, 239, 70-76.
207. Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 3396-3402.
208. Apak, R.; Güçlü, K.; Ozyürek, M.; Karademir, S.E. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 7970-7981.
209. GülÇin, I. measurement of antioxidant ability of metionin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as Trolox equivalent. *J. Enzym. Inh. Med. Chem.* **2008**, 23, 871-876.
210. Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 4619-4626.
211. Serafini, M.; Laranjinha, J.A.; Almeida, L.M.; Maiani, G. Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *J. Nutr. Biochem.* **2000**, 11, 585-589.
212. Magalhaes, L.M.; Segundo, M.A.; reis, S.; Lima, J.L.F.C. methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta.* **2008**, 613, 1-19.

213. Ordoudi, S.A.; Tsimidou, M.Z. Crocin Bleaching assay (CBA) in structure-radical scavenging activity of selected phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9347-9356.
214. Rael, L.T.; Thomas, G.W.; Craun, M.L.; Curtis, C.G.; Bar-Or, R.; Bar-Or, D. Lipid peroxidation and thiobarbituric acid assay: standardization of the assay when using saturated and unsaturated fatty acids. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *37*, 749-752.
215. Hodges, D.M.; Delong, J.M.; Forney, C.F.; Prange, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta.* **1999**, *207*, 604-611.
216. Winston, G.W.; Regoli, F.; Dugas, A.J.; Fong, J.H.; Blanchard, K.A. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Rad. Biol. Med.* **1998**, *24*, 480-493.
217. MacLean, D.D.; Murr, P.; DeEll, J.R. A modified total oxyradical scavenging capacity assay for antioxidants in plant tissues. *Postharvest Biol. Technol.* **2003**, *29*, 183-194.
218. Handelman, G.J.; Cao, G.; Walter, M.F.; Nightingale, Z.D.; Paul, G.L.; Prior, R.L. Antioxidant capacity of oat (*Avena Sativa L.*) extracts. 1 Inhibition of low-density-lipoprotein oxidation and oxygen radical absorbance capacity. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4888-4893.
219. Hurtado, I.; Caldú, P.; Gonzalo, A.; Ramón, J.M.; Mínguez, S.; Fiol, C. Antioxidative Capacity of Wine on Human LDL Oxidation *in vitro*: Effect of Skin Contact in Winemaking of White Wine. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1283-1289.
220. Sanchez-Moreno, C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Tech. Int.* **2002**, *8*, 121-137.
221. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.; Aruoma, O.I. The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* **1987**, *15*, 215-219.

222. Fridovich, I. The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense. *Science*. **1978**, 201, 875-880.
223. Valentão, P.; Fernandes, E.; Carvalho, F.; Andrade, P.B.; Seabra, R.M.; Bastos, M.L. Antioxidant activity of *centaurium erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xantine oxidase inhibitory activity. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 3476-3479.
224. Owen, R.W.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem. Toxicol.* **2000**, 38, 647-659.
225. Trevisan, M.T.S.; Pfundstein, B.; Haubner, R.; Würtele, G.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H.; Owen, R.W. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, 44, 188-197.
226. Villaño, D.; Fernández-Pachón, M.S.; Troncoso, A.M.; García-Parrilla, M.C. The antioxidant activity of wines determined by the ABTS^{•+} method: influence of sample dilution and time. *Talanta*. **2004**, 64, 601-609.
227. Miller, N.J.; Diplock, A.T.; Rice-Evans, C.; Davies, M.J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **1993**, 84, 407-412.
228. Re, R.; Pellegrini, N.; Preteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, 26, 121-137.
229. Pinelo, M.; Manzocco, L.; Núñez, M.J.; Nicoli, M.C. Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. *Food Chem.* **2004**, 88, 201-207.
230. Osman, A.M.; Wong, K.K.Y.; Fernyhough, A. ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 346, 321-329.
231. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. **1958**, 181, 1199-1200.

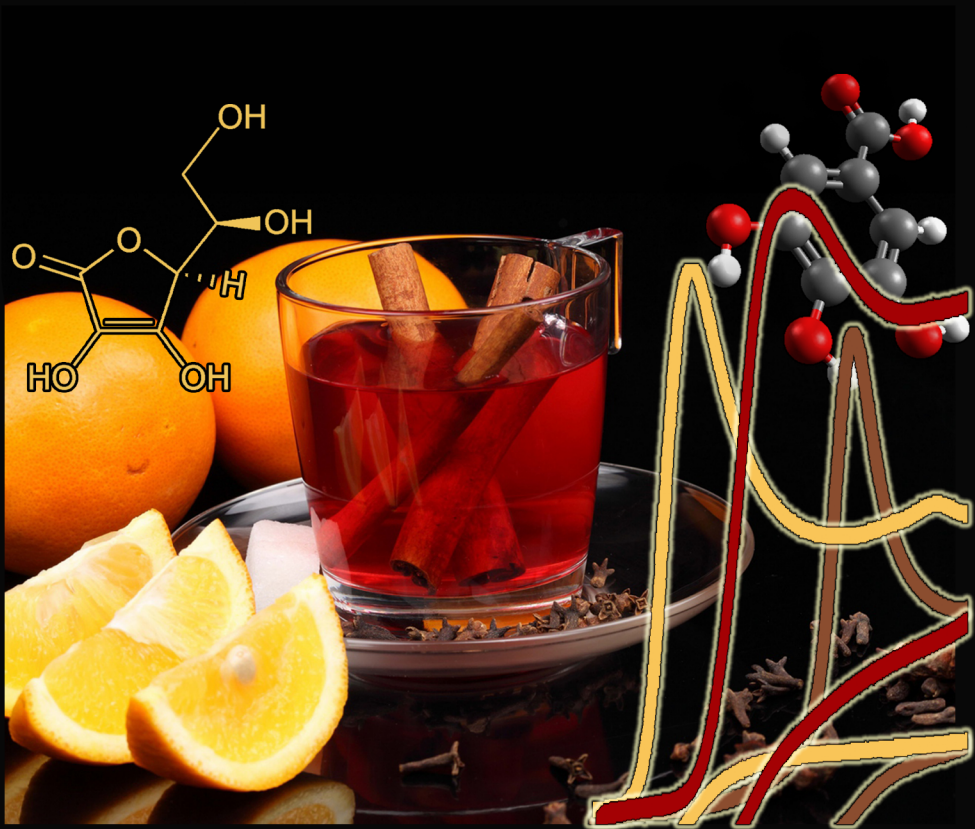
-
232. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25-30.
233. Foti, M.; Daquino, C.; Geraci, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solution. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2309-2314.
234. Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hidrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarín J. Sci. Technol.* **2004**, *26*, 211-219.
235. Alam, M.D.; Bristi, N.J.; Rafiquzzaman, M.D. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm. J.* **2012**, *21*, 143-152.
236. Zhuang, Q.K.; Scholz, F.; Pragst, F. The voltammetric behavior of solid 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) microparticles. *Electrochem. Commun.* **1990**, *1*, 406-410.
237. Gizdavic-Nikolaidis, M.; Travas-Sejdic, J.; Bowmaker, G.A.; Cooney, R.P.; Kilmartin, P.A. Conducting polymers as free radical scavengers. *Synth. Metals.* **2004**, *140*, 225-232.
238. Rapoport, R.; Hanukoglu, I.; Sklan, D.A. fluorimetric assay for hydrogen peroxide, suitable for NAD(P)H-dependent superoxide generating redox systems. *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 309-313.
239. Moure, A.; Dominguez, H.; Parajo, J.C. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochem.* **2006**, *41*, 447-456.
240. Guo, H.; Kouzuma, Y.; Yonekura, M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. *Food Chem.* **2009**, *113*, 238-245.
241. Suetsuna, K.; Ukeda, H.; Ochi, H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J. Nutr. Biochem.* **2000**, *11*, 128-131.
242. Ukeda, H.; Maeda, S.; Ishii, T.; Sawamura, M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-{1-[(phenylamino)-

- carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Anal. Biochem.* **1997**, 251, 206-209.
243. Arnao, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Technol.* **2000**, 11, 419-421.
244. Arteaga, J.F.; Ruiz-Montoya, M.; Palma, A.; Alonso-Garrido, G.; Pintado, S.; Rodríguez-Mellado, J.M. Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles. *Molecules.* **2012**, 17, 5126-5138.
245. Bondet, V.; Brand-Williams, W.; Berset, C. Kinetic and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH[•] free radical method. *LWT-Food Sci. Technol.* **1997**, 30, 609-615.
246. Barros, L.; Falcão, S.; Baptista, P.; Freire, C.; Vilas-Boas, M.; Ferreira, I.C.F.R. Antioxidant of agaricus sp. Mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chem.* **2008**, 111, 61-66.
247. Kilmartin, P.; Zou, H.; Waterhouse, A. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 1957-1965.
248. Ortíz, M.; Prenzler, P.D.; Patsalides, E.; McDonald, S.; Robards, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst.* **2002**, 127, 183-198.
249. Dorozhko, E.V.; Korotkova, E.I. Biologically active substances studied by voltammetric and spectrophotometric techniques. *Pharm. Chem. J.* **2011**, 44, 581-584.
250. Cosio, M.S. Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. *Food Chem.* **2006**, 97, 725-731.
251. Ortíz, M.E.; Núñez-Vergara, L.J.; Camargo C.; Squella, J.A. Oxidation of Hantzsch 1,4-dihydropyridines of pharmacological significance by electrogenerated superoxide. *Pharm. Res.* **2004**, 21, 428-435.

-
252. Bollo, S.; Jara-Ulloa, P.; Finger, S.; Núñez-Vergara, L.J.; Squella, J.A. Scanning electrochemical microscopy (SECM) study of superoxide generation and its reactivity with 1,4-dihydropyridines. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, 577, 235-242.
253. Korotkova, E.I.; Karbainov, Y.A.; Shevchuk, A. Study of antioxidant properties by voltammetry. *J. Electroanal. Chem.* **2002**, 518, 56-60.
254. Firuzi, O. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic. *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, 1721, 174-184.
255. Kilmartin, P.A.; Zou, H.; Waterhouse, A.L. Correlation of wine phenolic composition versus cyclic voltammetric response. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, 53, 294-302.
256. Bortolomeazzi, R.; Sebastianutto, N.; Toniolo, R.; Pizzariello, A. Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chem.* **2007**, 100, 1481-1489.
257. Nicholson, R.S.; Shain, I. Theory of stationary electrode polarography. Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. *Anal. Chem.* **1964**, 36, 706-723.
258. Reinmuth, W.H. Nernst-controlled currents in hanging-drop polarography. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 6358-6370.
259. Matsuda, H.; Ayabe, Y.Z. Theorie der Randles-Sevcik-schen kathodenstrahl-polarographie. *Z. Elektrochem.* **1955**, 59, 494-503.
260. Maltos, D.A.F.; Cortés, J.S.; urdiales, B.V.; González, C.N.A. Uso de técnicas electroquímicas para evaluar el poder antioxidante en alimentos. *Investigación y ciencia.* **2010**, 18, 20-25.
261. Bard, A.J.; Faulkner, L.R. *Electrochemical methods. Fundamentals and applications.* 2nd Edition, Chapter 7. John Wiley & Sons, New York. **2001**.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS



1. OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral, englobada en el marco general del estudio de los antioxidantes naturales, centraliza la investigación global en el enfoque práctico de la determinación de actividades antioxidantes en los extractos acuosos de especias, té e infusiones mediante el empleo de metodologías electroquímicas. Consta de un objetivo principal preestablecido sobre el que se desarrolla y evoluciona el resto del estudio, aunque, durante el transcurrir de la experimentación, han ido emergiendo nuevos objetivos de carácter específico que otorgan una mayor entidad final al proyecto.

1.1. OBJETIVO GENERAL

Dada la actual necesidad de establecer métodos analíticos válidos que puedan ser estandarizados como métodos rutinarios en la determinación de actividad antioxidante, se propone una alternativa prometedora en su evaluación fundamentada en técnicas electroquímicas: voltametría cíclica (VC) y voltametría de pulso diferencial (VPD). El objetivo general se desglosa, cronológicamente, en dos etapas fundamentales:

1.1.1. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ELECTROQUÍMICA VÁLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MUESTRAS ORGÁNICAS

La VC es una prueba extremadamente rápida que permite evaluar la capacidad reductora de antioxidantes puros bajo una gran variedad de condiciones experimentales: medio de reacción, pH, temperatura, etc. Un valor reducido del potencial de oxidación, $E_{p,a}$, registrado durante el proceso de oxido-reducción al que es sometido el antioxidante mediante un barrido cíclico de potencial, es indicativo de la facilidad del mismo para ceder un electrón y, por consiguiente, de su eficacia para actuar como antioxidante. No obstante, es incapaz de proporcionar información relevante acerca de la capacidad del antioxidante para interaccionar con radicales libres, lo que supone un hándicap importante que limita considerablemente su aplicación analítica.

Con el fin de solventar esta carencia de información, se apostó por el desarrollo de una metodología electroquímica alternativa basada en la VPD,

hecho que posibilita el estudio de la capacidad de neutralización de radicales de interés biológico implicados en el fenómeno del estrés oxidativo, el radical hidropéroxilo, HO_2^\bullet . Esta novedosa metodología está fundamentada en la formación de un complejo de mercurio, Hg^{2+} , con HO_2^- y HO^- , aniones generados durante el proceso electrooxidativo del H_2O_2 sobre un electrodo de gota de mercurio (EGM) en medio alcalino (pH 10.51). El análisis exhaustivo de la disminución del área de la onda voltamétrica característica del complejo, a medida que se adicionan concentraciones crecientes de antioxidante, permite determinar de manera rápida, reproducible y con elevada sensibilidad, la actividad antioxidante de compuestos naturales de bajo peso molecular presentes, como principios activos, en la composición química de ciertas especias y condimentos.

1.1.2. IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA ELECTROQUÍMICA DESARROLLADA EN MUESTRAS REALES: EXTRACTOS DE ESPECIAS, CONDIMENTOS, TÉS E INFUSIONES

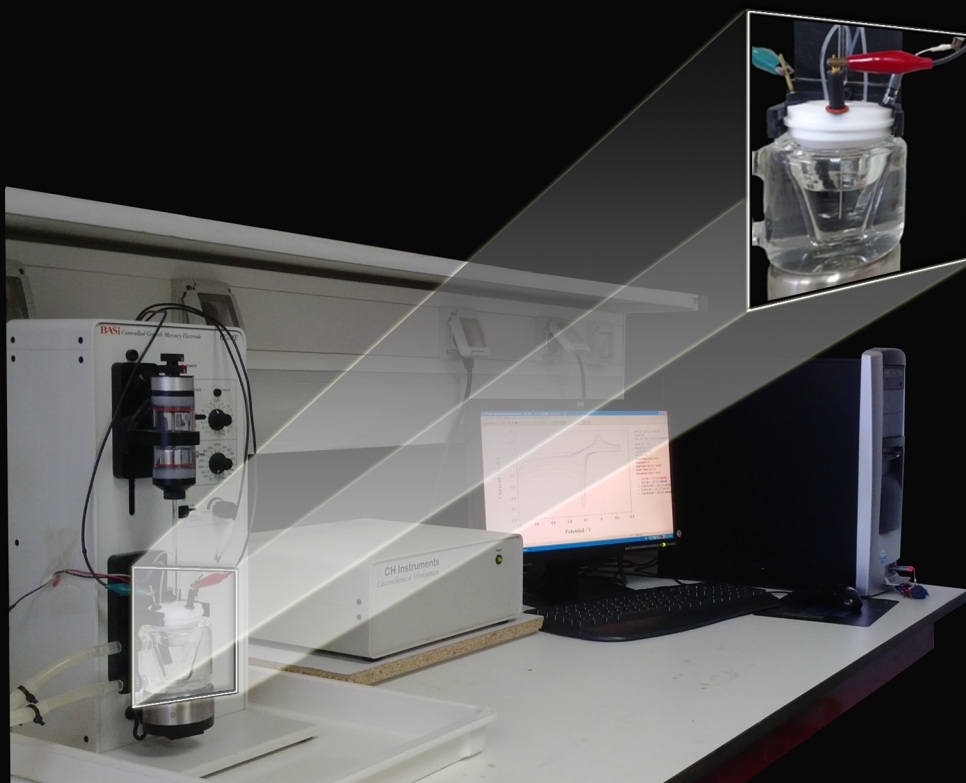
Conocidos los aspectos teóricos referentes al mecanismo asociado al proceso electrooxidativo del H_2O_2 sobre el EGM, así como el papel ejercido por la interacción del antioxidante sobre el radical HO_2^\bullet (generado durante la evolución del proceso anterior en la respuesta voltamétrica PD) y una vez optimizadas las condiciones experimentales de medida, se avanzó hacia el análisis de muestras de mayor complejidad en cuanto al número y variedad de estructuras químicas antioxidantes presentes en sus composiciones. Las muestras seleccionadas fueron extractos acuosos de clavo, nuez moscada, canela, tomillo y orégano, especias que contienen un elevado número de principios activos, estudiados de manera individualizada en la anterior etapa, ya presentaron propiedades antioxidantes significativas. Posteriormente, se incrementó la heterogeneidad del conjunto de muestras de análisis con una amplia variedad de téis e infusiones comerciales.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Análisis comparativo y establecimiento de correlaciones y tendencias a nivel de resultados entre las metodologías electroquímicas desarrolladas y una metodología espectrofotométrica de contraste, el ensayo de captura del radical DPPH[•], seleccionada por su sencillez experimental y por su bajo requerimiento instrumental.
2. Desarrollo de ecuaciones electroquímicas teóricas, asociadas al estudio del mecanismo del proceso de la oxidación anódica del H₂O₂ sobre el EGM, coherentes con los resultados experimentales obtenidos. Selección de parámetros adimensionales adecuados para la exposición final de los resultados de actividad antioxidante obtenidos mediante VPD.
3. Estudio de efectos sinérgicos y antagónicos en mezclas antioxidantes sintéticas (máximo de cuatro componentes), con diferentes grados de actividad mediante el desarrollo y ejecución de diseños experimentales. Evaluación de las contribuciones antioxidantes individuales sobre la respuesta antioxidante global de las mezclas analizadas.
4. Implementación de la técnica electroquímica alternativa desarrollada en la determinación de la actividad antioxidante de muestras reales.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS



1. MATERIALES

1.1. REACTIVOS QUÍMICOS

Los reactivos químicos utilizados en las distintas experiencias realizadas fueron de grado analítico Merck, con excepción del radical DPPH[•], de un 95% de pureza, adquirido de Sigma-Aldrich y se utilizaron sin purificación adicional. La conservación óptima de los mismos se realizó según las recomendaciones específicas descritas en los envases.

Los reactivos químicos han sido clasificados atendiendo a las metodologías donde se han utilizado durante la investigación:

1.1.1. METODOLOGÍA ELECTROQUÍMICA

1.1.1.1. VOLTAMETRÍA CÍCLICA (VC)

- Ácido acético, AcH.
- Ácido fosfórico, H₃PO₄.
- Etanol, EtOH.
- Cloruro de sodio, NaCl.
- Hidróxido de sodio, NaOH.

1.1.1.2. VOLTAMETRÍA DE PULSO DIFERENCIAL (VPD)

- Peróxido de Hidrógeno (30% v/v), H₂O₂.
- Carbonato sódico, Na₂CO₃.
- Ácido fosfórico, H₃PO₄.
- Nitrato de potasio, KNO₃.
- Etanol, EtOH.
- Hidróxido de sodio, NaOH.

1.1.2. METODOLOGÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA

1.1.2.1. ENSAYO DE CAPTURA DEL RADICAL DPPH[•]

- Radical 1, 1-difenil-2-picril-hidracilo, DPPH[•].
- Metanol, MeOH.

1.2. MUESTRAS DE ESTUDIO

Las muestras estudiadas se dividen en dos grupos diferenciados: un primer grupo constituido por una variedad de compuestos puros, con la característica común de ser principios activos de especias, condimentos o fármacos; y un segundo grupo de muestras de mayor complejidad en cuanto al número y diversidad de los compuestos antioxidantes que presentan. Este segundo grupo está formado, en su composición química, por una amplia colección de tés e infusiones comerciales, así como por extractos acuosos preparados a partir de especias y condimentos que albergan en su composición cantidades importantes de compuestos del primer grupo (Figura 1).

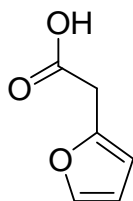
1.2.1. COMPUESTOS PUROS DE BAJO PESO MOLECULAR

Este primer grupo está constituido por 30 compuestos puros con estructuras químicas muy dispares, todos ellos pertenecientes a la familia de antioxidantes de bajo peso molecular. Sus estructuras químicas pueden englobarse, a su vez, en dos grupos bien diferenciados:

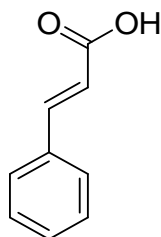
1. Estructuras aromáticas fenólicas y no fenólicas.
2. Estructuras no aromáticas cíclicas y acíclicas.

A continuación se expone un listado de los compuestos estudiados en la presente Tesis, así como sus procedencias comerciales y sus correspondientes estructuras químicas (Tabla 1):

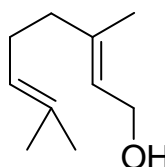
eugenol, sesamol, carvacrol, cinamaldehído, 4-hexilresorcinol, 3-hidroxycumarina, 2,4-dihidroxibenzaldehído, 2,5-dihidroxibenzaldehído, 4-metoxibencil alcohol, furfural, vainillina, ácido cinámico, ácido ascórbico, *p*-cloroanisol, geraniol, benzaldehído, pulegona, mentol, 1,4-cineol, ácido 2-furanoacético, mentona, benzaldehído, 3,5-dimetoxibenzaldehído y salicilaldehído fueron adquiridos de Aldrich; timol, cumarina y limoneno de Sigma; el ácido gálico de Sigma-Aldrich y, finalmente, α,β -pineno, reactivos de grado analítico de Merck.



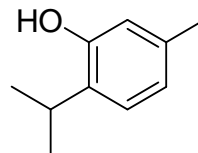
ácido 2- furanoacético
(FN)



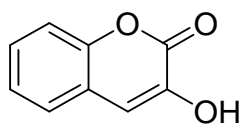
ácido cinámico
(CA)



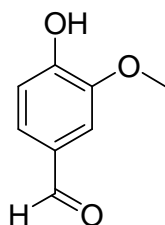
geraniol
(GE)



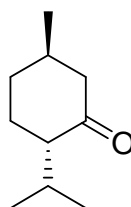
timol
(TH)



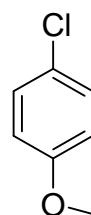
3-hidroxicumarina
(HC)



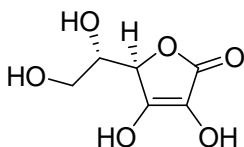
vainillina
(VA)



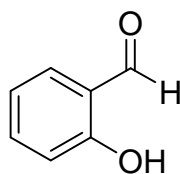
mentona
(MT')



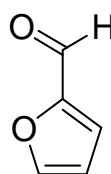
p-cloroanisol
(CL)



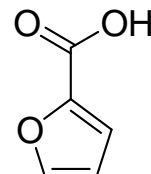
ácido ascórbico
(AA)



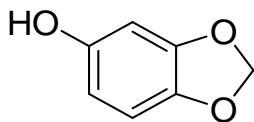
salicilaldehído
(SA)



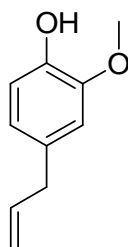
furfural
(FU)



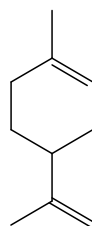
ácido furúico
(FA)



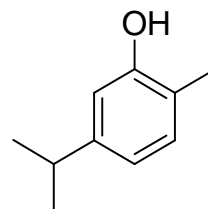
sesamol
(SE)



eugenol
(EU)



limoneno
(LI)



carvacrol
(CC)

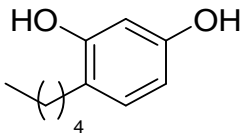
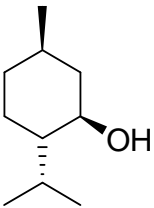
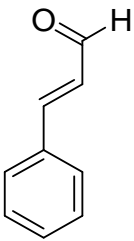
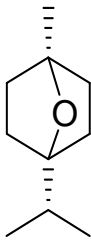
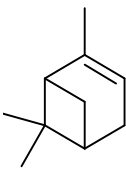
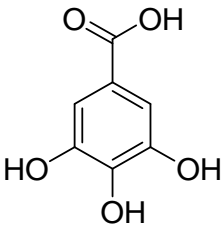
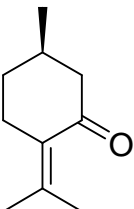
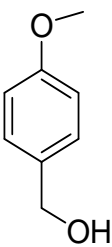
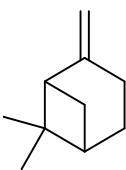
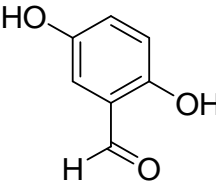
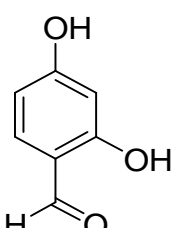
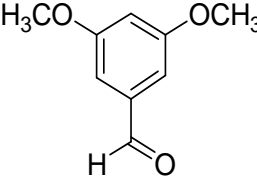
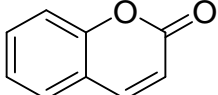
				
4-hexilresorcinol (HR)	mentol (MT)	cinamaldehído (CI)	1,4-cineol (CN)	α -pineno (α-PI)
		4-metoxibenzil 		
ácido gálico (GA)	pulegona (PU)	alcohol (4-MA)	benzaldehído (BZ)	β -pineno (β-PI)
				
2,5-dihidroxi- benzaldehído (2,5-BZ)	2,4-dihidroxi- benzaldehído (2,4-BZ)	3,5-dimetoxi- benzaldehído (3,5-BZ)	cumarina (CU)	

Tabla 1. Estructuras químicas de los compuestos de bajo peso molecular objetos de estudio.

1.2.2. TÉS E INFUSIONES DE ESPECIAS Y CONDIMENTOS

Este segundo grupo presenta mayor complejidad debido a que las distintas muestras presentan un elevado número de moléculas antioxidantes, por lo que resulta, extremadamente complejo, cuantificar de manera individualizada la contribución de cada componente. Se determinó la actividad antioxidante global de un total de 13 muestras, entre las que se engloban diferentes variedades de té e infusiones comerciales:

Té verde, té rojo, té “antioxidante” (mezcla de té blanco (35%), té verde (30%), té rojo (30%) y aroma de ciruela (5%)) e infusiones de menta poleo, salvia, manzanilla, tila, respir (mezcla de tomillo (25%), eucalipto (25%), romero(25%) y menta piperita (25%)) y rooibos (con aroma a ciruela, 5%), adquiridos en los supermercados Mercadona S.A. con marca Hacendado. Té blanco (con aroma a vainilla, 4%), té classic (té negro) e infusiones frutales de vainilla-ciruella, manzana-canela, adquiridos en Herboristerías de la marca Hornimans.

Adicionalmente, se prepararon cuatro extractos acuosos a partir de las especias canela, orégano, clavos de olor y nuez moscada, adquiridas en supermercados Mecardona S.A., marca Hacendado (fabricante: Jesús Navarro S.A., Alicante), consideradas las principales representantes del primer grupo de compuestos.



Figura 1. Especias, condimentos, tés e infusiones comerciales objetos de estudio.

1.3. INSTRUMENTAL DE ANÁLISIS

1.3.1. INSTRUMENTAL ELECTROQUÍMICO

Los datos electroquímicos recogidos en la presente Tesis se han obtenido a partir de las mediciones voltamétricas realizadas con un equipo electroquímico CHI650A de IJCambria. Los potenciales se midieron frente a un electrodo de referencia de $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{\text{sat}}$ (BASi MF-2052) y se utilizó también un electrodo auxiliar de platino (BASi MW-1034), constituyendo un sistema de tres electrodos junto con el correspondiente electrodo de trabajo, el cual difiere según la técnica electroquímica empleada. Las mediciones del potencial de oxidación ($E_{p,a}$) mediante VC se realizaron utilizando un electrodo de carbón vitrificado de IJCambria (área geométrica de 38.5 mm^2), cuya ventana útil de potencial es idónea para el estudio de oxidaciones, con una velocidad de barrido de $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. En lo referente al estudio mediante VPD, requirió acoplar al equipo un electrodo controlador de gota de mercurio EF-1400 de BASi (área de gota de $6.70\cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$) en el modo HMDE. Los parámetros seleccionados fueron los siguientes: amplitud de pulso 0.05 V , anchura de pulso 0.05 s y periodo de pulso de 0.2 s .

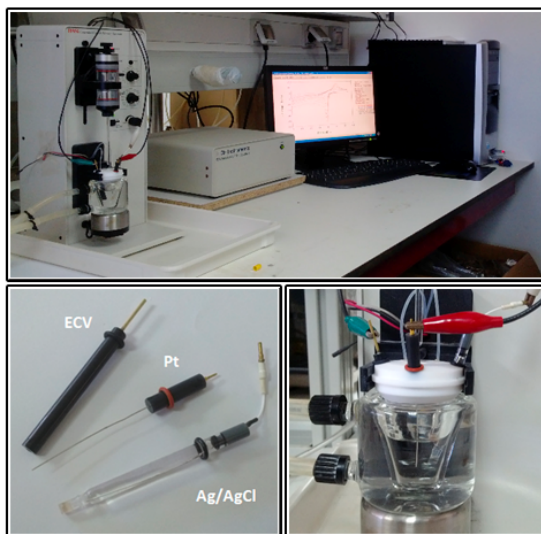


Figura 2. Equipo instrumental electroquímico CHI650A. Celda analítica con sistema de tres electrodos.

1.3.2. INSTRUMENTAL DE ESPECTROFOTOMETRÍA.

Las medidas de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro Genesys 10 uv de Thermo Electron Corporation. Se emplearon cubetas de cuarzo con paso óptico de 1.0 cm.



Figura 3. Espectrofotómetro Genesys 10 uv utilizado en el ensayo de captura del radical DPPH[•].

2. MÉTODOS.

2.1. METODOLOGÍA ELECTROQUÍMICA.

2.1.1. VOLTAMETRÍA CÍCLICA.

Existen discrepancias poco significativas en cuanto a la metodología empleada en función de la muestra analizada. Esta diferencia reside fundamentalmente en el medio de disolución de las muestras. Los compuestos puros presentan, en su gran mayoría, naturaleza orgánica, lo que imposibilita la disolución en medio acuoso de la cantidad necesaria que garantice el rango de concentraciones deseado; hecho que resulta factible para el resto de muestras: extractos de especias, té y infusiones.

2.1.1.1. COMPUESTOS PUROS

Se prepararon disoluciones de los distintos compuestos en etanol con una concentración de $5 \cdot 10^{-2}$ M y se almacenaron, posteriormente, en oscuridad y bajo una temperatura de 4°C para prevenir o evitar la descomposición de las mismas. La concentración empleada en un registro voltamétrico simple fue de $5 \cdot 10^{-4}$ M, con excepción de las experiencias correspondientes al estudio de la influencia de esta variable. Esto supone, por tanto, un 5% (v/v) de etanol en celda (volumen de 10 mL), ya que, como electrolito soporte, se empleó una disolución acuosa constituida por una mezcla de AcH/H₃PO₄ 0.1 M respectivamente, con un valor de fuerza iónica de 0.5 M ajustada con NaCl sólido. Dicha disolución resulta útil en el rango de pH de trabajo, entre 1.5 y 8.0 según la experiencia, ajustando en

cada caso con NaOH sólido. Para la preparación de la disolución acuosa se utilizó agua ultrapura tipo I (resistividad: $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$), obtenida a partir de un sistema de agua ultrapura Millipore® Simplicity. La disolución de compuesto antioxidante y el electrolito soporte, una vez en el interior de la celda electroquímica, fue purgada con nitrógeno purificado durante 5 min para proceder a la retirada del O_2 disuelto, manteniendo en todo momento constante la temperatura a $25 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$. Finalmente, se seleccionó en el equipo la ventana de potencial donde tendría lugar el proceso de oxido-reducción, además de la velocidad de barrido de potencial requerida, según la experiencia, y una sensibilidad adecuada para obtener los voltagramas cíclicos característicos de cada compuesto.

Es importante hacer hincapié en la importancia de la reproducibilidad de las señales en VC. Cuando se trabaja con el ECV es necesario realizar una etapa de pulido con polvo de alúmina (tamaño $0.3 \mu\text{m}$) entre sucesivos registros con el fin de asegurar la reproducibilidad de la señal (Figura 4). La reproducibilidad de las medidas se aseguró mediante la repetición por triplicado de cada experimento. Intervalo de confianza del $E_p < \pm 4 \text{ mV}$.

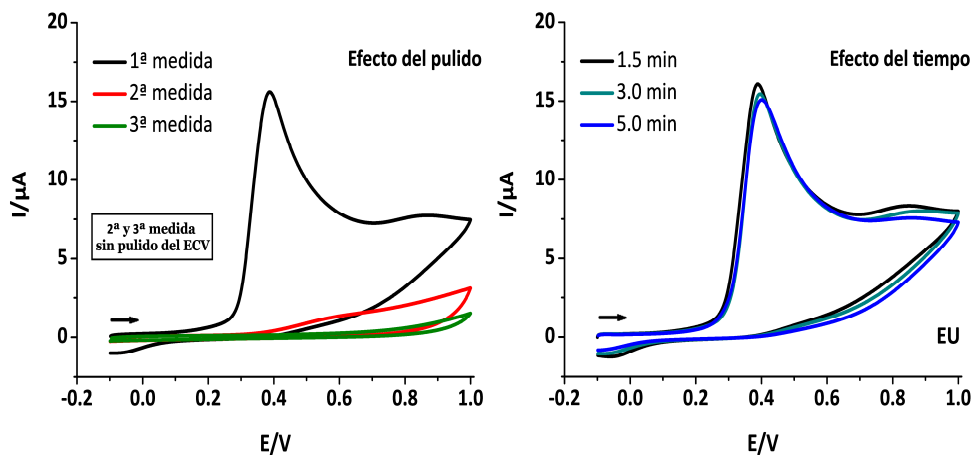


Figura 4. Efecto del pulido y tiempo de medición sobre la respuesta voltamétrica en ECV. 10^{-3} M EU , $\text{pH} = 7.0$ y $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

2.1.1.2. EXTRACTOS ACUOSOS DE ESPECIAS, TÉS E INFUSIONES

Este tipo de muestras presenta una gran complejidad debido al elevado número y diversidad de los compuestos antioxidantes que presentan. A este hecho se une el desconocimiento de la composición cuantitativa de las mismas, lo que hace imposible conocer la concentración de antioxidantes analizada. Se establece como protocolo para la medida el empleo de 250 mg de muestra. La cantidad pesada es extraída en medio acuoso (100 mL) a 95 °C durante 5 minutos, empleando para la medida un volumen de 1 mL del extracto acuoso, previamente filtrado y dejado enfriar a temperatura ambiente. El volumen final de la celda electroquímica (10 mL) se completó con la disolución de electrolito soporte (ES).

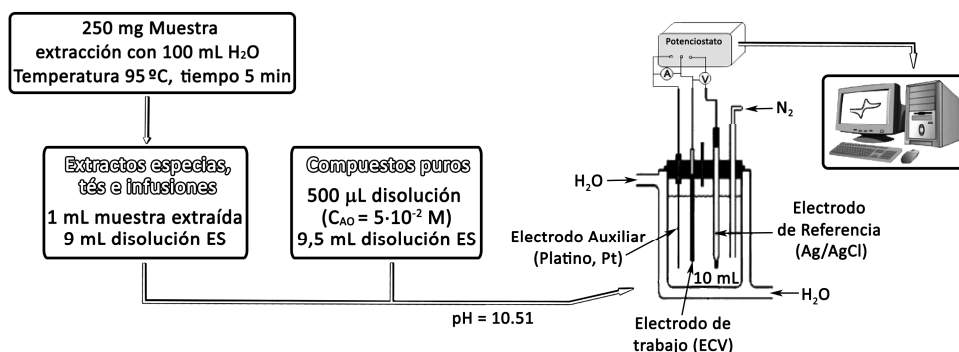


Figura 5. Procedimiento experimental para la determinación de la actividad antioxidante de compuestos puros y extractos acuosos de especias, té e infusiones mediante VC.

2.1.2. VOLTAMETRÍA DE PULSO DIFERENCIAL

2.1.2.1. COMPUESTOS PUROS

Las disoluciones de los antioxidantes en etanol se prepararon a concentraciones de 1, 3 y 5 mM y fueron almacenadas en oscuridad, a una temperatura de 4 °C para prevenir o evitar la descomposición de las mismas. Como consecuencia del efecto de la cantidad de etanol presente en celda sobre el área de pico VPD registrado, las disoluciones a analizar se prepararon con un volumen fijo (6.9 mL) de electrolito soporte (NaCO₃/H₃PO₄ 0.1 M respectivamente, I = 0.5 M KNO₃ y pH 10.51), 100 µL de una disolución de H₂O₂ de concentración 5 · 10⁻² M y volúmenes variables (V_{AO}) de las disoluciones de antioxidantes, completando el

volumen final de 10 mL de la celda electroquímica con $(3 - V_{AO})$ mL de etanol puro, con el objetivo de establecer siempre un 30% (v/v) de etanol en cada medida. Por consiguiente, se requiere preparar disoluciones independientes para cada una de las concentraciones de AO evaluadas, en lugar de realizar adiciones graduales del mismo sobre una misma disolución inicial. La adición del peróxido de hidrógeno se realiza una vez purgada la disolución de análisis durante 5 minutos con N_2 purificado.

La reproducibilidad de las medidas se aseguró mediante la repetición por triplicado de cada experimento. Intervalo de confianza de $\pm 1\%$ del valor promedio para los distintos parámetros de actividad antioxidante determinados por VPD.

2.1.2.2. EXTRACTOS ACUOSOS DE ESPECIAS, TÉS E INFUSIONES

Los extractos acuosos de especias, té e infusiones, a diferencia de los compuestos antioxidantes puros, no requieren el empleo de etanol. La preparación del extracto acuoso para la medida de la actividad antioxidante mediante VPD es idéntica a la descrita para la VC (Punto 2.1.1.2). Sin embargo, la elevada sensibilidad de esta técnica requiere la dilución de la muestra final de 5 a 10 veces en función de la actividad antioxidante presentada por la muestra. Así pues, la determinación de la actividad antioxidante se realiza sobre una disolución que contenga el volumen del extracto acuoso diluido que se pretende analizar, además, se completa el volumen de la celda electroquímica con la disolución de electrolito soporte y se adiciona finalmente 100 μL de una disolución de H_2O_2 $5 \cdot 10^{-2}$ M, una vez eliminado, previamente, el oxígeno disuelto mediante burbujeo de N_2 purificado.

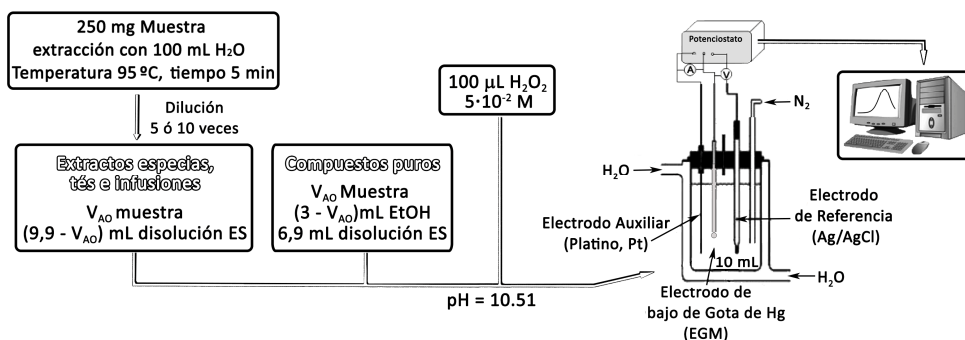


Figura 6. Procedimiento experimental para la determinación de la actividad antioxidante de compuestos puros y extractos acuosos de especias, té e infusiones mediante VPD.

2.2. METODOLOGÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA

La rápida tendencia a la degradación por efectos de la luz y la temperatura que presenta el radical DPPH[•] en disolución, requiere una preparación diaria de la disolución en medio metanólico de concentración $2 \cdot 10^{-2}$ M, del mismo modo que se hace necesario realizar una continua calibración de la misma (Figura 7).

El modelo lineal es el modelo más utilizado en calibración analítica, en gran medida debido a su simplicidad y a ser el soporte teórico en multitud de aplicaciones analíticas, como sucede para el ensayo de captura radical DPPH[•], fundamentado en la Ley de Lambert-Beer. La calibración lineal consiste en encontrar la recta de mejor ajuste a una serie de puntos experimentales definidos por una variable independiente, la concentración, y por una variable dependiente de la respuesta instrumental, la absorbancia (Abs). La ecuación de dicha recta nos permite extrapolar resultados de concentración a partir de valores de absorbancia registrados durante la medición, así como disponer con certeza del valor de absorbancia correspondiente a una concentración establecida, utilizada como patrón inicial en los ensayos de actividad de captura radical. La concentración de patrón DPPH[•] utilizada es de 0.06 mM.

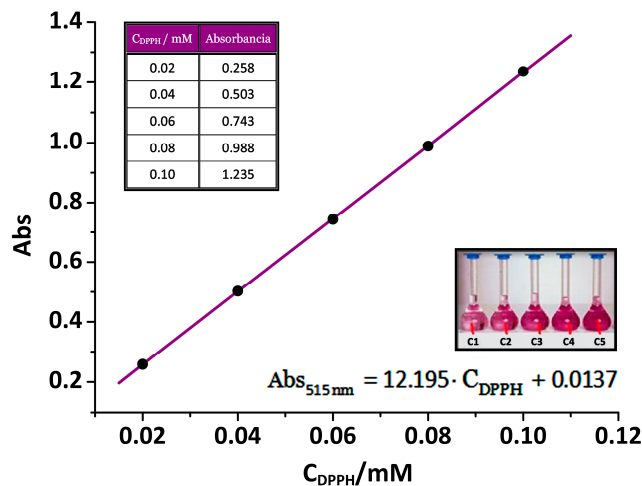


Figura 7. Calibración lineal del radical DPPH[•].

Una diferencia experimental considerable respecto a las metodologías electroquímicas descritas es que el ensayo DPPH• no difiere en función de la muestra a analizar, sino que el procedimiento de análisis es el mismo, tanto para los compuestos puros como para extractos de especias, té e infusiones. En el caso particular de los extractos, té e infusiones, al igual que ocurría con la VC y a diferencia de la VPD, no se requiere una dilución previa al análisis.

Una vez calibrada la disolución patrón del radical, se prepara un amplio número de disoluciones con concentración fija de DPPH• (0.06 mM) y distintas concentraciones de AO, registrando, para cada una de ellas, la disminución con el tiempo del valor de la absorbancia medida a 515 nm, para determinar así sus distintos valores en sus respectivos estados estacionarios. De manera gráfica, se obtiene el resultado de la concentración efectiva, EC₅₀, definido como la relación entre los moles de AO y los moles de DPPH• a la que la concentración de radical restante en el estado estacionario alcanza el 50%. Por razones de claridad, es preferible hablar en términos de 1/EC₅₀ o poder antirradical (ARP), directamente relacionado con la actividad antioxidante. Valores altos de ARP son indicativos de eficiencias antioxidantes elevadas.

La reproducibilidad de las medidas se aseguró mediante la repetición por triplicado de cada experimento. Intervalo de confianza de ±0.5% del valor promedio de ARP.

CAPÍTULO IV

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PRINCIPIOS ACTIVOS PRESENTES EN ESPECIAS Y CONDIMENTOS MEDIANTE VC COMO METODOLOGÍA ALTERNATIVA Y COMPLEMENTARIA AL ENSAYO DE CAPTURA DEL RADICAL DPPH'



1. INTRODUCCIÓN

La tendencia actual en la alimentación se proyecta hacia una constante búsqueda y consumo de productos saludables, donde los productos naturales con alto nivel antioxidante adquieren un papel protagonista.

Las especias y condimentos se consideran indispensables en el arte culinario. Su contenido en sustancias aromáticas, sápidas o excitantes comunica caracteres agradables al paladar y al olfato, aderezando o mejorando el aroma y/o sabor de muchos alimentos con un nulo o escaso aporte nutricional, siendo adicionalmente reconocidas por sus propiedades fisiológicas y medicinales y su amplio espectro de eficacia.^[1-3] Recientemente, se han identificado como importantes fuentes dietarias de diferentes fitoquímicos, donde una extenso porcentaje posee actividad antioxidante,^[4,5] entre ellos, los compuestos fenólicos de bajo peso molecular estudiados en este trabajo. La determinación de la actividad antioxidante de compuestos puros resulta imprescindible para predecir el potencial antioxidante *in vitro* de los mismos previo a su ingesta; sin embargo, dicho propósito resulta muy complejo.

El presente capítulo presenta el estudio comparativo entre una metodología espectrofotométrica, comúnmente utilizada en la actualidad, basada en la captura del radical DPPH[•] y un procedimiento electroquímico empleado recientemente como herramienta alternativa, viable y complementaria, la voltametría cíclica. Esta metodología electroquímica determina, de manera específica, la capacidad reductora de un determinado compuesto, la cual está directamente relacionada con su actividad antioxidante, además de presentar una serie de ventajas añadidas tales como la sencillez, rapidez y el bajo coste analítico requerido.^[6] La aceptable correlación establecida entre los resultados obtenidos por ambas metodologías para una familia de antioxidantes puros de bajo peso molecular con estructuras dispares, todos ellos principios activos de especias, condimentos o fármacos, supone un paso importante en la creencia sobre una futura implementación de metodologías electroquímicas novedosas para la determinación efectiva de la actividad antioxidante de muestras reales.

2. EXPERIMENTAL

2.1. VOLTAMETRÍA CÍCLICA

2.1.1. CONDICIONES ÓPTIMAS DE MEDIDA

El registro característico de la intensidad de corriente con el barrido de potencial obtenido mediante VC está significativamente influenciado por varios parámetros como son la concentración de la especie electroactiva (antioxidante), el pH, la velocidad de barrido y la temperatura. Este hecho genera la posibilidad de que puedan presentarse pequeñas discrepancias en cuanto a los resultados de los $E_{p,a}$ obtenidos respecto a los descritos en bibliografía,^[7,8] simplemente, como consecuencia de mínimos cambios en las condiciones experimentales en que han sido registrados los voltagramas en uno u otro caso.

Con el fin de obtener las condiciones óptimas para la realización de las medidas electroquímicas, se han diseñado tres experiencias individuales consistentes en el estudio de la influencia de la variación de uno de los parámetros (concentración de antioxidante, pH y velocidad de barrido), fijándose el resto con valores preestablecidos, sobre la respuesta voltamétrica global para el conjunto de antioxidantes puros de bajo peso molecular recogidos en Capítulo III (Punto 1.2.1). La temperatura se mantuvo constante durante todas las experiencias a un valor de 25 ± 0.1 °C.

2.1.1.1. ESTUDIO CON LA CONCENTRACIÓN

El rango de concentraciones de antioxidante seleccionado, acorde a la sensibilidad que ofrece la VC, está comprendido entre 10^{-4} y 10^{-3} M. Los valores de pH se ajustaron a 3.0 y 7.0 y se emplearon velocidades de barrido de 0.05, 0.1 y $0.5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Se analizaron las relaciones entre el $E_{p,a}$ y el $\log C_{AO}$, así como entre la $I_{p,a}$ y la concentración (Figura 1) para aquellos compuestos que ofrecieron respuesta anódica (Figuras 2 y 3).

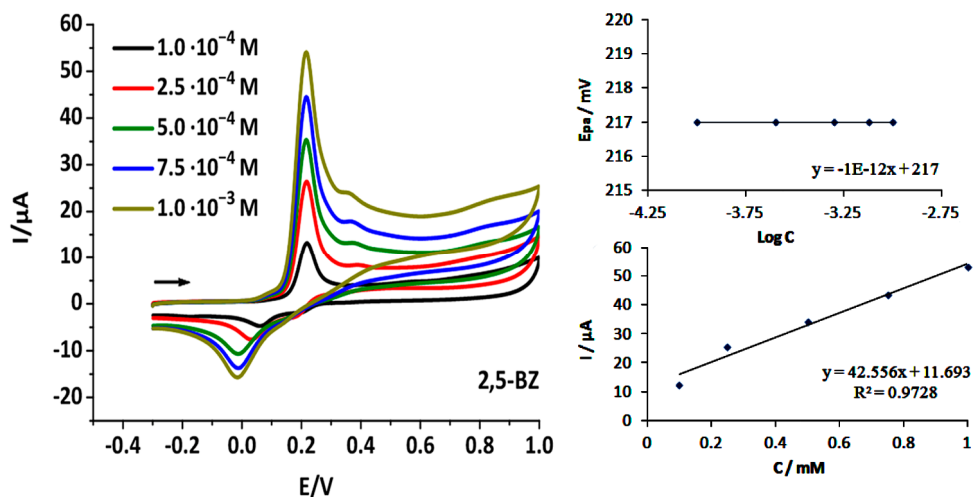


Figura 1. Influencia de la concentración sobre 2,5-BZ. Análisis de $E_{p,a}$ e $I_{p,a}$ frente al $\log C_{AO}$ y la C_{AO} , respectivamente.
 $\text{pH} = 7.0$ y $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

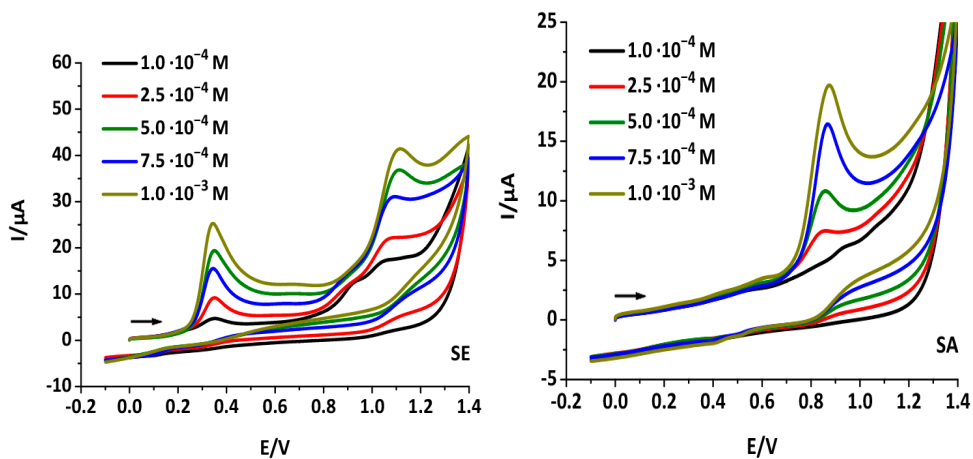


Figura 2. Influencia de la concentración sobre SE y SA.
 $\text{pH} = 7.0$ y $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

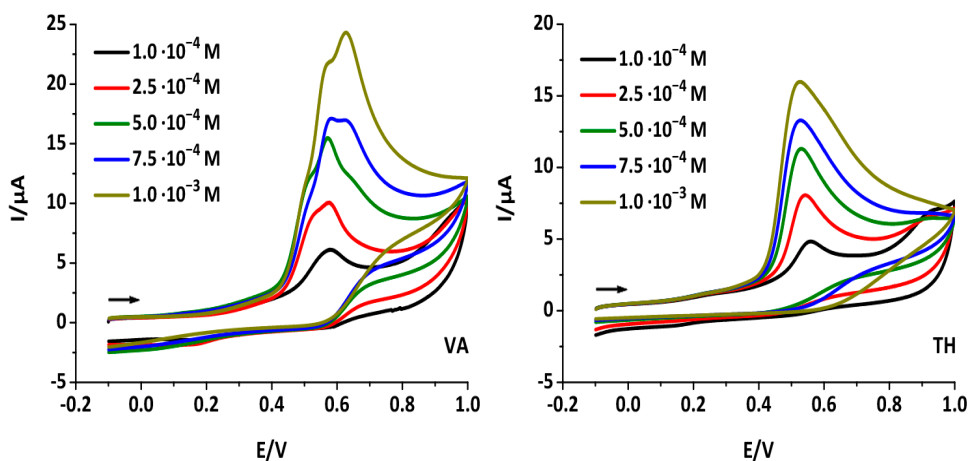


Figura 3. Influencia de la concentración sobre VA y TH.

pH = 7.0 y $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

Las intensidades de pico son directamente proporcionales a la concentración de antioxidante. Una concentración elevada implica una mayor precisión; sin embargo, también lleva asociada una mayor corriente de carga o corriente capacitativa. Interesa minimizar el valor de esta corriente, ya que enmascara la corriente de interés debida a la reacción redox en el electrodo, la corriente faradaica.

El aumento de concentración de antioxidante lleva consigo un desplazamiento del valor del $E_{p,a}$ hacia valores más positivos o negativos (Tabla 1).

Parámetros	2,5-BZ	GA	SE	EU	HR	TH
$E_{p,a}/\text{mV}$ [a]	202	274	343	411	453	529
$E_{p,c}/\text{mV}$ [a]	-11	—	—	71	—	—
$\Delta E/\text{mV}$ [a]	213	—	—	340	—	—
$I_{p,a}/\mu\text{A}$ [a]	35.55	16.23	15.37	11.94	15.34	11.34
$I_{p,c}/\mu\text{A}$ [a]	11.25	—	—	2.18	—	—
$E_{p/2}/\text{mV}$ [a]	163.2	167.4	290.9	361.4	389.6	477.1
$E_{p,a}-E_{p/2}/\text{mV}$ [a]	38.8	106.6	52.1	49.6	63.4	51.9
$\partial \log I_{p,a}/\log v$ [b]	0.645	0.351	0.535	0.728	0.725	0.575
$\partial E_{p,a}/\log v$ [b]	21.15	146.89	24.33	27.70	56.69	50.73
$\partial E_{p,a}/\log c$ [c]	-1.12	130.13	3.06	20.00	-42.48	28.68

Parámetros	CC	VA	CI	HC	2,4-BZ	SA
$E_{p,a}/mV$ [a]	552	571	588	763	841	860
$E_{p,c}/mV$ [a]	—	—	—	—	—	—
$\Delta E/mV$ [a]	—	—	—	—	—	—
$I_{p,a}/\mu A$ [a]	7.80	15.52	3.08	10.86	25.52	13.76
$I_{p,c}/\mu A$ [a]	—	—	—	—	—	—
$E_{p/2}/mV$ [a]	473.8	473.2	342.5	756.0	709.9	643.5
$E_{p,a}-E_{p/2}/mV$ [a]	78.2	97.8	245.5	104.0	131.1	92.5
$\partial \log I_{p,a}/\log v$ [b]	0.722	0.678	0.753	0.594	0.630	0.622
$\partial E_{p,a}/\log v$ [b]	40.89	9.42	24.35	14.63	14.00	16.27
$\partial E_{p,a}/\log c$ [c]	-55.38	29.57	13.16	11.50	7.44	-49.25

Tabla 1. Parámetros electroquímicos de los antioxidantes fenólicos.

[a] $C_{AO} = 5 \cdot 10^{-4}$ M, pH = 7.0 y $v = 0.1$ V·s⁻¹. [b] $C_{AO} = 5 \cdot 10^{-4}$ M y pH = 7.0.

[c] pH = 7.0 y $v = 0.1$ V·s⁻¹.

2.1.1.2. ESTUDIO CON EL PH

La presencia de grupos -OH, -COOH, o ambos, en la estructura de la mayoría de los compuestos estudiados aporta características ácido-base reseñables, por lo que hay que considerar el efecto del pH sobre la respuesta voltamétrica. Se operó variando el pH a concentraciones de antioxidante y velocidades de barrido constantes, $C_{AO} = 5 \cdot 10^{-4}$ M y $v = 0.1$ V·s⁻¹ (Figura 4).

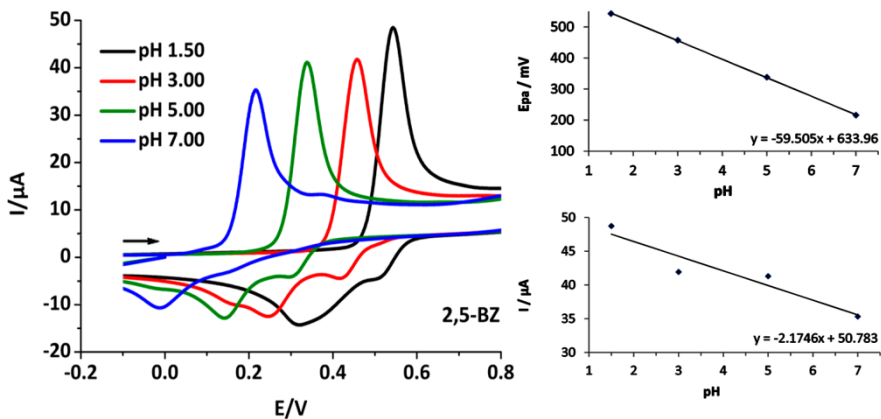


Figura 4. Influencia del pH sobre 2,5-BZ. Análisis de $E_{p,a}$ e $I_{p,a}$ frente al pH.

$C_{AO} = 5 \cdot 10^{-4}$ M y $v = 0.1$ V·s⁻¹.

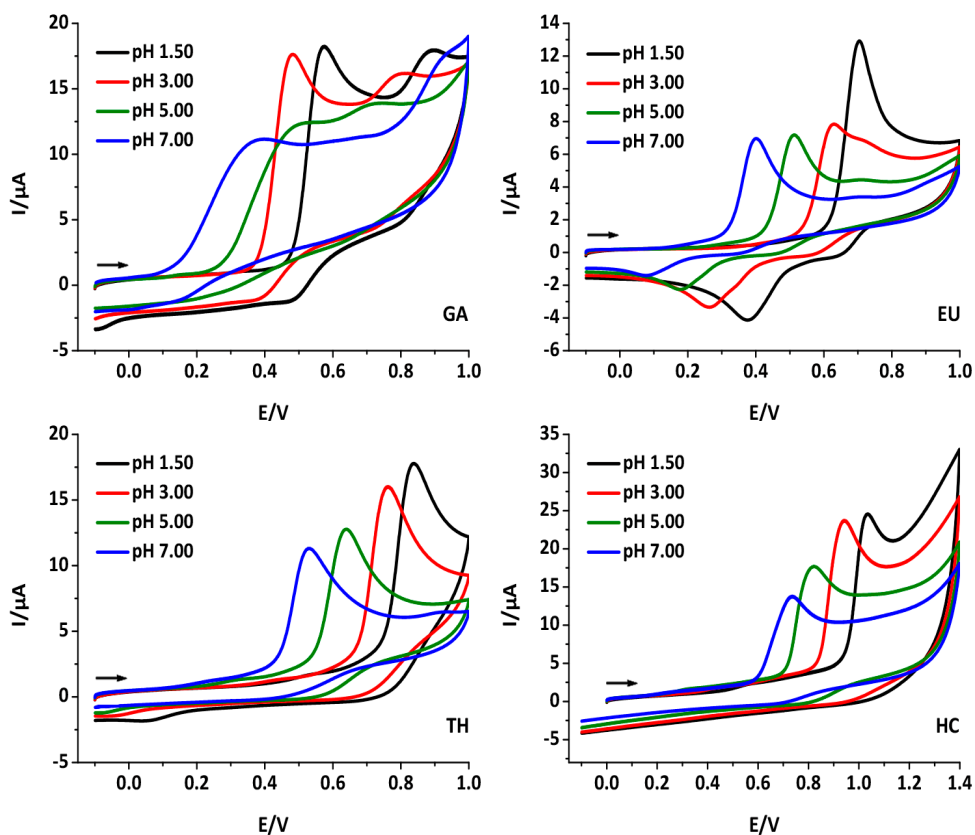


Figura 5. Influencia del pH sobre GA, EU, TH y HC.

$$C_{AO} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M y } v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}.$$

A medida que el pH de la disolución aumenta los $E_{p,a}$ se desplazan hacia valores menos positivos, lo cual indica que la oxidación es más fácil.

2.1.1.3. ESTUDIO CON LA VELOCIDAD DE BARRIDO

Se realizó un estudio variando la velocidad de barrido. La concentración y el pH se mantuvieron constantes a $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ y 7.0 (ó 3.0) respectivamente. Finalmente, se interpretaron las dependencias del $E_{p,a}$ y de $\log I_{p,a}$ con el $\log v$ (Figura 6).

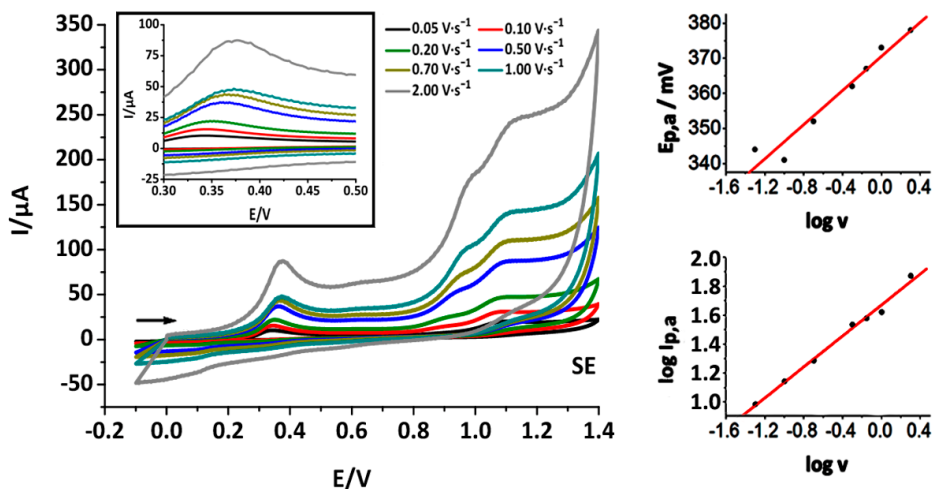


Figura 6. Influencia de la velocidad de barrido sobre SE.
Análisis del $E_{p,a}$ y $\log I_{p,a}$ frente al $\log v$. $C_{AO} = 5 \cdot 10^{-4}$ M y $v = 0.1$ $V \cdot s^{-1}$.

Las intensidades de los voltogramas registrados aumentaron al aumentar la velocidad de barrido. Una velocidad de barrido más alta implica una mayor precisión; sin embargo, está asociada con una mayor corriente de carga, al igual que ocurría para el aumento de la concentración. En esta ocasión, todos los $E_{p,a}$ se desplazaron hacia valores más positivos (Tabla 1). Por otra parte, cuando las velocidades de barrido son demasiado elevadas, los voltogramas presentan formas distorsionadas, hecho que se minimiza realizando un “*Smooth*” o alisado. Esta distorsión podría estar relacionada con la dependencia de $\log I_{p,a}$ con el $\log v$, cuya pendiente debe ser cercana a 0.5 para un proceso controlado por difusión.^[9] El hecho de que los valores experimentales sean superiores (Tabla 1) puede asociarse con procesos de adsorción en la superficie del ECV que, por otra parte, explicaría también la variación de los $E_{p,a}$ hacia valores más positivos.

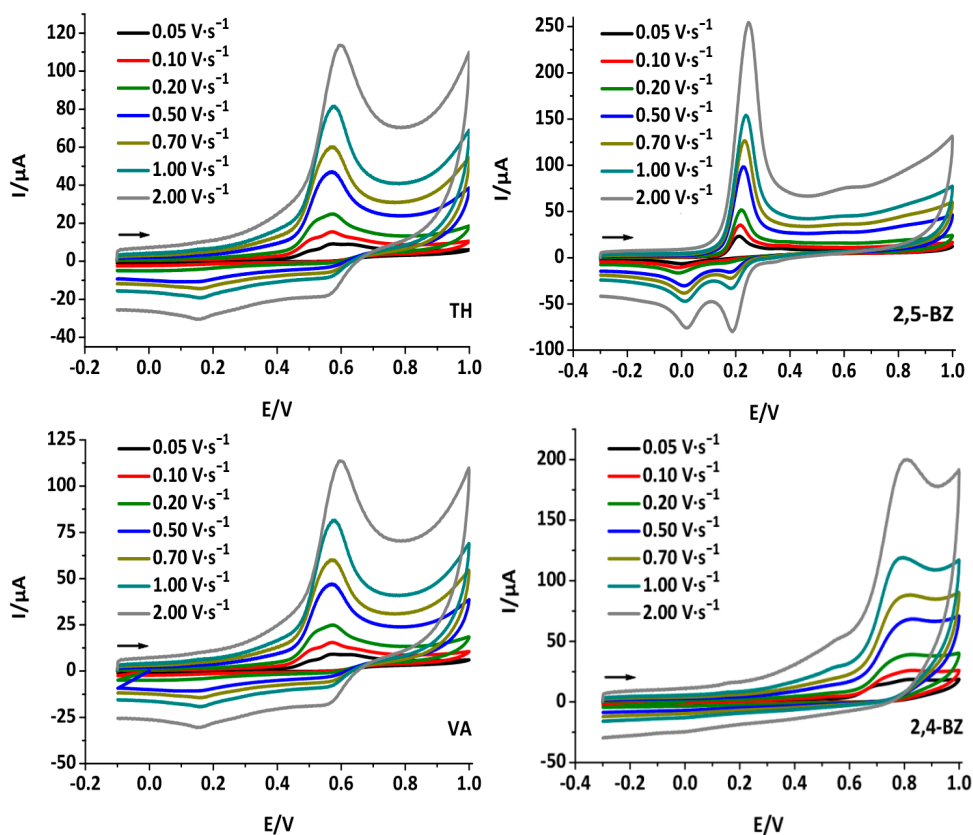


Figura 7. Influencia de la velocidad de barrido sobre TH, 2,5-BZ, VA y 2,4-BZ.

$$C_{AO} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M y pH} = 7.0.$$

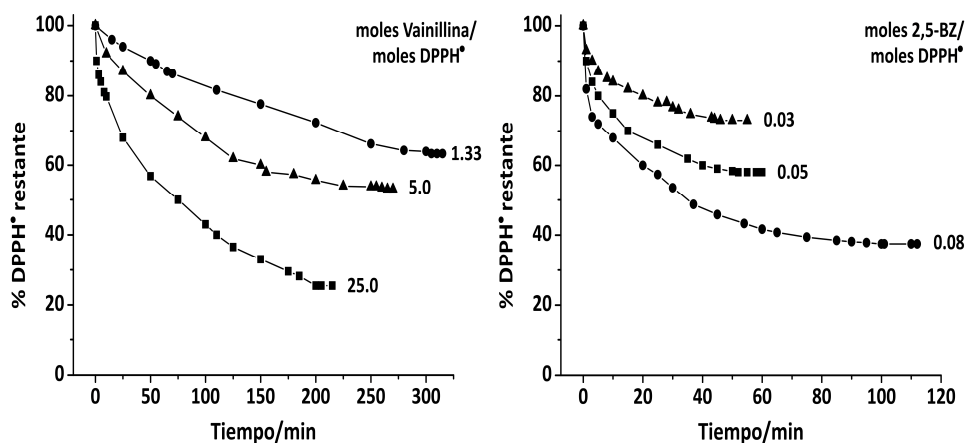
Las condiciones óptimas para las medidas experimentales de actividad antioxidante de los compuestos puros por VC se obtuvieron a partir de los resultados de las experiencias anteriores. Es importante llevar a cabo las mediciones voltamétricas con la mínima corriente de carga y la menor distorsión posible, ya que implicaría mayor fiabilidad a la hora de extrapolar la corriente de carga a los potenciales correspondientes al pico. Por tanto, se requiere el uso de velocidades de barrido bajas. Sin embargo, también es necesaria una sensibilidad elevada. Ello se consigue con concentraciones y velocidades de barrido altas. Finalmente, valores de pH más básicos facilitan notablemente la oxidación, pero a expensas de la disociación de los grupos ácidos débiles de las moléculas y del alejamiento significativo de las condiciones fisiológicas. Así pues, el equilibrio entre todas estas consideraciones nos permitió establecer como condiciones experimentales óptimas de medida los siguientes valores:

$$C_{AO} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M, pH} = 7.0 \text{ y } v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}.$$

2.2. ENSAYO DE CAPTURA DEL RADICAL DPPH[•]

2.2.1. INFLUENCIA DE LA CINÉTICA ANTIOXIDANTE EN LA CAPTURA DEL RADICAL DPPH[•]. DETERMINACIÓN DEL ESTADO ESTACIONARIO

El valor de capacidad antioxidante obtenido mediante el ensayo de captura del radical DPPH[•] para un determinado compuesto hace referencia a la interacción del mismo con el radical. El mecanismo de interacción es común y conocido;^[10] sin embargo, la cinética es dependiente del antioxidante en cuestión. Las diferencias significativas en las velocidades de transferencia electrónica, fundamentada en la diversidad estructural de los compuestos, influye de manera determinante a la hora de establecer un procedimiento de actuación con el que determinar el parámetro EC₅₀. Así, se encontraron antioxidantes tales como el ácido ascórbico, para el que, en un rango sumamente pequeño de los valores correspondientes a la relación moles AO/moles DPPH[•], el radical alcanza su forma reducida (DPPH-H) en escasos 10 minutos tras la adición del antioxidante. Por el contrario, moléculas como la vainillina, requieren periodos de tiempo de hasta 5 horas para reducir completamente al radical DPPH[•] para razones de concentraciones 10 veces superiores (Figura 8).



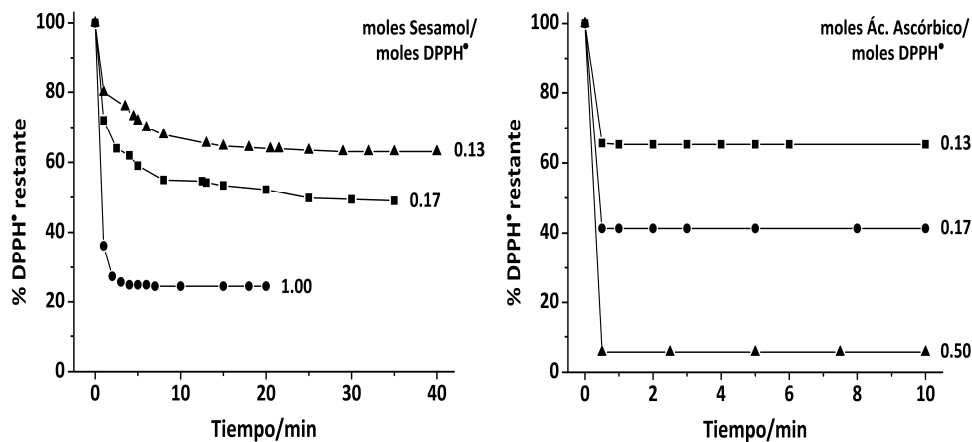


Figura 8. Comportamiento cinético de VA, 2,5-BZ, SE y AA en el ensayo de captura del radical DPPH*.

Por consiguiente, resulta desafortunado medir el valor de absorbancia a un tiempo fijo de interacción entre el AO y el radical DPPH* para determinar la concentración de AO que ocasiona un 50% de DPPH* restante. En esta investigación, el valor de absorbancia, anotado individualmente para cada concentración de AO, se realizó una vez alcanzado el estado estacionario de la reacción de interacción; es decir, cuando la absorbancia se mantiene invariable al menos durante 10 minutos en los límites de incertidumbre del equipo espectrofotométrico utilizado, esto es, $\pm 0,001$ unidades de Abs (Figura 9).

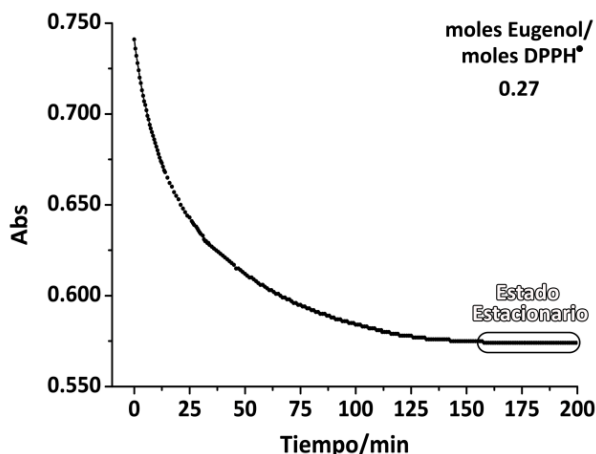


Figura 9. Cinética EU. Determinación del estado estacionario.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. VOLTAMETRÍA CÍCLICA

Se registraron los voltagramas de los compuestos estudiados en las condiciones experimentales óptimas: $C_{AO} = 5 \cdot 10^{-4}$ M, $pH = 7.0$ y $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. Los resultados se resumen en las Figuras 10 y 11.

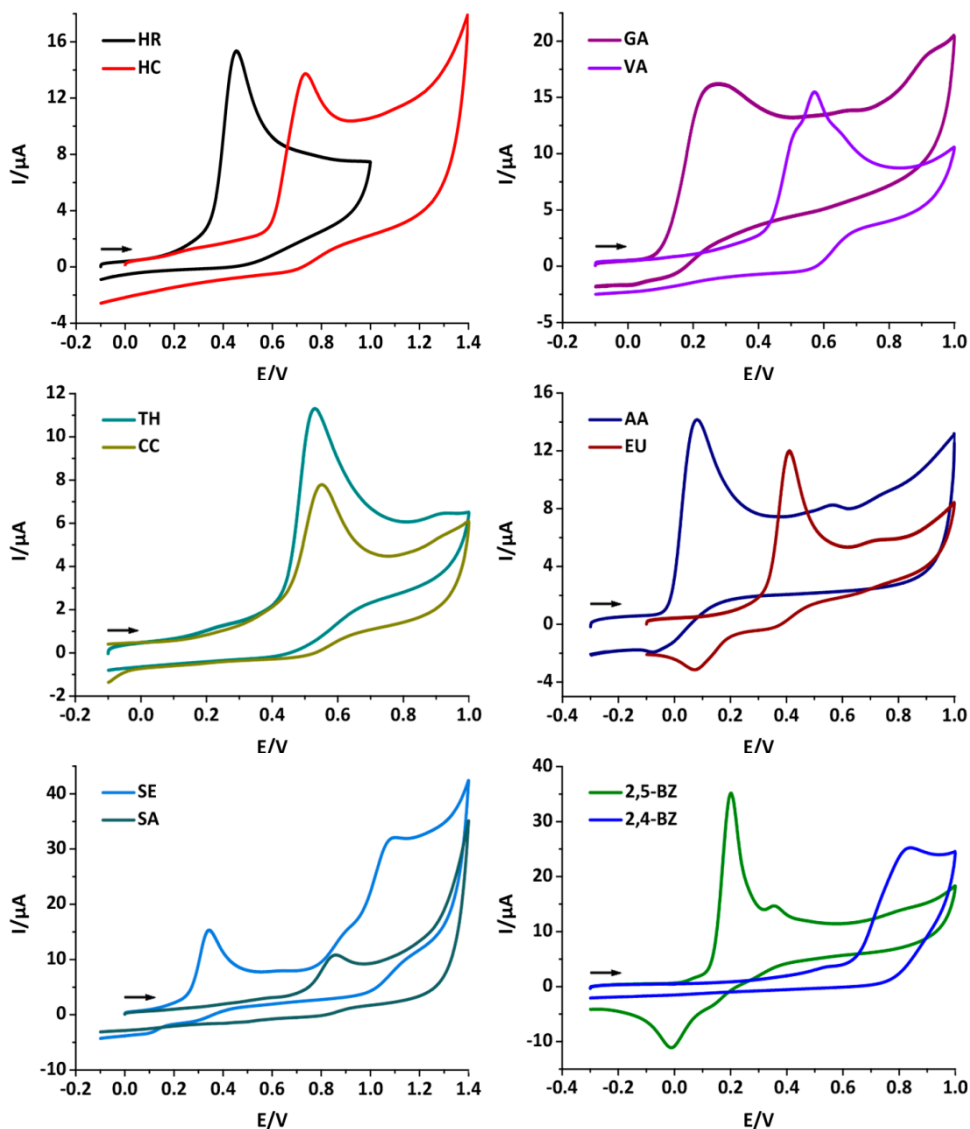


Figura 10. Voltagramas de compuestos con actividad antioxidante.

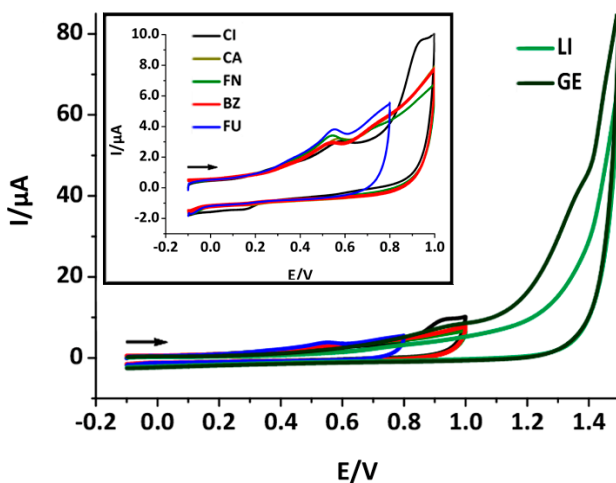


Figura 11. Voltagramas de compuestos sin actividad antioxidante.

La interpretación de los voltagramas es relativamente simple. La presencia de pico/s voltamétrico/s en la corriente anódica es una prueba irrefutable de propiedades reductoras por parte de los compuestos estudiados. Un valor de $E_{p,a}$ menor indica una situación más favorable para la oxidación, es decir, una mayor facilidad por parte de la molécula para ceder uno de sus electrones y, por consiguiente, una mayor actividad antioxidante respecto a aquellos otros compuestos con potenciales de oxidación superiores.^[11] La medida de un único parámetro es suficiente para discernir entre moléculas con o sin actividad antioxidante significativa (Figuras 10 y 11).

Un antioxidante ideal, desde el punto de vista electroquímico, es aquel que presenta procesos anódicos irreversibles.^[11] Los resultados muestran una cierta reversibilidad del proceso óxido-reducción de determinados compuestos con importantes actividades antioxidantes, por ejemplo AA, EU y 2,5-BZ. No obstante, los cocientes $I_{p,a}/I_{p,c}$ son elevados, por lo que la reversibilidad no es muy importante. Con excepción del AA, molécula antioxidante por excelencia de nuestro estudio,^[12] el resto de compuestos que han presentado actividades análogas tienen en común su naturaleza estructural fenólica. Los resultados obtenidos de los principales parámetros electroquímicos en VC, así como las correlaciones existentes en las distintas relaciones establecidas entre los parámetros experimentales más influyentes –concentración, pH y velocidad de barrido– de los compuestos fenólicos se muestran en la Tabla 1.

La intensidad del pico voltamétrico está relacionada con la concentración de antioxidante y su mecanismo específico de oxidación, principalmente con el número de electrones que participan en el proceso oxidativo y con la reversibilidad o no del mismo. Por consiguiente, no puede usarse como parámetro de medida de actividad antioxidante.

La adición de un único grupo $-OH$ en un anillo de benceno, lo que constituye la unidad química fenólica, aporta consecuencias drásticas sobre las propiedades químicas del sistema aromático, el cual, de otro modo, resulta casi inerte.^[13] Como se ha comentado en el Capítulo I, se supone que la etapa inicial en moléculas fenólicas, especialmente a valores de pH cercanos al experimental (pH 7.0), conduce a la formación del catión fenoxinio (PhO^+), a través de un radical fenoxi, que posteriormente evoluciona por medio de otros procesos químicos tales como la pérdida de un protón, reacciones de acoplamiento o sustituciones nucleofílicas.^[14]

Los resultados descritos en bibliografía^[15] apuntan a la importancia de la presencia de múltiples grupos hidroxilos y a la existencia de conjugación electrónica en la actividad antioxidante, además de las propiedades electroquímicas de los compuestos, hecho que justifica la elevada capacidad antioxidante obtenida para el GA. Adicionalmente, los grupos fenoxilos vecinos que presenta su estructura son propensos a la oxidación con formación de peróxido de hidrógeno, quinonas y semiquinonas,^[16] y un grupo ácido responsable de la estabilización de la especie resultante del proceso oxidativo. La presencia de sustituyentes alquilo y/o alcoxi en posiciones *orto/para*, y/o sustituyentes carbonílicos en *meta*, produce una gran disminución en los valores del $E_{p,a}$. El efecto de los sustituyentes está reflejado en los resultados obtenidos para los isómeros 2,4-BZ y 2,5-BZ. La presencia de un grupo fenoxilo en posición *para* del anillo armático y un grupo aldehído en *meta* favorece la oxidación del 2,5-BZ ($E_{p,a}=0.202$ V), a diferencia del 2,4-BZ, que presenta los mismos grupos en posiciones que desfavorecen su actividad electroquímica ($E_{p,a}=0.841$ V). Seguidamente, con actividades antioxidantes inferiores al AA, 2,5-BZ y GA, se encuentran los compuestos fenólicos con grupos alquilo o alcoxi en *orto/para*, tales como SE, EU, HR (*p*-sustituidos) y TH, VA y CC (*o*-sustituidos).

Es importante resaltar que el potencial de oxidación de un compuesto puro se puede determinar con la misma precisión con independencia del carácter antioxidante del mismo. Obviamente, con la condición indispensable de que

éste genere un pico bien definido, presentando así un valor de incertidumbre inferior a ± 4 mV.

3.2. ENSAYO DE CAPTURA DEL RADICAL DPPH[•]

El ensayo de captura del radical DPPH[•] carece de la precisión de la VC.^[17] Una menor actividad del antioxidante para captar una cantidad constante de radical está relacionada, generalmente, con tiempos mayores de análisis (influencia de la cinética antioxidante) y con concentraciones elevadas del mismo. En estos casos, la reproducibilidad de los resultados es menor. Algunos de los resultados obtenidos se muestran gráficamente en la Figura 12:

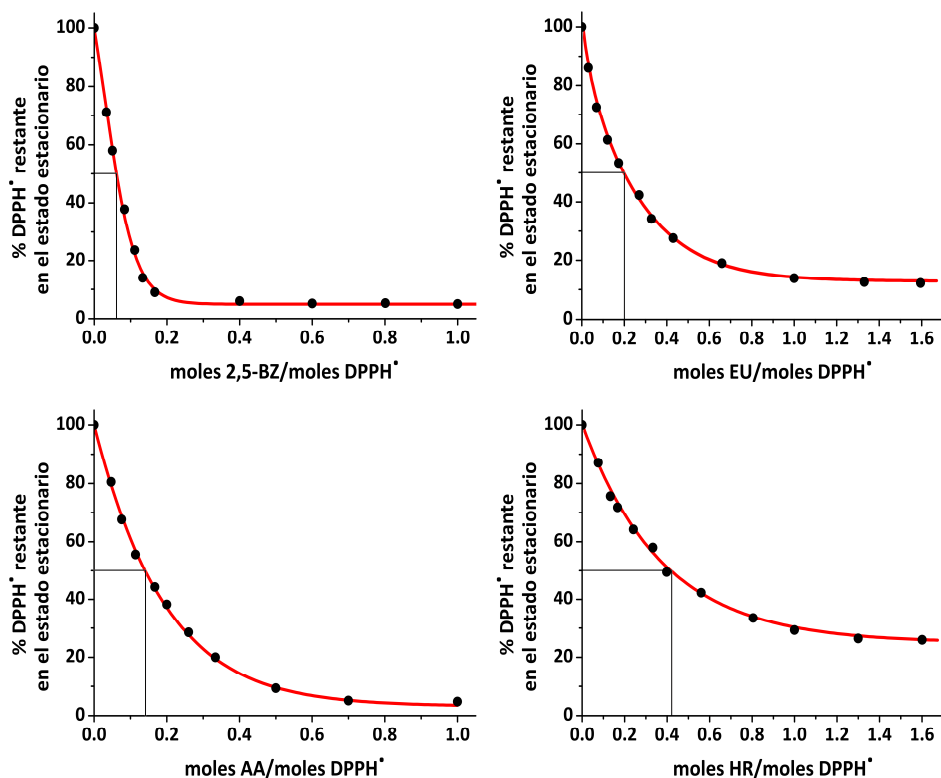


Figura 12. Determinación del parámetro EC₅₀ del 2,5-BZ, EU, AA y HR.

Los resultados de $E_{p,a}$ y ARP obtenidos para los antioxidantes puros estudiados se muestran en la Tabla 2:

Compuesto/Acrón.	ARP ^[a]	E _{p,a} ^[b] /mV	Compuesto/Acrón.	ARP ^[a]	E _{p,a} ^[b] /mV		
2,5-dihidroxi-benzaldehído	2,5-BZ	17.5	202	4-metoxibencil alcohol	4-MA	<10 ⁻³	—
ácido gálico	GA	12.5	274	furfural	FU	<10 ⁻³	—
ácido ascórbico	AA	6.4	79	geraniol	GE	<10 ⁻³	—
sesamol	SE	5.5	343	limoneno	LI	<10 ⁻³	—
eugenol	EU	5.0	411	α-pineno	α-PI	0.1	—
4-hexilresorcinol	HR	2.3	453	β-pineno	β-PI	<10 ⁻³	—
timol	TH	0.8	529	<i>p</i> -cloroanisol	CL	<10 ⁻³	—
carvacrol	CC	0.1	552	ácido furoico	FA	<10 ⁻³	—
vainillina	VA	0.1	571	pulegona	PU	<10 ⁻³	—
ácido cinámico	CA	<10 ⁻³	552	mentol	MT	<10 ⁻³	—
cinamaldehído	CI	<10 ⁻³	588	mentona	MT'	<10 ⁻³	—
3-hidroxi-cumarina	HC	<10 ⁻³	763	ácido 2-furanoacético	FN	<10 ⁻³	—
2,4-dihidroxi-benzaldehído	2,4-BZ	<10 ⁻³	841	3,5-dimetoxi-benzaldehído	3,5-BZ	<10 ⁻³	—
salicilaldehído	SA	<10 ⁻³	860	1,4-cineol	CN	<10 ⁻³	—
cumarina	CU	<10 ⁻³	—	benzaldehído	BZ	<10 ⁻³	—

Tabla 2. Valores de E_{p,a} y ARP de los compuestos puros estudiados.

^[a] I.C. = ±0.5% del valor promedio de ARP. ^[b] I.C. de los valores de E_{p,a} < ±4mV.

De los resultados obtenidos se deduce que el potencial de oxidación de un compuesto candidato a poseer actividad antioxidante adquiere un valor límite de 0.56 ± 0.09 V. Por consiguiente, los compuestos con un E_{p,a} inferior mostraron una actividad antioxidante significativa. En cambio, aquellos con potenciales superiores no presentaron valor de ARP significativo, es decir, resultaron inactivos en el ensayo de captación del radical DPPH[•], actuando, de este modo, como moléculas prooxidantes^[15] (Figura 13).

Es posible establecer, por tanto, una correlación entre los resultados de actividad antioxidante obtenidos por ambas metodologías para los principios activos de especias y condimentos pertenecientes a la familia de antioxidantes

de bajo peso molecular estudiados, tal y como ilustra la Figura 14. Sin embargo, en antioxidantes como la cumarina y el limoneno, entre otros antioxidantes analizados, se encontró que, con independencia de la metodología empleada, no presentaban actividad antioxidante significativa.

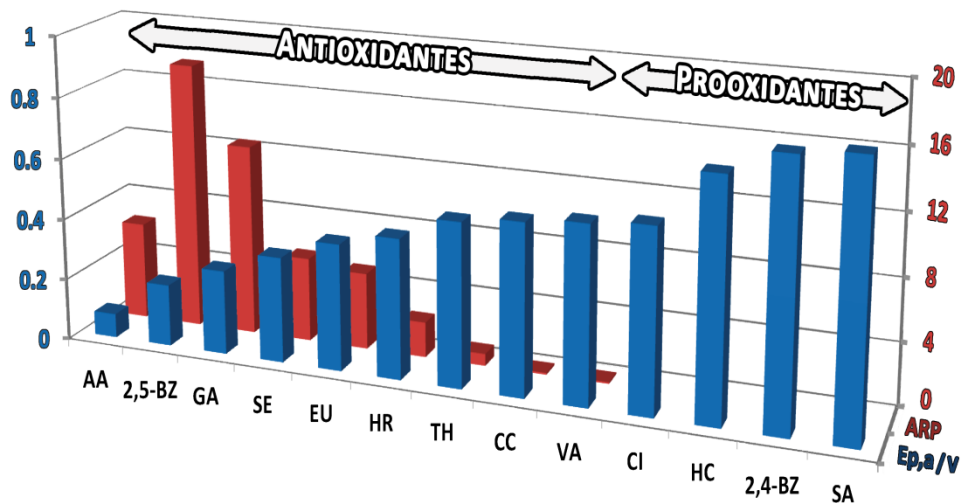


Figura 13. Valor límite de $E_{p,a}$ asociado a propiedades antioxidantes.

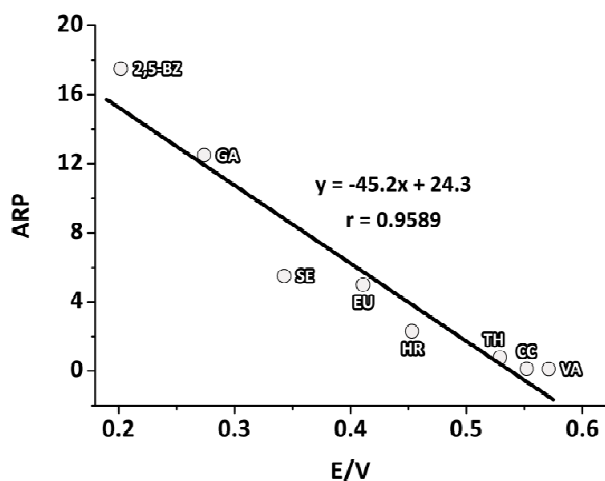


Figura 14. Correlación de los parámetros de actividad antioxidante obtenidos mediante el ensayo de captura del radical DPPH[•] y VC del conjunto de antioxidantes activos.

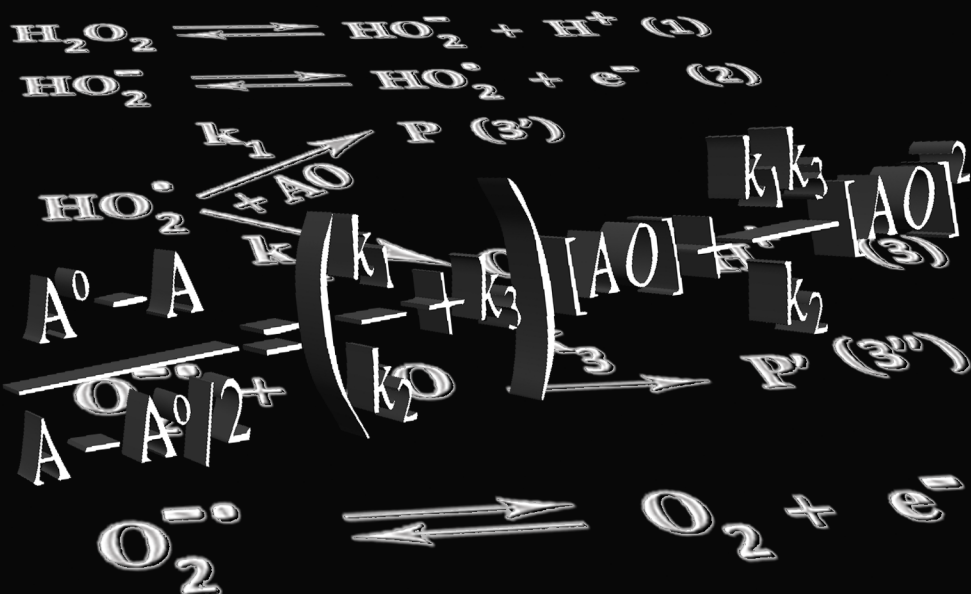
4. BIBLIOGRAFÍA

1. Cherng, J.; Chiang, W.; Chiang, L. Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of umbelliferae and its related coumarins and flavonoids. *Food Chem.* **2008**, 106, 944-950.
2. Ho, S.; Tang, Y.; Lin, S.; Liew, Y. Evaluation of peroxynitritescavenging capacities of several commonly used fresh spices. *Food Chem.* **2010**, 119, 1102-1107.
3. Ringman, J. M.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M.; Masterman, D. L.; Cummings, J. L. Potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer's Res.* **2005**, 2, 131-136.
4. Dragland, S.; Senoo, H.; Wake, K.; Holte K.; Blomhoff, R. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *J. Nutr.* **2003**, 133, 1286-1290.
5. Yanishlieva, N.V.; Marinova, E.; Pokorný, J. Natural antioxidants from herbs and spices. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2006**, 108, 776-793.
6. Barros, L.; Falcão, S.; Baptista, P.; Freire, C.; Vilas-Boas, M.; Ferreira, I.C.F.R. Antioxidant of agaricus sp. Mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chem.* **2008**, 111, 61-66.
7. Samra, M.A.; Chedea, V.S.; Economou, A.; Calokerinos, A.; Kefalas, P. Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: part I. studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry. *Food Chem.* **2011**, 125, 622-629.
8. Yakovleva, K.E.; Kurzeev, S.A.; Stepanova, E.V.; Fedorova, T.V.; Kuznetsov, B.A.; Koroleva, O.V. Characterization of plant phenolic compounds by cyclic voltammetry. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2007**, 43, 661-668.
9. Munir, A.; Ullah, I.; Shah, A.; Rana, A.U.; Khan, S.U.D.; Adhikari, B.; Shah, S.M.; Khan, S.B.; Kraatz, H.B.; Badshaha, A. Synthesis, Spectroscopic Characterization and pH Dependent Electrochemical Fate of Two Non-Ionic Surfactants. *J. Electrochem. Soc.* **2014**, 161, 885-890.
10. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1841-1856.

11. Kilmartin, P.A.; Zou, H.; Waterhouse, A.L. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolic. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 1957–1965.
12. Arrigoni, O.; De Tullio, M.C. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, 1569, 1–9.
13. Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C; Pouységu, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 586–621.
14. Ferreira, M.; Varela, H.; Torresi, R.M.; Tremeliosi-Filho, G. Electrode passivation caused by polymerization of different phenolic compounds. *Electrochim. Acta.* **2006**, 52, 434–442.
15. Simić, A.; Manojlović, D.; Segan, D.; Todorović, M. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules.* **2007**, 12, 2327–2340.
16. Wong, S.K.; Sytnyk, W.; Wan, J.K.S. Electron spin resonance study of the self-disproportionation of some semiquinone radicals in solution. *Can. J. Chem.* **1972**, 50, 3052–3057.
17. Arteaga, J.F.; Ruiz-Montoya, M.; Palma, A.; Alonso-Garrido, G.; Pintado, S.; Rodríguez-Mellado, J.M. Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles. *Molecules.* **2012**, 17, 5126-5138.

CAPÍTULO V

ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE ANTIOXIDANTES Y ROS ELECTROGENERADAS EN EL PROCESO DE OXIDACIÓN DEL H_2O_2 SOBRE ELECTRODO DE Hg. DEDUCCIÓN DE ECUACIONES ELECTROQUÍMICAS TEÓRICAS Y DESARROLLO DE UN PARÁMETRO CINÉTICO DE MEDIDA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE VPD



1. INTRODUCCIÓN

Las medidas electroquímicas se emplean como una prueba rápida para determinar la actividad antioxidante de muchas moléculas orgánicas.^[1,2] La medida del $E_{p,a}$, mediante VC, permite comparar la fuerza antioxidante de compuestos y presenta, además, una buena correlación con los valores de ARP obtenidos mediante el ensayo de captura del radical DPPH \cdot ,^[3] puesto que éste evalúa únicamente la capacidad de captura del radical de sustancias termodinámicamente capaces de reaccionar con él, es decir, de aquellas con un potencial redox inferior al potencial de reducción del radical (0.340 V frente al electrodo de Ag/AgCl a pH 7.0).^[4] La posible existencia de otros radicales menos estables y de interés biológico, como son el RO $_2\cdot$ y el \cdot OH –con potenciales formales de reducción superiores al radical DPPH \cdot – posibilita las reacciones con otras especies que poseen potenciales de oxidación bajos, impidiendo, de este modo, determinar sus actividades antioxidantes.

Ambas metodologías están fundamentadas en procesos diferentes: la facilidad de un compuesto para la electrodonación y la interacción del mismo con un radical nitrogenado metaestable. Considerando la importancia de la interacción de los AO con las ROS para prevenir o retardar el estrés oxidativo, resulta muy acertado el desarrollo de técnicas electroquímicas que permitan determinar la capacidad antioxidante fundamentada en dicha interacción, tal y como se observó con las dihidropiridinas y el radical O $_2\cdot^-$ electrogenerado.^[5]

La oxidación polarográfica en medio alcalino del H $_2$ O $_2$ sobre el EGM puede emplearse como una fuente electroquímica de los radicales HO $_2\cdot$ y O $_2\cdot^-$. El estudio mediante VPD de la disminución del área de la corriente de oxidación, causada por la adición de antioxidantes, se utiliza como medida de la actividad antioxidante. El H $_2$ O $_2$ presenta la ventaja de su estabilidad respecto a otras ROS que requieren ser producidas *in vivo*. También se ha examinado la interacción entre las ROS electrogeneradas y los antioxidantes, desarrollándose ecuaciones electroquímicas teóricas que emplean la aproximación de difusión convectiva y las condiciones de estado estacionario, y que requieren resolver ecuaciones diferenciales resultantes de la aproximación de la capa de difusión de Nernst, por el método de variables adimensionales. Por último, dado el excelente ajuste de los resultados experimentales con las predicciones teóricas, se propone un parámetro cinético para la evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos estudiados.

2. EXPERIMENTAL

2.1. EFECTO DEL ETANOL

La naturaleza orgánica de la mayoría de los compuestos puros estudiados requiere el uso de etanol como disolvente. La solubilidad de los antioxidantes en agua es inferior a la concentración requerida para los experimentos. El empleo de disolventes no acuosos en cantidades variables (concentraciones variables de antioxidantes), en el medio de reacción constituido por la disolución acuosa de electrolito soporte (ES) y una concentración constante de H_2O_2 , provoca una disminución en la intensidad del máximo polarográfico (Figura 1).

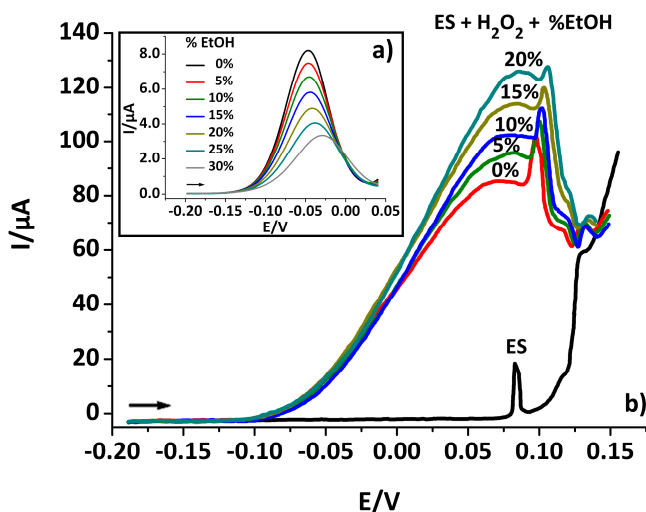


Figura 1. Efecto del porcentaje de etanol sobre el voltagrama PD (a) y polarograma dc (b) de H_2O_2 $5 \cdot 10^{-3}$ M, pH 10.51.

Por tanto, un incremento de la concentración de antioxidante lleva implícito un aumento del porcentaje de etanol en la disolución de H_2O_2 de concentración constante, dificultando la interpretación de la disminución de intensidad del pico debido a la existencia de ambas contribuciones. Por tanto, la disminución de la intensidad observada en el voltagrama PD, tras la adición de etanol, se debe principalmente a la disminución del área efectiva de la superficie del EGM, parcialmente cubierto por moléculas de etanol, despreciándose así la variación de intensidad asociada al cambio de la viscosidad de la disolución. De este modo, la

interacción entre el antioxidante y los radicales electrogenerados en la oxidación del H_2O_2 no tiene lugar en la superficie del EGM, sino en la capa de difusión.

2.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE H_2O_2 .

Resulta imprescindible el análisis de un parámetro con una marcada proporcionalidad con la concentración de H_2O_2 con vistas a una rigurosa cuantificación de la interacción entre los AO y los radicales HO_2^\bullet y O_2^\bullet generados durante la electrooxidación del H_2O_2 , dado que ésta está relacionada directamente con la evolución de dicha concentración. El parámetro seleccionado es el área del pico registrado por VPD (Figura 2).

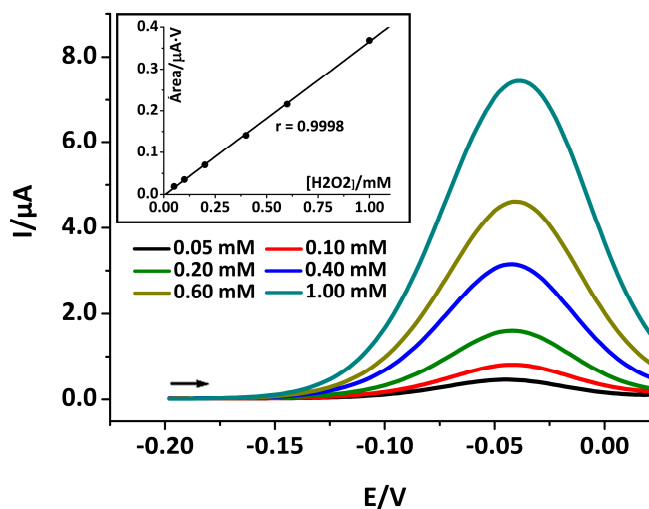


Figura 2. Efecto de la concentración de H_2O_2 en VPD.

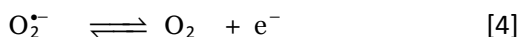
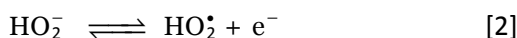
Recuadro: Representación de área de pico vs concentración de H_2O_2 .
pH 10.51 y 30% EtOH.

Algunos autores^[6-8] emplean la intensidad de pico de un máximo polarográfico para medir la corriente de oxidación. Sin embargo, el origen del máximo es, a menudo, debido al incremento en el transporte de la especie electroactiva hacia la superficie del electrodo por movimientos en la disolución. Por consiguiente, su intensidad depende de las condiciones hidrodinámicas de la disolución. El resultado es que la cantidad de especies electroactivas que alcanza el electrodo es

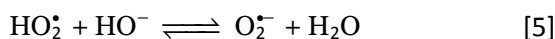
mayor que la transportada por difusión. Desafortunadamente, el EGM es muy sensible a variaciones en la concentración de etanol, hecho utilizado en muchos casos para eliminar el máximo polarográfico debido a procesos que tienen lugar en la fase adsorbida.^[9] De ahí que se optara por la selección de la VPD como técnica electroquímica frente a la polarografía dc, ya que es más rápida, segura, barata y respetuosa con el medio ambiente y, además, minimiza considerablemente la influencia de la adsorción.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la oxidación del H_2O_2 en electrodos de Hg,^[10,11] el radical anión superóxido es formado como un intermedio. El potencial de oxidación al que tiene lugar la oxidación anódica presenta dependencia con el pH, lo que indica que debe ocurrir una reacción de disociación del ácido que es previa a la etapa determinante de la velocidad o en esta etapa en sí. A valores de $\text{pH} < 11.7$ (pK de disociación del H_2O_2),^[12] se propone, de acuerdo con los resultados experimentales obtenidos, el siguiente mecanismo simplificado de la electrooxidación del H_2O_2 :



El valor de pH experimental seleccionado fue de 10.51, por consiguiente a pH básico, la reacción [3] debe ser escrita de la siguiente manera:



El Hg participa como catalizador en el proceso oxidativo.^[10] Este suceso es esencial en el fenómeno de adsorción de los intermedios radicalarios sobre la superficie del electrodo y genera voltagramas PD con máximos intensos. El análisis de los voltagramas PD registrados se realizó utilizando la siguiente ecuación, correspondiente a un proceso de primer orden:^[13]

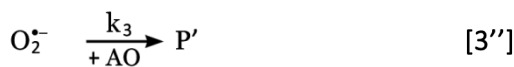
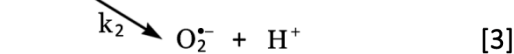
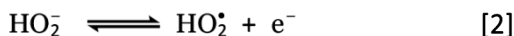
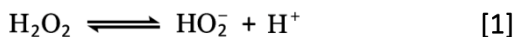
$$I = 4 I_p \frac{L}{(1 + L)^2} \quad [6]$$

donde $L = \exp [-(E-E_p)/b]$, I_p y E_p son la intensidad y potencial del pico, respectivamente, I la corriente en polarografía dc y b un parámetro cuyo valor y significado es el mismo que la pendiente del análisis logarítmico de la corriente continua,^[13,14] directamente relacionado con la cinética del proceso electroquímico. Los valores de I_p y E_p están relacionados con los valores de $E_{1/2}$ y de I_L , según la relación I-E siguiente:

$$E = E_{1/2} + b \ln \left(\frac{I_L - I}{I} \right) \quad [7]$$

La ecuación [6] se corresponde con un pico voltamétrico simétrico con área proporcional a la concentración de sustancia reaccionante, H_2O_2 y al número total de electrones que participan en el proceso electroquímico de oxidación. Los picos registrados en el estudio de la concentración del peróxido (Figura 2) se describen de manera correcta con dicha ecuación hasta el valor del potencial del pico, e incluso, para potenciales ligeramente superiores. Sin embargo, la oxidación del Hg provoca una marcada distorsión para valores de potenciales más positivos al potencial del pico, lo que repercute de manera notoria en la simetría de la curva. Esta distorsión es más pronunciada a concentraciones bajas de H_2O_2 . El parámetro b se obtuvo mediante el ajuste de los resultados experimentales a la ecuación [6], especialmente en potenciales más negativos al potencial del pico, donde la curva no se ve afectada por la oxidación del mercurio. Los valores obtenidos fueron de 38-42 mV (Figura 3), correspondientes a un proceso bieletrónico en el que la etapa determinante de la velocidad es la segunda transferencia electrónica.^[13,14]

La adición de una sustancia antioxidante a una disolución $5 \cdot 10^{-4}$ M de H_2O_2 genera una disminución del área de la curva en función de la cantidad añadida. Este hecho experimental es consecuencia de la capacidad del antioxidante para actuar como captador de radicales e interaccionar con los radicales hidropéroxido y anión superóxido, generados en las reacciones [2] y [3] respectivamente, para dar los productos de reacción P y P'. El esquema de reacción, de acuerdo a lo expuesto, queda de la siguiente manera:



Se pone de manifiesto la mayor complejidad del mecanismo en presencia de antioxidante con respecto al mecanismo propio de la oxidación del H_2O_2 , lo que hace necesario recurrir a la aproximación de difusión convectiva y a las condiciones del estado estacionario para descifrar las relaciones I-E para dicho proceso. Por otra parte, las ecuaciones diferenciales resultantes de la aproximación de la capa de difusión de Nernst se han resuelto por el método de variables adimensionales, aplicado tal y como se muestra en la literatura.^[15-20] Haciendo uso de dicha aproximación (Anexo 1), se establecieron las siguientes ecuaciones equivalentes:

$$\frac{A^\circ / 2}{A^\circ - A^\circ / 2} = \left(\frac{k_1}{k_2} C_{\text{AO}} + 1 \right) + k_3 C_{\text{AO}} \quad [8]$$

$$\frac{A^\circ - A}{A - A^\circ / 2} = \left(\frac{k_1}{k_2} + k_3 \right) C_{\text{AO}} + \frac{k_1 k_3}{k_2} C_{\text{AO}}^2 \quad [9]$$

donde C_{AO} es la concentración del antioxidante, A y A° son las áreas de pico VPD en presencia y ausencia de antioxidante, respectivamente.

En el caso particular de una velocidad muy elevada de la etapa [3'], tal y como se puede deducir en la ecuación [8], las reacciones [3], [3''] y [4] no tienen lugar, lo que implica, a nivel experimental, un valor mínimo del área de pico registrado equivalente a la mitad del valor en ausencia de AO. Es decir, la oxidación del H_2O_2 se corresponde con un proceso monoelectrónico en lugar de con la oxidación original bielectrónica. Por consiguiente, resulta inviable obtener valores de disminución de área superiores al 50% respecto al

pico registrado en ausencia de AO (Figura 4), a causa de la existencia obligada de la reacción [2] para producir el radical hidroperóxido. Esta situación puede ser alcanzada por un valor intrínsecamente elevado de k_1 , altas concentraciones de AO o ambas simultáneamente. Este proceso repercute activamente en el aumento del parámetro b , el cual ahora es cercano a 60 mV (Figura 3) y característico del tipo de ecuación de un sólo electrón.^[13,14]

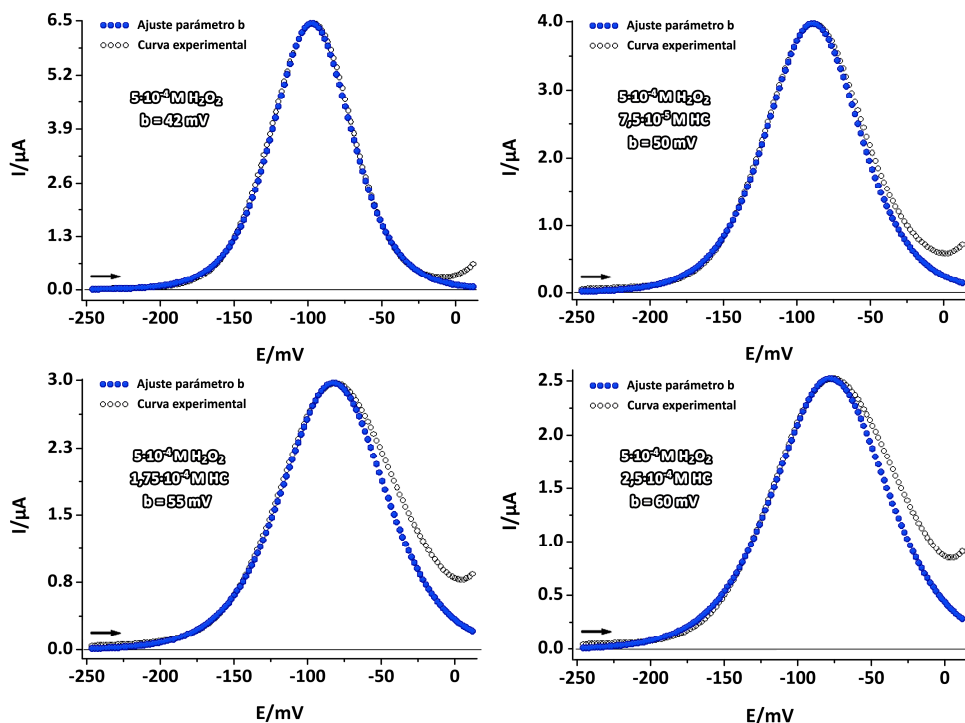


Figura 3. Efecto de la concentración de HC en la distorsión del pico de oxidación del H_2O_2 . Medida del parámetro b .

De acuerdo con la ecuación [9], los datos experimentales se ajustan satisfactoriamente a una función polinómica de segundo orden. En casos concretos, como el del ácido gálico, la curvatura de dicha función es más pronunciada (Figura 5), hecho que puede ser debido a la probabilidad de reacción de dos o más radicales de cada clase (HO_2^{\cdot} o $\text{O}_2^{\cdot-}$) con una misma molécula de gálico, de este modo, las reacciones [3'] y [3''] serían de tercer orden o superior.

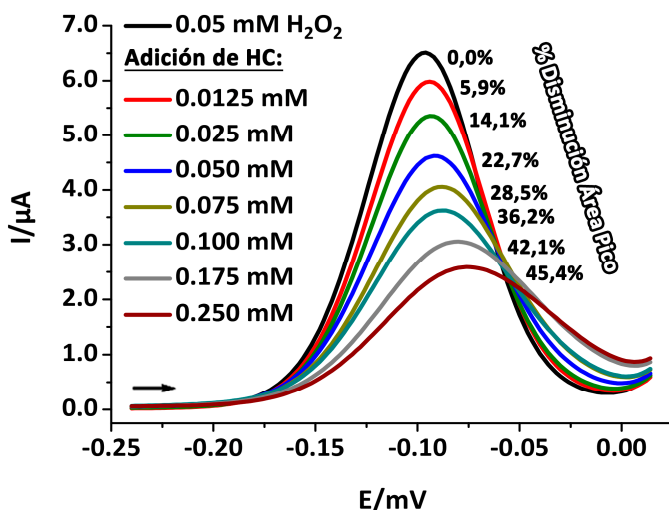


Figura 4. Efecto de la concentración de HC en la disminución del área del pico de oxidación del H₂O₂.

En cualquier caso, a concentraciones de AO bajas, la disminución del área de pico de los voltagramas PD puede ser aproximada a una función lineal, cuya pendiente responde a la siguiente ecuación:

$$m = \frac{k_1}{k_2} + k_3 \quad [10]$$

El análisis de este parámetro contiene información acerca de la actividad de captura radical del antioxidante a través de los valores de k_1 y k_3 , puesto que el valor de k_2 corresponde a la oxidación propia del H₂O₂ y permanece constante cuando los experimentos se realizan a pH 10.51 y a la temperatura de 25 ± 0.1 °C. Así, un mayor valor de m , obtenido a partir de la representación de la función área (AF) con respecto a la C_{AO} en $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, implica una mayor actividad antioxidante.

$$AF = \frac{A_L^0 - A_L}{A_L - A_L^0/2} \quad [11]$$

Dado que las C_{AO} son muy pequeñas en el rango lineal, éstas fueron reemplazadas en las representaciones gráficas por el volumen adicionado de AO en μL , parámetro directamente proporcional a la concentración (Figura 5).

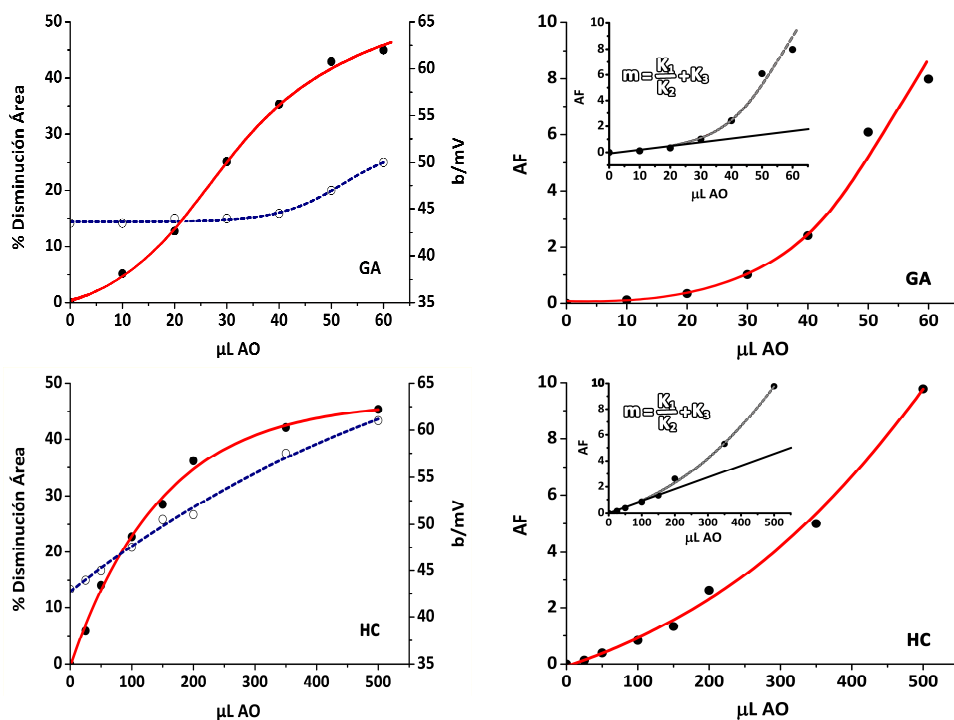


Figura 5. Porcentaje de disminución del área del pico de oxidación del H_2O_2 , parámetro b y función área (AF) del GA y HC 5 mM. Determinación del parámetro cinético m .

Un resultado alternativo al valor adimensional de la pendiente m es el parámetro μ_{10} , expresado en mL^{-1} , que se corresponde con la inversa del valor de V_{10} , expresado en μL , definido como el volumen de AO de una determinada concentración necesario para disminuir en un 10% el área del pico propio de la oxidación del H_2O_2 en el electrodo de Hg en ausencia de antioxidante. Resulta evidente que los valores de V_{10} pueden ser sustituidos por datos de concentraciones, surgiendo así otro parámetro característico, $1/C_{10}$, expresado en $(\text{mol/L})^{-1}$. Cualquier selección de los distintos parámetros descritos resulta útil a la hora de predecir la actividad antioxidante y de poder establecer comparaciones de las capacidades de captura radical de los compuestos antioxidantes analizados.

Los resultados obtenidos para aquellos compuestos puros estudiados en el Capítulo IV que presentaron actividad se muestran en la Tabla 1:

Compuestos	Acron.	V_{10} [a] /μL	μ_{10} [a] /mL ⁻¹	m [a] /μL ⁻¹	$(1/C_{10})$ [a] /mM ⁻¹
eugenol	EU	39.1	25.6	13.5	51.2
carvacrol	CC	56.3	17.8	7.5	35.5
cinamaldehído	CI	60.7	16.5	6.8	33.0
timol	TH	109.9	9.1	5.3	18.2
sesamol	SE	173.6	5.8	3.2	11.5
3-hidroxycumarina	HC	40.4	24.8	14.5	49.5
salicilaldehído	SA	173.6	5.8	1.9	11.5
limoneno	LI	429.2	2.3	1.8	4.7
geraniol	GE	246.9	4.1	1.6	8.1
vainillina	VA	113.6	8.8	2.6	17.6
ácido cinámico	CA	151.8	6.6	2.8	13.2
2,5-dihidroxibenzaldehído	2,5-BZ	89.3	11.2	3.8	22.4
2,4-dihidroxibenzaldehído	2,4-BZ	49.9	20.0	10.3	44.5
ácido gálico	GA	22.0	45.5	23.0	91.1

Tabla 1. Valores promedio de V_{10} , μ_{10} , m y $1/C_{10}$.

[a] I.C. = ±1% del valor promedio. $C_{AO} = 5$ mM.

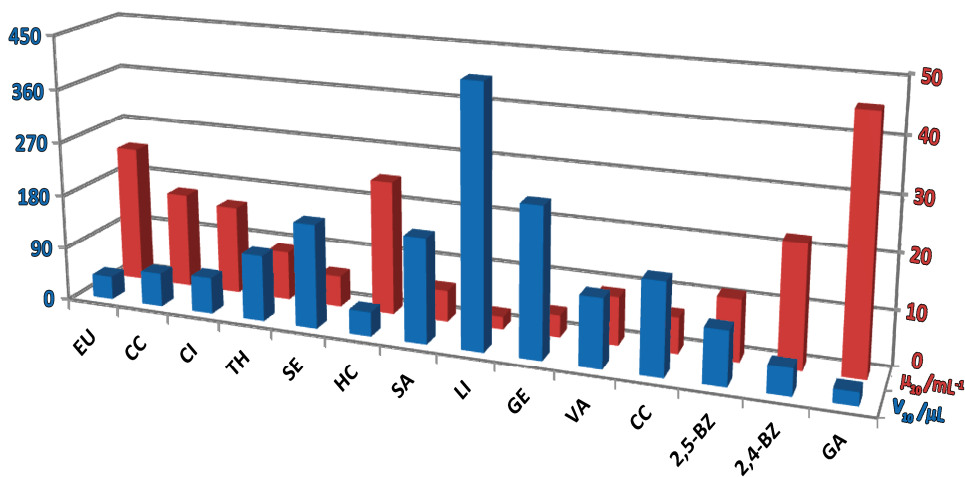


Figura 6. Representación gráfica de los parámetros V_{10} y μ_{10} tabulados.

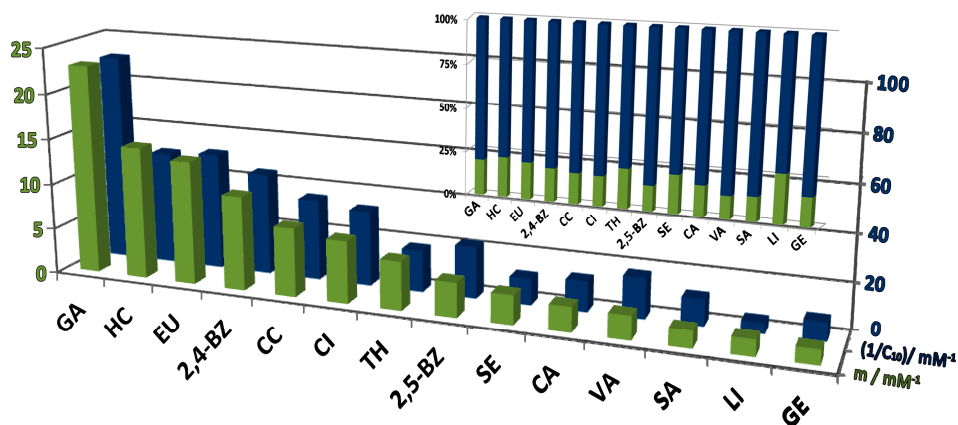


Figura 7. Representación gráfica de los parámetros m y $1/C_{10}$ tabulados. Relación experimental de los resultados obtenidos para ambos parámetros.

Los gráficos de diagramas de barras tridimensionales de las Figuras 6 y 7 se han representado con la intención de mejorar la visualización de los resultados de la Tabla 1 y facilitar así la comparación de los mismos. Un análisis exhaustivo de los resultados reflejó, en líneas generales, tendencias comparativas de las actividades antioxidantes análogas a las obtenidas en el Capítulo IV para los potenciales de oxidación ($E_{p,a}$) y el poder antirradical (ARP). No obstante, no están exentos de discrepancias o valores llamativos, tal es el caso del 2,5-BZ, el cual presenta una actividad de captura de ROS inferior a su isómero 2,4-BZ, o bien, de los compuestos CC y VA, ambos con valores similares de $E_{p,a}$ y ARP, y que ahora el CC presenta un valor de m tres veces superior a la VA. Estos hechos pueden ser explicados teniendo en cuenta que el ARP mide la capacidad de interacción entre el correspondiente AO y el radical DPPH $^{\bullet}$, mientras que la nueva metodología electroquímica desarrollada, lo hace frente a ROS (HO_2^{\bullet} y $O_2^{\bullet-}$) generadas durante la electrooxidación del H_2O_2 . El resultado es una medida más significativa que la anterior y de mayor utilidad real, al tratarse de radicales con importante relevancia biológica en el estrés oxidativo.

La mayor sensibilidad del método electroquímico queda de manifiesto al permitir la cuantificación de la actividad antioxidante de determinados compuestos de baja actividad, tales como LI y GE, que no pudo ser determinada mediante las metodologías aplicadas en el Capítulo IV.

Valores elevados de μ_{10} implican una alta actividad antioxidante. Se requiere un volumen, V_{10} , inferior para alcanzar una disminución de un 10% del área propia del pico de oxidación del H_2O_2 sobre el EGM, es decir, un valor inferior de concentración, C_{10} , lo que se traduce en valores superiores de su inverso ($1/C_{10}$), relacionado de manera lineal con el valor del parámetro m .

La relación lineal que mantienen estos dos últimos parámetros para disminuciones de área de pico del 10% responde a la siguiente ecuación:

$$\frac{A_L^o - A_L}{A_L - A_L^o/2} = \left(\frac{k_1}{k_2} + k_3 \right) C_{AO} \quad [12]$$

donde el término cuadrático de la C_{AO} ha sido despreciado en la ecuación [11]. A valores de disminución de área del 10%, se cumple:

$$A = (9/10) \cdot A^o \quad [13]$$

Sustituyendo en la ecuación [12] y realizando la inversa de la misma:

$$\frac{\frac{9}{10}A_L^o - \frac{1}{2}A_L^o}{A_L^o - \frac{9}{10}A_L^o} = \frac{1}{\left(\frac{k_1}{k_2} + k_3 \right) C_{10}} \Rightarrow 4 = \frac{1}{\left(\frac{k_1}{k_2} + k_3 \right) C_{10}} \Rightarrow \frac{1}{C_{10}} = 4 \left(\frac{k_1}{k_2} + k_3 \right)$$

Se obtiene la ecuación lineal que relaciona el valor de m vs $1/C_{10}$:

$$\frac{1}{C_{10}} = 4 \cdot m \quad [14]$$

La ecuación [14] predice, de manera teórica, la relación existente entre los parámetros m y $1/C_{10}$, ajustándose a los resultados obtenidos experimentalmente recogidos en la Tabla 1. Como puede observarse en la Figura 8 hay una buena correlación entre ambos, con una pendiente muy próxima a la teórica (3.7). No obstante, la existencia de una ordenada en el origen significativa parece indicar que hay algún efecto adicional que no se ha tenido en cuenta, o que las aproximaciones realizadas no son del todo correctas.

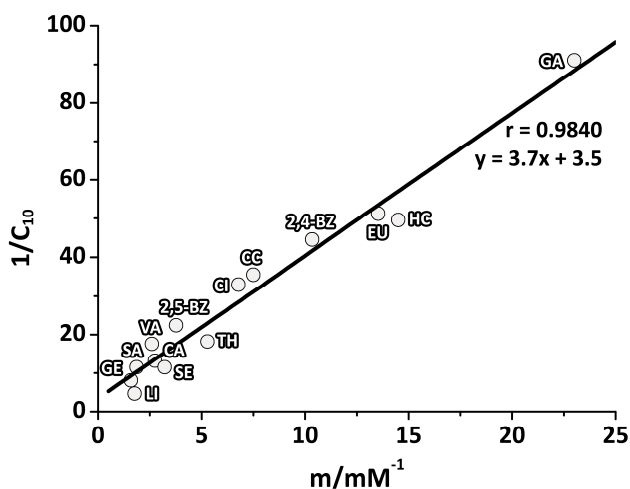


Figura 8. Relación lineal entre los parámetros m y $1/C_{10}$.

4. BIBLIOGRAFÍA

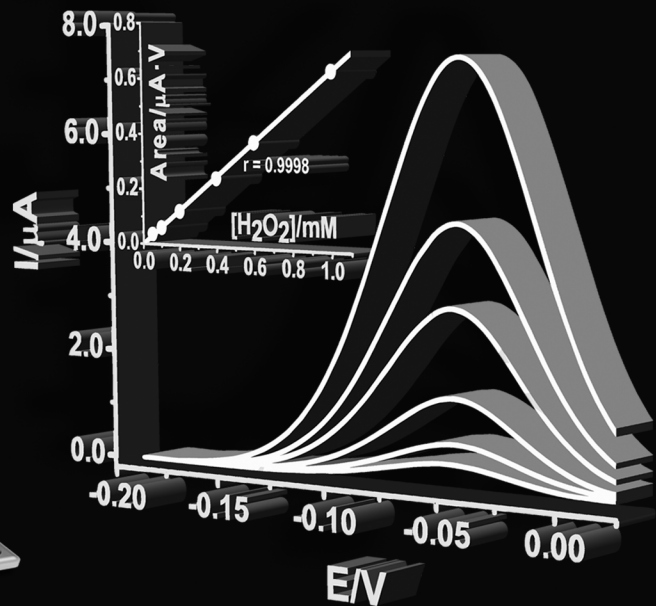
1. Simić, A.; Manjlović, D.; Šegan, D.; Todorović, M. Full paper electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*. **2007**, *12*, 2327-2340.
2. Yakovleva, K.E.; Kurzeev, S.A.; Stepanova, E.V.; Fedorova, T.V.; Kuznetsov, B.A.; Koroleva, O.V. Characterization of plant phenolic compounds by cyclic voltammetry. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2007**, *43*, 661-668.
3. Arteaga, J.F.; Ruiz-Montoya, M.; Palma, A.; Alonso-Garrido, G.; Pintado, S.; Rodríguez-Mellado, J.M. Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles. *Molecules*. **2012**, *17*, 5126-5138.
4. Zhuang, Q.K.; Scholz, F.; Pragst, F. The voltammetric behavior of solid 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) microparticles. *Electrochem. Comm.* **1990**, *1*, 406-410.
5. Bollo, S.; Jara-Ulloa, P.; Finger, S.; Núñez-Vergara, L.J.; Squella, J.A. Scanning electrochemical microscopy (SECM) study of superoxide generation and its reactivity with 1,4-dihydropyridines. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *577*, 235-242.

6. Gorjanović, S.Ž.; Novaković, M.M.; Potkonjak, N. I.; Sužnjević, D.Ž. Antioxidant activity of wines determined by a polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenge. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 4626-4631.
7. Sužnjević, D.Ž.; Pastor, F.T.; Gorjanović, S.Ž. Polarographic study of hydrogen peroxide anodic current and its application to antioxidant activity determination. *Talanta.* **2011**, 85, 1398-1403.
8. Potkonjaka, N.P.; Vasešinić, D.S.; Novaković, M.M.; Gorjanović, S.Ž.; Pezo, L.L.; Sužnjević, D.Ž. Antioxidant activity of propolis extracts from Serbia: A polarographic approach. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, 50, 3614-3618.
9. Hoegberg, L.C.G.; Angelo, H.R.; Christophersen, A.B.; Christensen, H.R. Effect of ethanol and pH on the adsorption of acetaminophen (paracetamol) to high surface activated charcoal, in vitro Studies. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **2002**, 40, 59-67.
10. Kikuchi, K.; Murayama, T. Oxidation of hydrogen peroxide at the dropping mercury electrode. *Bull. Chem. Soc. Japan.* **1976**, 49, 1554-1566.
11. Brezina, M.; Wedell, M. Polarographic anodic wave of hydrogen peroxide in alkaline solution. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1984**, 49, 2320-2331.
12. Evans, M.G.; Uri, N. The dissociation constant of hydrogen peroxide and the electron affinity of the HO₂ radical. *Trans. Faraday Soc.* **1949**, 45, 224-230.
13. Rodriguez-Mellado, J.M.; Blázquez, M.; Domínguez, M.; Ruiz, J.J. Reduction of dicarbonyl compounds on a DME. *J. Electroanal. Chem.* **1985**, 195, 263-374.
14. Rodriguez-Mellado, J.M.; Blázquez, M.; Domínguez, M. Derivation and experimental verification of approximate explicit equations in differential pulse polarography. Part II. Second-order processes. *J. Electroanal. Chem.* **1986**, 201, 237-246.
15. Andrieux, C.P.; Nadjó, L.; Savéant, J.M. Electrodimerization: VII. Electrode and solution electron transfers in the radical-substrate coupling mechanism. Discriminative criteria from the other mechanism in voltammetric studies (linear sweep, rotating disc, polarography). *J. Electroanal. Chem.* **1973**, 42, 233-242.

16. Majda, M.; Faulkner, L.R. A luminescence probe for measurements of electron-exchange rates in polymer films on electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **1982**, 137, 149-156.
17. Cosano, J.E.; Heras, A.M.; Camacho, L.; Avila, J.L.; Rodríguez Mellado, J.M. An electrochemical study of the dimerization of mesityl oxide. *J. Electroanal. Chem.* **1985**, 195, 321-334.
18. Muñoz, E.; Camacho, L.; Avila, J.L.; Heras, A.M.; Ruiz, J.J. Relationship between the pH-Dependence of the half-wave potential and the limiting current in second reduction waves of CE mechanisms. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1987**, 96, 255-263.
19. Heras, A.M.; Muñoz, E.; Avila, J.L.; Camacho, L. Determination of the rate constants for a CECE reduction mechanism. *Electrochim. Acta.* **1987**, 32, 1495-1497.
20. Ortiz, R.; Higuera, M.J.; Marín Galvín, R.; Rodríguez Mellado, J.M. The role of chemical reactions placed between successive electron transfer in the reduction of 2-methylthio-4,6-di(alkylamino)-1,3,5-triazines on mercury electrodes. *J. Electrochem. Soc.* **2001**, 148, 419-426.

CAPÍTULO VI

ESTUDIO EXHAUSTIVO DEL PROCESO DE ADICIÓN DE ANTIOXIDANTE EN EL MECANISMO DE OXIDACIÓN DEL H_2O_2 SOBRE ELECTRODO DE Hg. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS ACUOSOS DE ESPECIAS



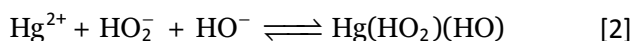
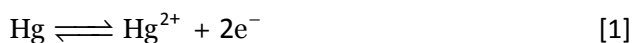
1. INTRODUCCIÓN

La reacción de oxidación anódica del H_2O_2 se ha utilizado como investigación pionera en la determinación del carácter antioxidante de multitud de compuestos presentes en alimentos.^[1-5] Recientemente, Gorjanović, Potkonjak y sus respectivos colaboradores, han desarrollado criterios polarográficos para determinar la actividad antioxidante.^[6-8] Sužnjević y colaboradores^[1] encontraron que la onda polarográfica anódica del H_2O_2 , observada en el EGM, es debida a la oxidación propia del Hg a Hg^{2+} y a la posterior formación de un complejo mixto con iones HO_2^- y HO^- , de acuerdo con lo citado previamente por Kikuchi y Murayama.^[9]

Descrito el mecanismo teórico que responde a los voltagramas PD registrados para determinados principios activos de especias y condimentos pertenecientes a la familia de antioxidantes de bajo peso molecular, se procede a su aplicación en el estudio de mezclas antioxidantes de 2 y 3 componentes previamente analizados de manera individualizada en el Capítulo IV; así como en el análisis de extractos acuosos de especias como el orégano, el tomillo, la canela, el clavo de olor y la nuez moscada, ya que albergan cantidades importantes de los principales antioxidantes estudiados en sus respectivas composiciones.

2. ANÁLISIS DEL PROCESO ELECTROQUÍMICO

Kikuchi y Murayama^[9] propusieron que la onda anódica del H_2O_2 observada en el EGM es debida a la oxidación de Hg a Hg^{2+} y a la posterior formación de un complejo mixto con iones HO_2^- y HO^- :



Sužnjević y colaboradores evaluaron la formación de este complejo mediante titulación del H_2O_2 con HgCl_2 en disoluciones alcalinas. Sin embargo, si las reacciones mostradas en el esquema anterior fueran consideradas como los únicos procesos que tienen lugar en sobre la superficie del EGM, la adición de moléculas antioxidantes no mostraría ningún efecto sobre la onda anódica observada, como

consecuencia de la no interacción de los AO con los iones Hg^{2+} en ausencia del peróxido, al menos, bajo las condiciones experimentales adoptadas en los ensayos polarográficos y voltamétricos.^[10] Se podría afirmar que los antioxidantes actúan reaccionando con el anión procedente de la disociación del H_2O_2 en medio básico (pH 10.51), disminuyendo de esta manera la concentración del complejo y, en consecuencia, su correspondiente corriente límite polarográfica o intensidad del pico registrado en VPD; de esta forma, se puede correlacionar dicha disminución con la actividad antioxidante del compuesto adicionado. Esta posibilidad teórica implicaría necesariamente la reacción del AO con el H_2O_2 en ausencia de mercurio (Figura 1):

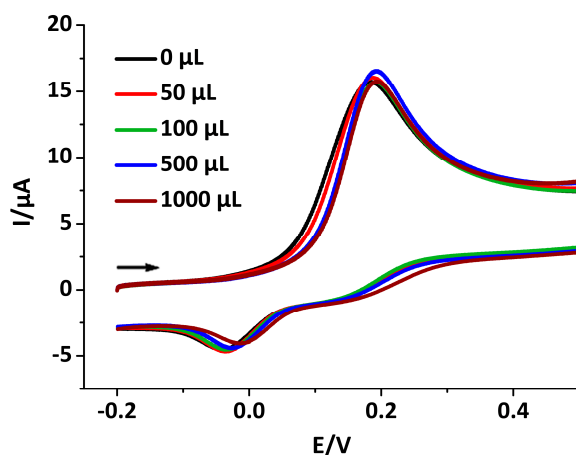
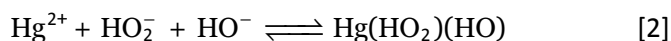


Figura 1. Voltagramas cíclicos de disoluciones de SE 0.5 mM en presencia de cantidades crecientes de H_2O_2 $5 \cdot 10^{-2}$ M. Volumen celda 10 mL, pH 10.51.

La inexistencia de efectos relevantes sobre la onda registrada mediante VC, utilizando como electrodo de trabajo un ECV, se ve reflejada en la constancia de la intensidad del pico durante un periodo de tiempo de 30 minutos, inclusive a concentraciones de H_2O_2 diez veces superiores al antioxidante. Este fenómeno precisa considerar reacciones adicionales que expliquen la disminución de la onda de oxidación del H_2O_2 en presencia de AO. Dado que la interacción entre AO y radicales resulta un hecho incuestionable, es necesaria la presencia de radicales para poder explicarla. Por consiguiente, la única posibilidad recae en la formación de radicales en el rango de potenciales del

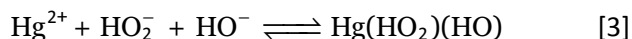
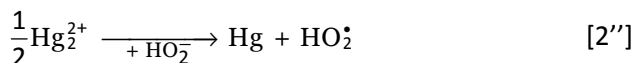
pico anódico del H_2O_2 sobre el EGM. Es evidente que el electrodo de trabajo debe desempeñar un papel importante en el proceso de electrooxidación asociado con la presencia de especies adsorbidas en su superficie, provocando una disminución del potencial de oxidación del H_2O_2 (ΔE de los procesos de adsorción). En consecuencia, sería necesario incluir las especies adsorbidas en el mecanismo simplificado de la oxidación anódica del H_2O_2 expuesto en el Capítulo V.^[11]

Otro enfoque posible es suponer que se generan radicales una vez formado el complejo de Hg, probablemente, a través de transferencias electrónicas intramoleculares:



En ausencia de antioxidante, la reacción [3] debe producirse a nivel de trazas, mientras que la adición de AO en cantidades crecientes supondrá un desplazamiento del equilibrio de la última etapa hacia la formación de los radicales, como consecuencia de la interacción con el AO y, por consiguiente, un desplazamiento hacia la derecha del proceso global. En tal caso, la adición de AO conllevaría un aumento en la corriente de pico registrado en VPD, en contradicción con los resultados experimentales obtenidos.

La oxidación anódica del mercurio implica tanto iones $\text{Hg}(\text{II})$ como $\text{Hg}(\text{I})$ en equilibrio con los complejos formados con los iones cloruros o bromuros presentes en disolución^[12] a valores de potenciales tan sólo 0.1 - 0.2 V más positivos que el pico de oxidación analizado. Este comportamiento resulta común en los procesos redox que involucran iones metálicos donde las transferencias de electrones son de un único electrón y el estado redox de los iones aumenta o disminuye en una unidad.^[13] Por tanto, a raíz de lo citado, parece razonable pensar que los iones $\text{Hg}(\text{I})$ se generan tras la primera transferencia electrónica, posibilitando la existencia de las siguientes reacciones:



En este caso, la ausencia de AO implica que la reacción [2''] tenga lugar a nivel de trazas; en cambio, su adición genera una interacción con el radical HO_2^\bullet , producido en esta misma etapa. Es decir, disminuye la concentración de los iones $\text{Hg}(\text{I})$ necesarios para originar los iones $\text{Hg}(\text{II})$ y, en consecuencia, la corriente de oxidación registrada. Este proceso permite explicar los resultados experimentales obtenidos. En primer lugar, el área del pico en VPD disminuye a medida que aumenta la concentración de AO desde un valor correspondiente a una transferencia bielectrónica (oxidación del Hg a iones $\text{Hg}(\text{II})$ a través de iones $\text{Hg}(\text{I})$, seguido de la formación del complejo mixto) hasta el valor característico de una reacción de transferencia monoelectrónica (oxidación del Hg a iones $\text{Hg}(\text{I})$, seguido por el radical HO_2^\bullet y posterior reacción con el AO), es decir, hasta un valor del área de pico no inferior al 50% de la original. En segundo lugar, la semianchura del pico cambia, desde el valor propio de un proceso bielectrónico, al valor correspondiente a un proceso que implica la transferencia de un único electrón (Capítulo V).

Al igual que en el capítulo anterior, las relaciones i-E, para el proceso descrito, pueden obtenerse mediante el uso de la aproximación de difusión convectiva y las condiciones del estado estacionario, así como la aproximación de la capa de difusión de Nernst. Sin embargo, las ecuaciones asociadas a la corriente límite como función de la concentración de AO y las constantes de equilibrio y velocidad de la reacción [2''] resultan muy complejas, siendo imposible su linearización. Es obvio que la velocidad de tales reacciones debe aumentar a medida que se incrementan las constantes de velocidad y, por consiguiente, la disminución de la corriente límite, o bien, del área del pico VPD, debe ser mayor a menor concentración de AO.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A raíz de lo expuesto, el enfoque realizado por Gorjanović y Potkonjak y sus respectivos colaboradores^[7-9] parece apropiado para la evaluación de la actividad captadora de radicales de los AO estudiados. En estos trabajos se utilizó la pendiente de la parte lineal de la curva obtenida, en la representación gráfica del porcentaje de disminución de la corriente polarográfica, frente a la cantidad de compuesto antioxidante individual o al volumen de muestras antioxidantes complejas. Los resultados la acreditan como la forma más relevante y precisa de expresar la actividad antioxidante de muestras con grandes diferencias de actividad. La VPD es una técnica diferencial, lo que implica que el parámetro proporcional a la concentración de la especie oxidada o reducida sobre la superficie del electrodo es el área de pico.^[12] Al contrario de lo que ocurre con la corriente límite polarográfica, la intensidad de pico depende del mecanismo de reacción, de la concentración, del pH, de la temperatura y de la fuerza iónica. Los cambios en la semianchura del pico VPD, con la adición de AO, implican cierto cambio en el mecanismo oxidativo, así, el cambio de intensidad refleja no sólo la dependencia con la concentración de AO, sino también este cambio en la semianchura. Consecuentemente, el parámetro seleccionado para el estudio de la actividad antioxidante fue el área de pico VPD.

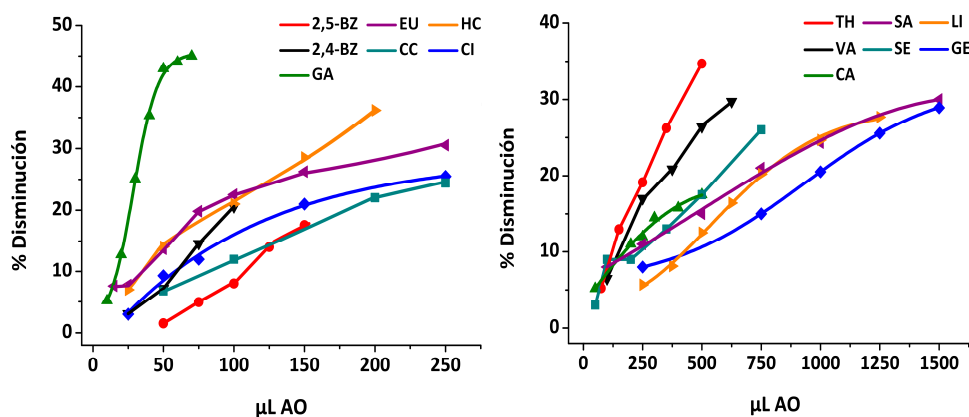


Figura 2. Disminución del área de pico de los voltagramas PD de la onda de oxidación obtenida para una solución $5 \cdot 10^{-4}$ M H_2O_2 sobre el EGM tras la adición de volúmenes crecientes de AO 5 mM.

La tasa de disminución del área del pico VPD, como una función del volumen (concentración) de AO añadido, no varía linealmente con la cantidad de AO añadida. No obstante, a pequeños porcentajes de disminución se puede usar la dependencia lineal como buena aproximación, tal y como refleja la Figura 3 para un porcentaje de disminución del área del pico VPD del 10%.

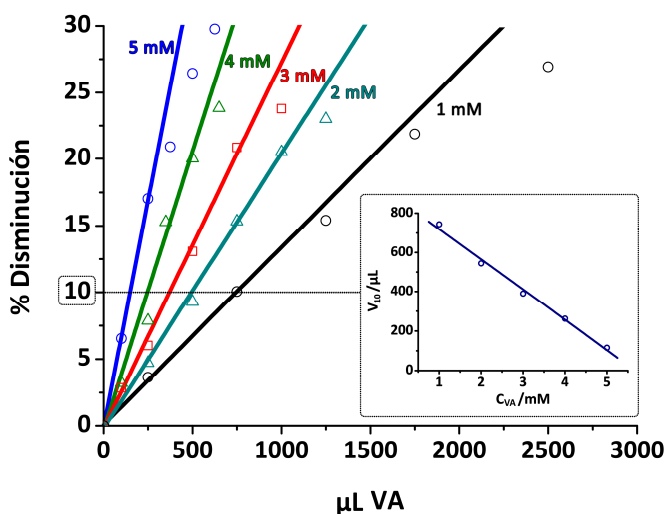


Figura 3. Disminución del área de pico para concentraciones variables de VA. Recuadro: representación gráfica de V_{10} vs concentración de VA para un 10% de disminución.

Los gráficos de la Figuras 2 y 3 permiten deducir que la dependencia de la disminución del área del pico registrado en los voltagramas PD para una disolución de H_2O_2 sobre EGM es prácticamente lineal a bajos porcentajes de disminución (<20%) y proporcional a la concentración inicial de AO. Por consiguiente, el valor de esta pendiente puede ser considerado como un criterio o parámetro adecuado en el análisis de la actividad antioxidante, de manera análoga, a los parámetros descritos en referencias bibliográficas recientes.^[6-8]

Los valores de las pendientes (m) obtenidas de los gráficos, reflejados en la Figura 2 para los distintos antioxidantes estudiados, se recogen en la Tabla 1. Adicionalmente se muestran los parámetros de actividad antioxidante utilizados en capítulos anteriores:

Compuestos	Acrón.	m [a]	μ_{10} (mL ⁻¹) [b]	1/C ₁₀ (mM ⁻¹)	ARP [c]	E _{p,a} (mV) [d]
eugenol	EU	0.259	25.6	51.2	5.0	411
carvacrol	CC	0.165	17.8	35.5	0.1	522
cinamaldehído	CI	0.128	16.5	33.0	-	588
timol	TH	0.080	9.1	18.2	0.8	529
sesamol	SE	0.056	5.8	11.5	5.5	343
3-hidroxicumarina	HC	0.250	24.8	49.5	-	763
salicilaldehído	SA	0.053	5.8	11.5	-	860
limoneno	LI	0.021	2.3	4.7	-	-
geraniol	GE	0.026	4.1	8.1	-	-
vainillina	VA	0.067	8.8	17.6	0.1	584
ácido cinámico	CA	0.059	6.6	13.2	-	-
2,5-dihidroxi_ benzaldehido	2,5-BZ	0.054	11.2	22.4	17.5	202
2,4-dihidroxi_ benzaldehido	2,4-BZ	0.147	20.0	44.5	-	841
ácido gálico	GA	0.440	45.5	91.1	8.5	274
α -pineno	α -PI	0.103	9.9	19.9	0.1	-
β -pineno	β -PI	0.035	4.3	8.6	-	-

Tabla 1. Parámetros de actividad antioxidante. [a] I.C = $\pm 1\%$ del valor promedio de m. [b] C_{AO} = 5 mM. [c] I.C = 0.5% del valor promedio del ARP. [d] I.C de los valores de E_{p,a} < ± 4 mV.

Hasta el momento, en los Capítulos IV y V, la actividad antioxidante se ha determinado mediante diversas metodologías y se han presentado los distintos resultados obtenidos para compuestos antioxidantes individuales con una serie de parámetros diferentes. La correlación existente entre los parámetros m y μ_{10} (Figura 4) indica que ambos parámetros presentan la misma clase de información por lo que pueden ser utilizados indistintamente. Por el contrario, no se ha encontrado una correlación evidente entre los parámetros ARP y 1/C₁₀ o E_{p,a} y 1/C₁₀.

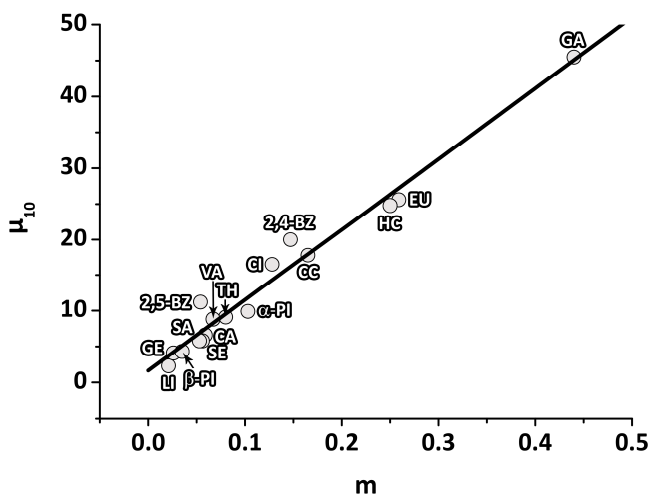


Figura 4. Correlación entre los parámetros m y μ_{10} .

Conscientes del objetivo final de la investigación, esto es, implementar la metodología electroquímica descrita sobre muestras reales, resulta necesario avanzar en el estudio de la complejidad de las muestras a analizar, dado el elevado número y variedad de compuestos antioxidantes que presentan las muestras reales en su composición química. Afortunadamente, la metodología electroquímica aplicada, basada en la interacción del AO con el radical hidropéroxido, puede extenderse fácilmente a mezclas de “n” antioxidantes donde la reacción [2’], en la que tiene lugar la formación del radical HO_2^{\bullet} , consistiría en “n” reacciones paralelas. Así, y de manera previa al estudio de extractos acuosos de especias, se procedió a establecer la actividad de captura radical de mezclas sintéticas de 2 y 3 componentes, constituidas por antioxidantes previamente analizados de manera individualizada (eugenol, timol, sesamol, vainillina y limoneno), lo que contribuyó, a su vez, a observar la existencia, o no, de sinergia antioxidante.

La selección de los AO presentes en las mezclas fue realizada en función de sus actividades antioxidantes. El resultado fue un conjunto heterogéneo de compuestos con elevada, moderada y reducida actividad; asimismo, se determinaron los valores de μ_{10} de mezclas con rangos de concentraciones variables (Tabla 2).

Mezcla	eugenol ^[a]	limoneno ^[a]	sesamol ^[a]	timol ^[a]	vainillina ^[a]	μ_{10} (mL ⁻¹) ^[b]
1	2.50	2.50	0	0	0	14.57
2	0	0.20	0	0.80	0	1.77
3	0	0.60	0	0.40	0	1.32
4	0	0.40	0	0.60	0	1.25
5	0	1.75	0	0	3.25	7.36
6	1.00	4.00	0	0	0	7.10
7	1.00	2.00	0	1.50	0	9.31
8	1.00	2.00	0	0	0	8.30
9	0	4.00	0	0	1.00	5.50
10	0	2.50	2.50	0	0	4.67
11	0.50	0	0.75	0.50	0	2.75

Tabla 2. Parámetro μ_{10} de mezclas de antioxidantes. ^[a] Concentración de antioxidante expresada en mM. ^[b] I.C. = $\pm 1\%$ del valor promedio.

La capacidad antioxidante de las mezclas está intrínsecamente relacionada con las actividades de captura radical de los AO individuales que las componen. Sin embargo, el grado de concentración en el que se encuentra cada uno de ellos puede resultar un factor crucial. Así, un antioxidante con alta actividad como el eugenol, presente en pequeñas concentraciones, podría contribuir a la actividad global de la mezcla en menor medida que un antioxidante de menor actividad, por ejemplo, el limoneno, pero que estuviera presente en una concentración mayor.

Dado que los valores de μ_{10} para disminuciones de área del pico voltamétrico del 10 % son proporcionales a la concentración de AO, tal y como se refleja en la Figura 3, se normalizó el valor de μ_{10} para cada antioxidante a una concentración de 1 mM, a partir de los valores recogidos en la Tabla 1 para una concentración de AO de 5 mM. Por tanto, se determinaron los valores teóricos de μ_{10} para cada una de las mezclas mediante la ecuación [4].

$$\mu_{10}^t = \frac{\sum(C_{AO} \cdot \mu_{10})}{5} \quad [4]$$

Si se representan los valores de actividad antioxidante experimentales frente a los valores teóricos de las mezclas analizadas (Tabla 2), μ_{10} y μ_{10}^t respectivamente,

se deduce, a partir de la correlación lineal obtenida, próxima a la unidad (1.1), que dicho parámetro es aditivo para la mayoría de las mezclas. Es decir, el valor global del mismo para una mezcla de “n” componentes está constituido por la suma de los valores de μ_{10} de los antioxidantes individuales que la componen bajo las mismas condiciones experimentales de análisis. En cambio, las mezclas 8 y 9 presentan un valor de actividad antioxidante experimental superior al valor teórico calculado, lo que implica la existencia de efectos sinérgicos entre los distintos antioxidantes que la componen. De manera opuesta, la mezcla 11 muestra un efecto antagónico significativo (Figura 5).

Los efectos sinérgicos se han considerado para aquellas mezclas en las cuales el valor de la actividad antioxidante experimental supera al valor teórico en un 20%. De manera análoga, se ha considerado que existen efectos antagónicos cuando el valor de la actividad antioxidante experimental es como mínimo un 20% inferior al valor teórico. Las situaciones intermedias se corresponden con efectos aditivos.

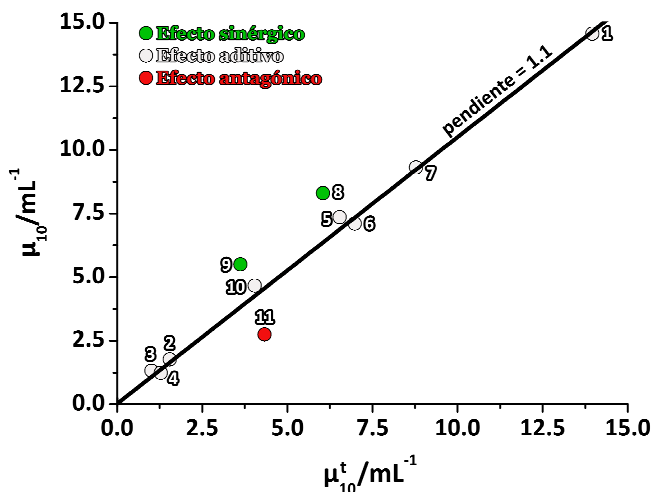


Figura 5. Clasificación de las muestras antioxidantes en base a la presencia de efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos.

Dado que el número de experimentos es reducido y que las distintas mezclas antioxidantes, a excepción de dos mezclas terciarias, están constituidas tan sólo por dos componentes, la afirmación de efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos en mezclas de mayor complejidad de esta familia de compuestos antioxidantes naturales de bajo peso molecular, resulta precipitada e indujo a la realización

de un estudio más amplio y complejo basado en la aplicación de diseños experimentales (Capítulo VII).

Finalizado este primer estudio sobre mezclas sintéticas, se extendieron las mediciones del parámetro μ_{10} a extractos acuosos de cinco especias: orégano, clavo de olor, tomillo, canela y nuez moscada (Figura 6). Adicionalmente, se determinaron sus valores de ARP por el método de captura del radical DPPH[•], así como el registro de sus respectivos voltagramas cíclicos, los cuales resultaron complejos de analizar al presentar picos de oxidación próximos que impedían, en ocasiones, establecer un valor característico del $E_{p,a}$ del extracto analizado.

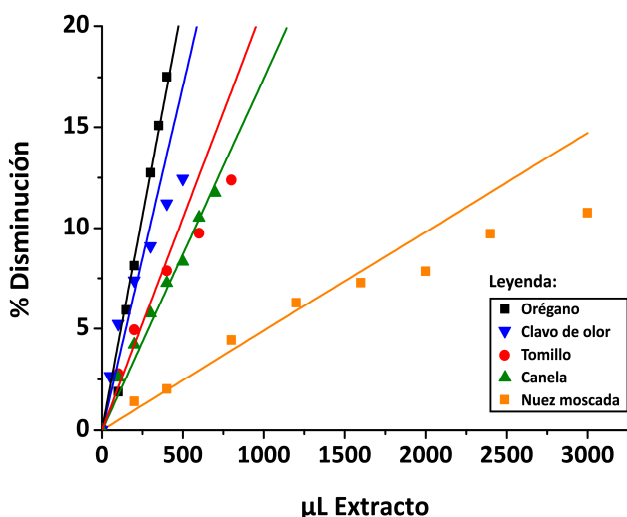


Figura 6. Disminución del área VPD de la disolución $5 \cdot 10^{-4} \text{ M H}_2\text{O}_2$ con la adición de volúmenes crecientes de disoluciones antioxidantes: extractos acuosos de las especias estudiadas.

Los resultados obtenidos para los extractos acuosos analizados, así como sus principales antioxidantes y el porcentaje de abundancia relativo al aceite esencial de cada uno de ellos, se ilustran en la Tabla 3:

Especies	V ₁₀ (μL)	μ_{10} (mL^{-1})	W ₅₀ /10 ⁻² (mg)	ARP (mg^{-1})	Antioxidantes principales ^[14]	
Orégano	23.1	43.3	4.6	21.8	<i>p</i> -cimeno timol carvacrol	12% 5% 49%
Clavo de olor	32.4	30.9	6.2	16.0	β -cariofileno eugenol acetileugenol	7% 83% 8%
Tomillo	51.7	19.3	19.1	5.3	<i>p</i> -cimeno linalol timol	27% 6% 46%
Canela	56.8	17.6	6.2	16.2	β -cariofileno cinamaldehído eugenol	5% 68% 7%
Nuez moscada	219.2	4.6	21.9	4.6	α -pineno β -pineno sabineno terpinen-4-ol	21% 15% 19% 4%

Tabla 3. Parámetros antioxidantes V₁₀, μ_{10} , W₅₀ y ARP. Principales antioxidantes presentes en los AE de las especias estudiadas.

En la Figura 7 se muestra la relación entre los parámetros μ_{10} y ARP. Como puede verse, pese a que hay una buena correlación en tres de los casos, en los otros dos (tomillo y canela) esta correlación no existe, de modo que los extractos acuosos de especias aparecen como más o menos reactivos frente a ROS que frente al radical DPPH[•]. De nuevo, esta aproximación, que implica radicales realmente generados en los organismos vivos, debería reflejar mejor el carácter antioxidante que las determinaciones cinéticas con radicales sintéticos, como el ensayo de captura del radical DPPH[•] o de Trolox.

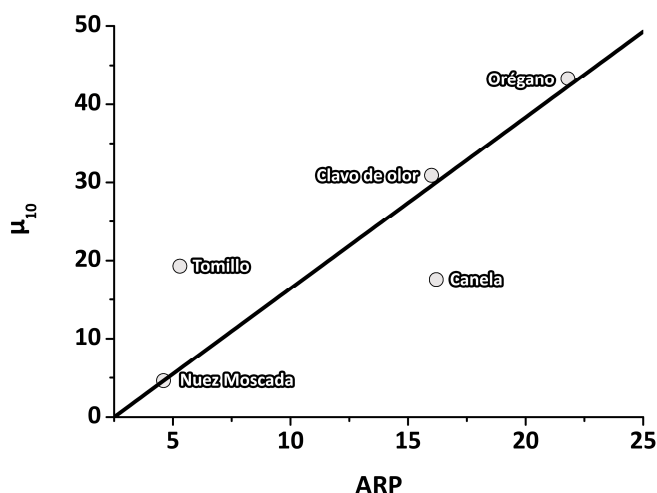


Figura 7. Correlación entre los parámetros ARP y μ_{10} de los extractos acuosos de las especias estudiadas.

A raíz de los resultados obtenidos, en general, la secuencia de valores de μ_{10} está relacionada con el contenido en antioxidantes de las distintas especias. No obstante, es importante tener en consideración que tales contenidos se corresponden con sus respectivos aceites esenciales y no con sus extractos acuosos,^[14] por lo que éstos deben variar según el modo de extracción aplicado.

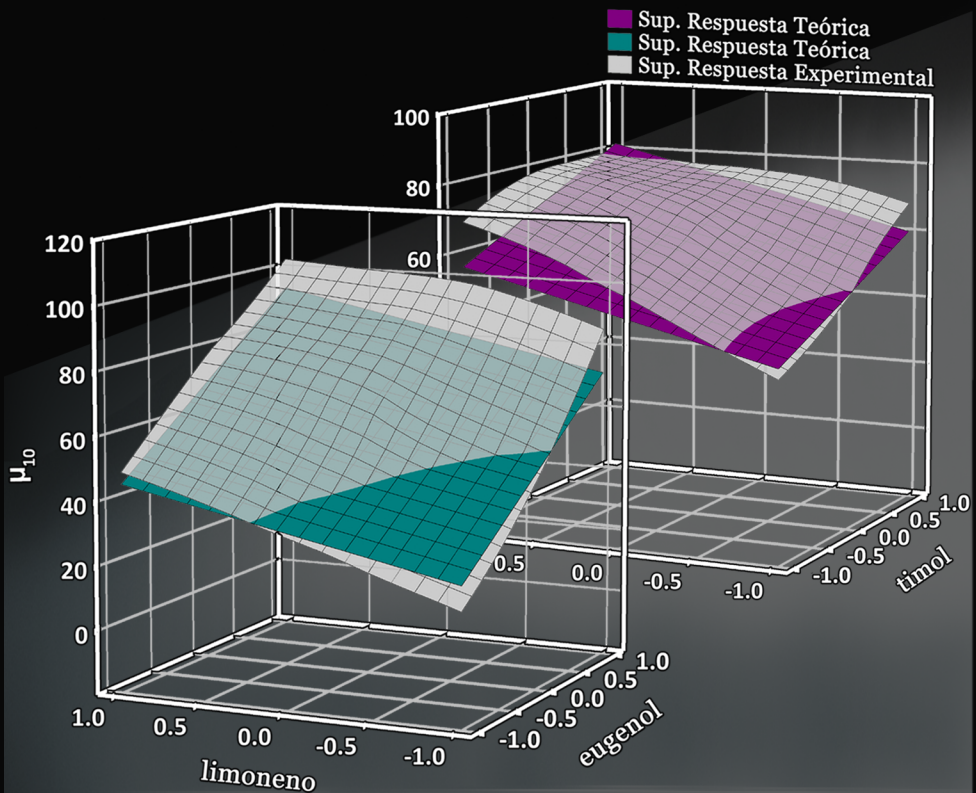
4. BIBLIOGRAFÍA

1. Sužnjević, D.Ž.; Pastor, F.T.; Gorjanović, S.Ž. Polarographic study of hydrogen peroxide anodic current and its application to antioxidant activity determination. *Talanta*. **2011**, 85, 1398-1403.
2. Gorjanović, S.Ž.; Novaković, M.M.; Potkonjak, N.I.; Leskošek-Čukalović, I.; Sužnjević, D.Ž. Application of a novel antioxidative assay in beer analysis and brewing process monitoring. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 744-751.
3. Gorjanović, S.Ž.; Novaković, M.M.; Potkonjak, N. I.; Sužnjević, D.Ž. Antioxidant activity of wines determined by a polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenge. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 4626-4631.
4. Gorjanović, S.Ž.; Novaković, M.M.; Vukosavljević, P.V.; Pastor, F.T.; Tešević, V.V.; Sužnjević, D.Ž. Polarographic assay based on hydrogen peroxide

- scavenging in determination of antioxidant activity of strong alcohol beverages. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 8400-8406.
5. Novaković, M.M.; Stevanović, S.M.; Gorjanović, S.Ž.; Jovanovic, P.M.; Tešević, V.V.; Janković, M.A.; Sužnjević, D.Ž. Changes of hydrogen peroxide and radical-scavenging activity of raspberry during osmotic, convective, and freeze-drying. *J. Food Sci.* **2011**, 76, 663-668.
 6. Potkonjak, N.I.; Veselinović, D.S.; Novaković, M.M.; Gorjanović, S.; Pezo, L.; Sužnjević, S.Ž. Antioxidant activity of propolis extracts from Serbia: a polarographic approach. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, 50, 3614-3618.
 7. Gorjanović, S.; Komes, D.; Pastor, F.T.; Belščak-Cvitanović, A.; Pezo, L.; Hečimović, I.; Sužnjević, S.Ž. Antioxidant capacity of teas and herbal infusions: polarographic assessment. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 9573-9580.
 8. Gorjanović, S.; Alvarez-Suarez, J.M.; Novaković, M.M.; Pastor, F.T.; Pezo, L.; Battino, M.; Sužnjević, S.Ž. Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. *J. Food Compos. Anal.* **2013**, 30, 13-18.
 9. Kikuchi, K.; Murayama, T. Polarographic anodic wave of hydrogen peroxide in alkaline solutions. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, 49, 1554-1556.
 10. McKillop, A.; Young, D. W. Oxidation of phenols and hydroquinones by mercury(II) trifluoroacetate and mercury(II) oxide. *Synth. Commun.* **1977**, 7, 467-474.
 11. Palma, A.; Ruiz Montoya, M.; Arteaga, J.F.; Rodríguez Mellado, J.M. Analysis of the interaction of radical scavengers with ROS electrogenerated from hydrogen peroxide. *J. Electrochem. Soc.* **2013**, 160, 213-218.
 12. Behr, B.; Taraszewska, J. On the anodic oxidation of mercury in KCl solutions. *J. Electroanal. Chem.* **1968**, 19, 373-384.
 13. Bard, A.J.; Faulkner, L.R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; Wiley: Hoboken, NJ, USA, **2000**.
 14. Tomaino, A.; Cimino, F.; Zimbalatti, V.; Venutti, V.; Sulfaro, V.; De Pasquale, A.; Saija, A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chem.* **2005**, 89, 549-554.

CAPÍTULO VII

APLICACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL AL ESTUDIO SINÉRGICO DE MEZCLAS ANTIOXIDANTES SINTÉTICAS



1. INTRODUCCIÓN

El sistema antioxidante del organismo humano es extremadamente complejo, no sólo por el elevado número de compuestos y enzimas antioxidantes que lo componen, sino por la existencia de una gran diversidad de interacciones entre ellos.^[1] La acción realizada por un antioxidante en presencia de otros no depende exclusivamente de su concentración y reactividad hacia las especies radicales, sino que está influenciada por posibles interacciones con el resto de antioxidantes adyacentes, traduciéndose, en múltiples ocasiones, en un efecto final diferente al que se hubiera predicho para los mismos de manera independiente.^[2,3]

Actualmente, existe un gran desconocimiento sobre la naturaleza de muchas de estas interacciones. Incluso cuando son conocidos los efectos resultantes de la combinación de dos antioxidantes, la adición de un tercero hace que los efectos finales sean inciertos, requiriéndose un continuo estudio sobre bases empíricas. Por consiguiente, con el fin de esclarecer de manera exhaustiva la existencia de interacciones en mezclas sintéticas constituidas por antioxidantes naturales previamente estudiados (eugenol, timol, sesamol y limoneno) y haciendo hincapié en la búsqueda de efectos sinérgicos, se optó por la realización de un diseño experimental factorial semi-completo con cuatro variables independientes y tres niveles de significación (-1, 0, +1) respecto de una única variable respuesta. Este enfoque permite el estudio del total de las posibles combinaciones existentes y sirve, además, para analizar el efecto del conjunto de interacciones que tienen lugar entre las distintas variables independientes, variadas de manera conjunta, en la respuesta analizada: la actividad antioxidante global de las mezclas, determinada mediante el método electroquímico desarrollado en el Capítulo VI. Esta metodología se fundamenta en el estudio en medio básico de la disminución de la onda anódica del H_2O_2 sobre el EGM (asociada a la oxidación propia del Hg a Hg^{2+} y a la posterior formación de un complejo mixto con iones HO_2^- y HO^-) en presencia de antioxidantes. Asimismo, permite visualizar, a través de gráficos tridimensionales de superficies de respuesta, posibles efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos entre los diferentes antioxidantes que componen las mezclas analizadas..

2. EXPERIMENTAL**2.1. SELECCIÓN DE ANTIOXIDANTES**

El estudio sinérgico exhaustivo realizado mediante el desarrollo y ejecución de un diseño experimental (DoE) tiene como finalidad completar el estudio previo descrito en el Capítulo VI sobre mezclas sintéticas binarias y terciarias. Este nuevo estudio pretende establecer conclusiones con un mayor rigor acerca de las distintas interacciones observadas.

Para abordar la investigación se han elegido 4 de los 5 antioxidantes del estudio sinérgico anterior (Capítulo VI), limoneno, eugenol timol y sesamol, todos ellos seleccionados en función de sus respectivas actividades antioxidantes, originando un conjunto heterogéneo de compuestos con elevada, moderada y reducida actividad. La exclusión del 5º antioxidante responde fundamentalmente a una cuestión estadística, dado que el número de experimentos asociado a cinco variables independientes, constituidas por cada uno de los antioxidantes seleccionados a tres niveles de concentración, es extremadamente elevado (3^5). Por consiguiente, se decidió excluir la vainillina dado que presenta gran similitud en su actividad antioxidante con respecto al timol (valor de $\mu_{10} = 8.8$ y 9.1 , respectivamente para una concentración de AO de 0.5 mM), siendo éste último más interesante al ser uno de los componentes presente en la única mezcla que presentó efectos antagónicos significativos.

2.2. ELECCIÓN DEL RANGO DE CONCENTRACIÓN

En referencia a las concentraciones empleadas (Tabla 1), el establecimiento de tres niveles de significación en el DoE reduce sustancialmente la variabilidad de dicha variable con respecto a las presentes en las mezclas del estudio previo. El rango de concentración existente entre los tres niveles varía desde la total ausencia de antioxidante (-1), hasta el valor máximo asignado para cada uno de ellos en función de su actividad (+1), siendo mayor para el antioxidante menos activo, limoneno, y menor para el de mayor actividad, eugenol; sin olvidar el valor intermedio de los mismos (0).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar las posibles interacciones sinérgicas o antagónicas entre los distintos componentes antioxidantes presentes en mezclas sintéticas, se realizó un diseño experimental factorial semi-completo constituido por 45 de los 81 puntos estadísticos que configuran el diseño factorial completo de 4 factores y 3 niveles de significación para cada uno de ellos (3^4). La Tabla 1 ilustra los puntos estadísticos seleccionados, así como las concentraciones de los antioxidantes que componen cada una de las muestras analizadas y los valores de actividad antioxidante obtenidos experimental y teóricamente, μ_{10} y μ_{10}^t respectivamente.

Mezcla	Punto estadístico	limoneno eugenol timol sesamol				$\mu_{10}^{[a]}$	μ_{10}^t
		C/mM	C/mM	C/mM	C/mM		
1	(-1,-1,+1,-1)	0	0	1.5	0	27.8	34.3
2	(-1,+1,+1,-1)	0	1	1.5	0	103.5	82.5
3	(-1,0,+1,0)	0	0.5	1.5	0.75	56.0	59.9
4	(-1,+1,+1,+1)	0	1	1.5	1.5	120.5	85.5
5	(-1,-1,+1,+1)	0	0	1.5	1.5	65.0	37.3
6	(-1,+1,0,0)	0	1	0.75	0.75	111.0	71.5
7	(-1,0,0,0)	0	0.5	0.75	0.75	29.6	47.4
8	(-1,0,0,+1)	0	0.5	0.75	1.5	44.4	48.9
9	(-1,0,0,-1)	0	0.5	0.75	0	39.8	45.9
10	(-1,-1,0,0)	0	0	0.75	0.75	21.2	23.3
11	(-1,-1,-1,-1)	0	0	0	0	0.0	9.3
12	(-1,+1,-1,-1)	0	1	0	0	48.1	57.5
13	(-1,0,-1,0)	0	0.5	0	0.75	34.6	34.9
14	(-1,+1,-1,+1)	0	1	0	1.5	70.0	60.5
15	(-1,-1,-1,+1)	0	0	0	1.5	18.7	12.3
16	(0,-1,+1,-1)	2	0	1.5	0	30.1	45.1
17	(0,+1,+1,-1)	2	1	1.5	0	90.5	93.3
18	(0,0,+1,0)	2	0.5	1.5	0.75	79.5	70.7
19	(0,+1,+1,+1)	2	1	1.5	1.5	118.0	96.3

20	(0,-1,+1,+1)	2	0	1.5	1.5	49.5	48.1
21	(0,+1,0,0)	2	1	0.75	0.75	98.5	82.3
22	(0,0,0,0)	2	0.5	0.75	0.75	69.0	58.2
23	(0,0,0,+1)	2	0.5	0.75	1.5	65.8	59.7
24	(0,0,0,-1)	2	0.5	0.75	0	74.6	56.7
25	(0,-1,0,0)	2	0	0.75	0.75	30.0	34.1
26	(0,-1,-1,-1)	2	0	0	0	10.1	20.1
27	(0,+1,-1,-1)	2	1	0	0	75.0	68.3
28	(0,0,-1,0)	2	0.5	0	0.75	39.3	45.7
29	(0,+1,-1,+1)	2	1	0	1.5	103.0	71.3
30	(0,-1,-1,+1)	2	0	0	1.5	27.3	23.1
31	(+1,-1,+1,-1)	4	0	1.5	0	61.2	55.9
32	(+1,+1,+1,-1)	4	1	1.5	0	81.5	104.1
33	(+1,0,+1,0)	4	0.5	1.5	0.75	70.4	81.5
34	(+1,+1,+1,+1)	4	1	1.5	1.5	110.5	107.1
35	(+1,-1,+1,+1)	4	0	1.5	1.5	59.4	58.9
36	(+1,+1,0,0)	4	1	0.75	0.75	94.5	93.1
37	(+1,0,0,0)	4	0.5	0.75	0.75	82.5	69.0
38	(+1,0,0,+1)	4	0.5	0.75	1.5	93.0	70.5
39	(+1,0,0,-1)	4	0.5	0.75	0	68.5	67.5
40	(+1,-1,0,0)	4	0	0.75	0.75	52.6	44.9
41	(+1,-1,-1,-1)	4	0	0	0	31.9	30.9
42	(+1,+1,-1,-1)	4	1	0	0	94.5	79.1
43	(+1,0,-1,0)	4	0.5	0	0.75	65.0	56.5
44	(+1,+1,-1,+1)	4	1	0	1.5	116.0	82.1
45	(+1,-1,-1,+1)	4	0	0	1.5	47.8	33.9

Tabla 1. Experimentos del diseño experimental aplicado al estudio sinérgico de mezclas antioxidantes sintéticas. ^[a]I.C. = $\pm 1\%$ del valor promedio.

De acuerdo con los resultados descritos en el Capítulo VI (Figura 5) sobre el estudio de mezclas sintéticas, se aprecia una gran similitud en la tendencia de los

mismos, tal y como refleja la Figura 1. La correlación lineal de pendiente próxima, a la unidad en ambos casos, induce a pensar en un efecto global aditivo de las actividades antioxidantes individuales. Sin embargo, si se realiza un análisis individualizado de las mezclas es posible apreciar efectos sinérgicos y antagónicos reseñables. Ambos efectos han sido considerados únicamente en aquellas mezclas cuyos valores de actividad antioxidante experimental superan o disminuyen en más de un 20% sus respectivos valores teóricos.

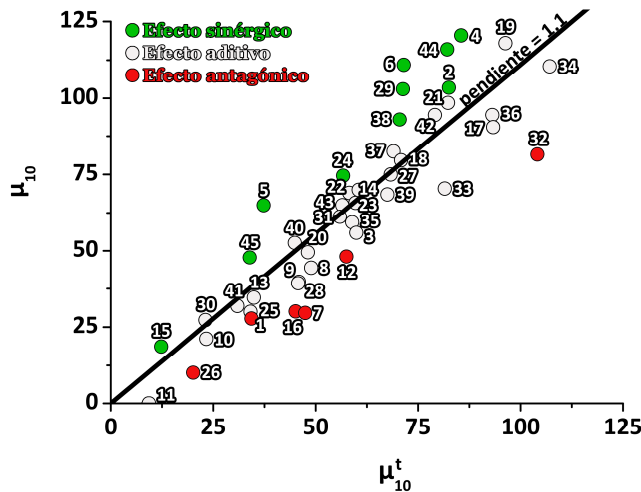


Figura 1. Clasificación de las mezclas antioxidantes del DoE en base a la presencia de efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos.

Este capítulo pretende avanzar en el estudio de las interacciones entre los distintos antioxidantes seleccionados más allá del simple hecho de vislumbrar evidencias experimentales de efectos sinérgicos y antagónicos. Por consiguiente, sobre el DoE establecido se han modelizado los parámetros independientes evaluados, permitiendo estimar los coeficientes del modelo matemático y la identificación de la significación estadística (parámetros R^2 y F) de las variables utilizando regresión polinómica entre dichas variables y la respuesta analítica obtenida (Capítulo X, Anexo 2.1). El resultado es la obtención del siguiente polinomio de primer grado:

$$\mu_{10} = 64.0 + 30.1 \cdot EU + 11.4 \cdot TH + 11.3 \cdot LI + 9.1 \cdot SE - 8.7 \cdot LI \cdot TI$$

Siendo EU, TH, LI y SE las concentraciones normalizadas de eugenol, timol, limoneno y sesamol respectivamente.

La ecuación de respuesta obtenida presenta un coeficiente de determinación aceptable ($R^2 > 0.95$) y un valor alto del coeficiente de distribución de Fisher-Snedecor ($F = 33.69$) con respecto a su valor crítico tabulado ($F_{Tab} = 2.61$). Por consiguiente, resulta extremadamente improbable que la relación observada entre las variables independientes sea producida por azar. La expresión matemática del polinomio desvela, en primera instancia, una mayor contribución del eugenol en el valor final de la actividad antioxidante de las mezclas, aproximadamente, su constante triplica a las obtenidas para el resto de antioxidantes. Timol y limoneno presentan una influencia similar y ligeramente superior a la del sesamol, cuya influencia estadística es baja. En segunda instancia, destaca la existencia de un término de carácter negativo dependiente del timol y limoneno, el cual genera una disminución de la actividad antioxidante global, únicamente en aquellas mezclas donde coexisten ambos antioxidantes.

Si se analiza la influencia estadística de las variables independientes, antioxidantes, sobre la variable dependiente considerada, actividad antioxidante global de la mezcla (Capítulo X, Anexo 2.2), es posible representar gráficamente, de manera muy visual, la variación de la actividad antioxidante en función de las concentraciones normalizadas de los antioxidantes implicados en las distintas mezclas del DoE; esto permite, a su vez, ponderar las influencias relativas, en porcentajes, para cada uno de los antioxidantes sobre dicha variación media de la actividad antioxidante (Figura 2).

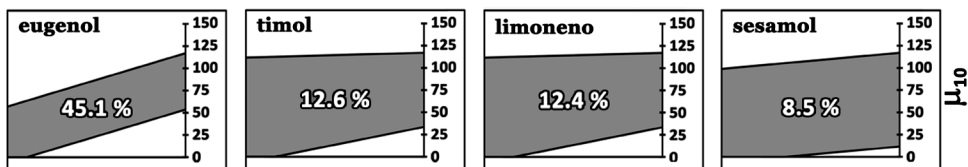


Figura 2. Variación de la variable dependiente en función de las variables independientes normalizadas. Influencia, en %, de los antioxidantes sobre el valor de μ_{10} en el conjunto de mezclas del DoE.

Los resultados muestran una influencia relativa del 45.1% para el eugenol, 12.6% y 12.4% para el timol y el limoneno respectivamente y un 8.5% para el

antioxidante de menor influencia, el sesamol. Los datos están en concordancia con los valores matemáticos asociados a las constantes polinómicas iniciales obtenidas para cada uno de los antioxidantes mencionados. A priori, resulta relativamente lógico pensar que el compuesto con mayor actividad antioxidante individual presente la mayor influencia en el valor final del parámetro μ_{10} , tal es el caso del eugenol; no obstante, igualmente lógico sería pensar el caso opuesto y, es ahí, cuando se aprecia que el limoneno, pese a ser el menos antioxidante de los cuatro compuestos que componen las distintas mezclas, presenta una influencia similar al timol, e incluso, superior al sesamol.

Si se representa el valor característico de μ_{10} de cada uno de los antioxidantes a una concentración de 0.5 mM y, de manera conjunta, la variación producida sobre dicha variable para cada antioxidante (a la misma concentración) ejercida por el total de las combinaciones del resto de componentes de las distintas mezclas del DoE (Figura 3), se comprueba que el compuesto con mayor contribución en el valor de μ_{10} de la mezcla, el eugenol, es quien sufre una menor variación asociada a la modificación de las concentraciones del resto de antioxidantes; este resultado es muy similar para el resto de componentes de las mezclas diseñadas (Figura 4). Finalmente es el sesamol, el cual presenta un valor de μ_{10} superior al limoneno, el componente ligeramente menos influenciado por el resto de antioxidantes.

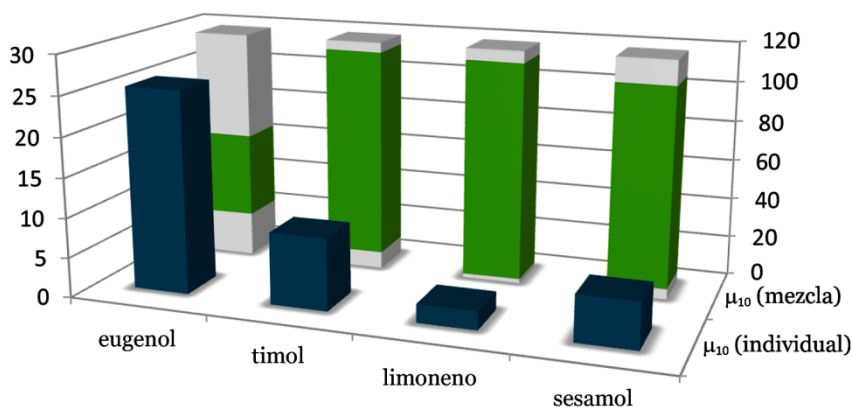


Figura 3. Actividad antioxidante individual, $C_{AO} = 0.5$ mM (azul). Variación de la influencia total de las interacciones ejercidas por el resto de componentes sobre el conjunto de mezclas del DoE (verde).

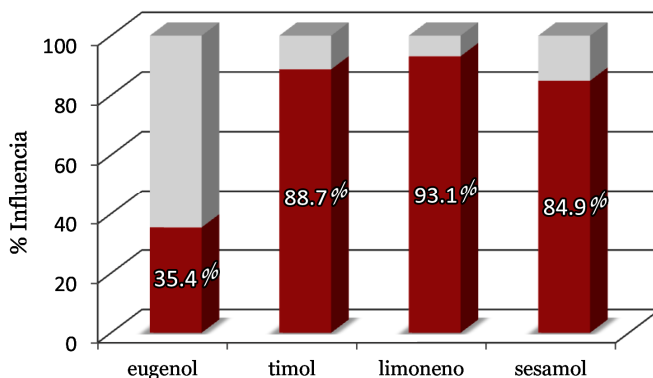


Figura 4. Influencia, en %, sobre la actividad antioxidante individual ($C_{AO} = 0.5 \text{ mM}$) asociada a las interacciones del resto de componentes sobre el conjunto de mezclas establecidas en el DoE.

Los datos cuantitativos de la influencia individual de los antioxidantes presentes en las mezclas del DoE sobre la actividad antioxidante global y sobre cómo son influenciados por el resto de componentes, aportan información relevante, pero poco visual, sobre las interacciones existentes debido a la presencia conjunta de los mismos. La metodología de superficie de respuesta (MSR), introducida por Box y Wilson,^[4] consiste en la utilización de un conjunto de técnicas estadísticas que permiten analizar y modelar la manera en la que la actividad antioxidante de las diferentes mezclas es influenciada por la presencia de EU, TH, LI y SE de manera visual a través de la representación gráfica tridimensional de superficies de respuesta. Este método persigue encontrar las posibles combinaciones de ellos que maximice, o bien, minimice el valor del parámetro μ_{10} con respecto al obtenido teóricamente, es decir, que permita identificar las mezclas donde hay presencia de efectos sinérgicos o antagónicos respectivamente.

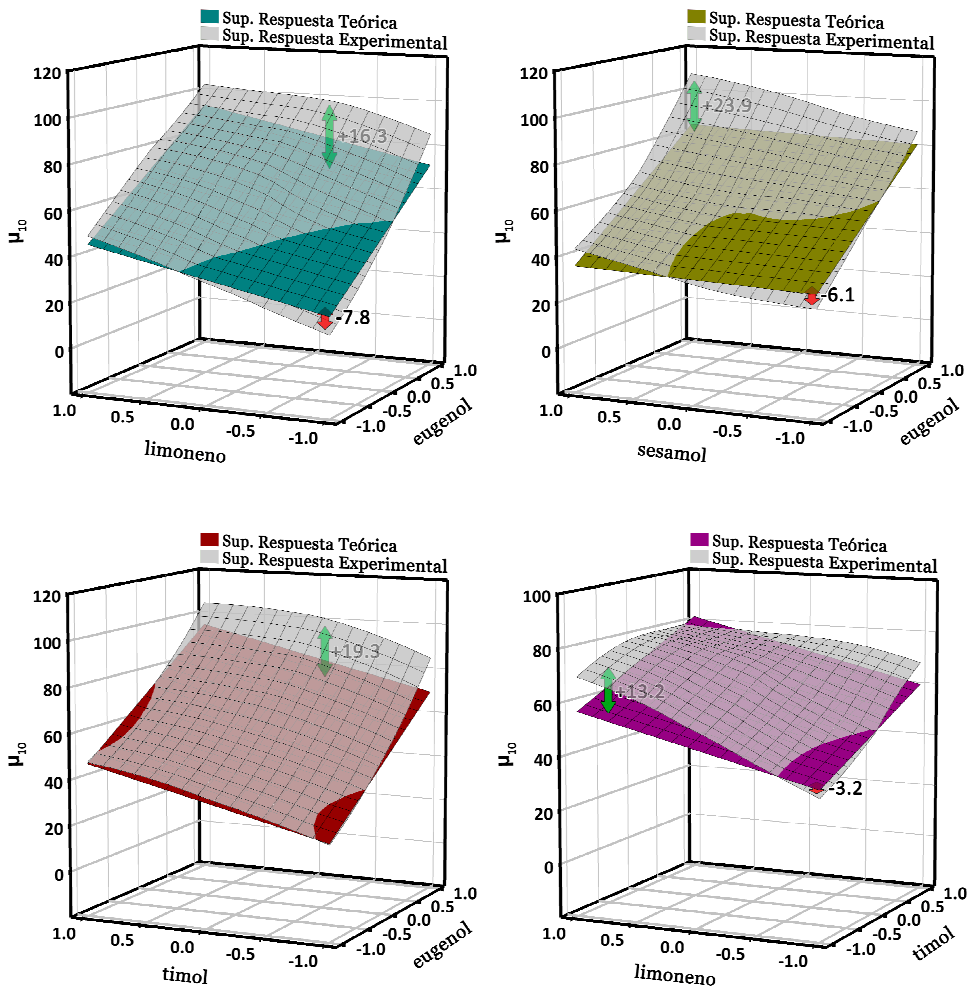
El ajuste y el análisis de una superficie de respuesta se facilita, en gran medida, con la elección apropiada del DoE. En este estudio concreto, un diseño de ajuste de modelos de segundo orden que consta de tres niveles para cada factor, otorga rotabilidad al diseño y es una propiedad fundamental cuando se desconoce la localización del punto (mezcla) óptimo de mayor sinergia. Así pues, tiene sentido utilizar este tipo de diseño ya que proporciona estimaciones precisas en todas las direcciones. En cambio, el diseño de ajuste para los valores de actividad antioxidante teóricos, definidos en el Capítulo VI como el sumatorio de los μ_{10}

individuales por la concentración de los antioxidantes presentes en las mezclas, se corresponde con un modelo de primer grado, dando como resultando un polinomio que presenta la siguiente ecuación:

$$\mu_{10} = 58.2 + 24.1 \cdot \text{EU} + 12.5 \cdot \text{TH} + 10.8 \cdot \text{LI} + 1.5 \cdot \text{SE}$$

donde EU, TH, LI y SE son nuevamente las concentraciones normalizadas de eugenol, timol, limoneno y sesamol, respectivamente.

La Figura 5 muestra la superposición de las superficies de respuesta originadas a partir de los polinomios teórico y experimental para las distintas combinaciones de los antioxidantes presentes en las mezclas establecidas en el DoE realizado:



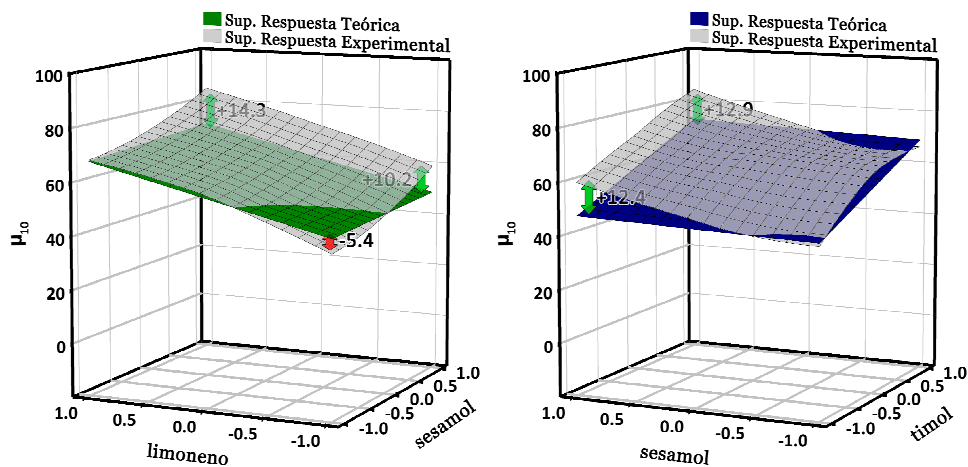


Figura 5. Efectos sinérgicos y antagonísticos observados en las distintas combinaciones de los antioxidantes presentes en las mezclas del DoE.

Los resultados muestran una tendencia similar cuando se combina el eugenol, compuesto de mayor actividad antioxidante, con el resto de antioxidantes, timol, limoneno y sesamol. Los mayores efectos sinérgicos se obtienen en las mezclas correspondientes a los valores normalizados medio-alto de eugenol con los valores medio-alto en los casos de limoneno y sesamol y para todo el rango de valores normalizados de timol. Los efectos antagonísticos, inexistentes en la combinación eugenol-timol, se observan para los valores normalizados bajos de eugenol y bajos de limoneno y sesamol respectivamente. El mayor efecto sinérgico se alcanza en las mezclas donde están presentes eugenol y sesamol en sus concentraciones más elevadas, donde se ve incrementado el valor de actividad antioxidante en 23.9 unidades (28.5%). Por el contrario, el efecto antagonístico superior se obtiene en la combinación eugenol-limoneno, donde disminuye la actividad antioxidante en 7.8 unidades (33.5%). Las combinaciones del resto de antioxidantes de menor actividad (timol, sesamol y limoneno) presentan efectos sinérgicos y antagonísticos inferiores, los cuales oscilan entre un 20.2 - 26.3% y un 8.6 - 11.8% respectivamente.

Centralizando el estudio en los efectos sinérgicos, las mayores contribuciones sinérgicas tienen lugar con la presencia de eugenol en la mezcla. La Figura 6 representa la superficie de respuesta teórica y experimental para todas las posibles combinaciones de los antioxidantes estudiados para los los 3 niveles normalizados de concentración del eugenol.

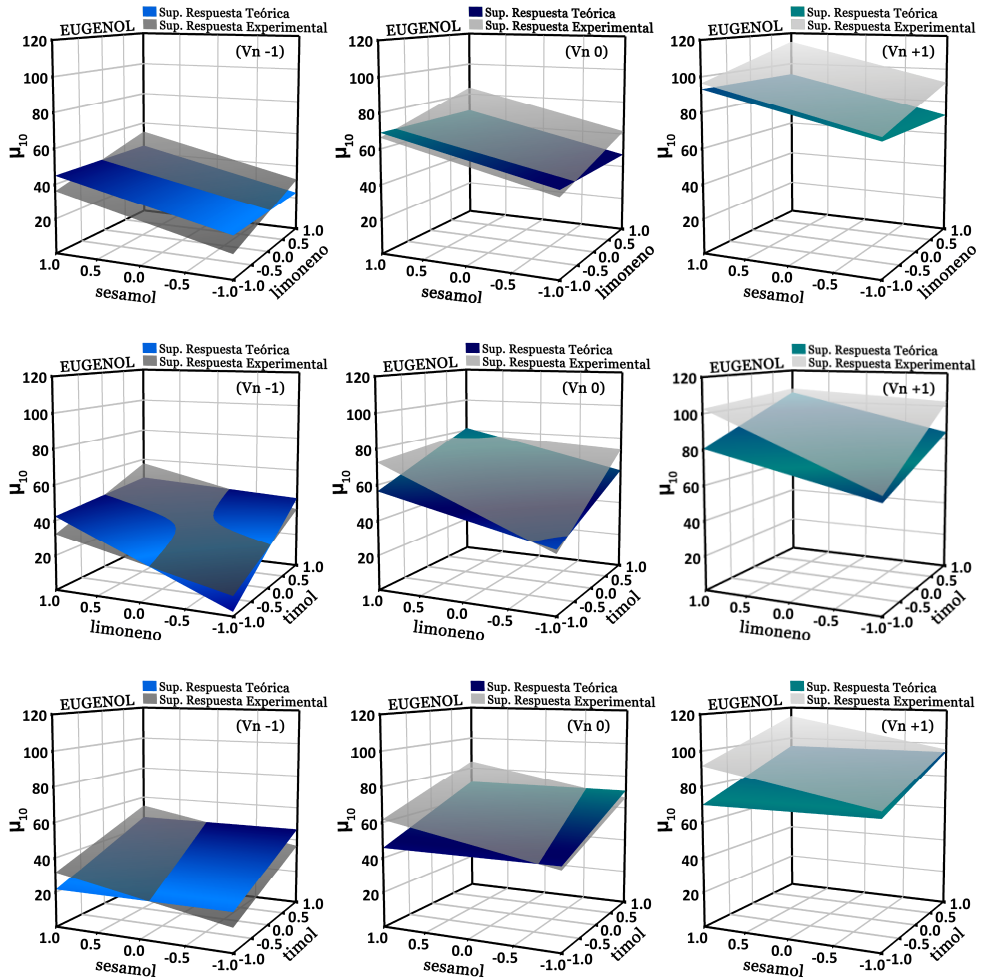


Figura 6. Influencia de la concentración de eugenol en la actividad antioxidante global de mezcla.

Los resultados obtenidos presentan una tendencia similar con independencia de los componentes antioxidantes combinados con el eugenol. Para los valores de concentración normalizados de eugenol medio e inferior ($V_n 0$ y -1) se observan efectos sinérgicos y antagonísticos, mientras que para el valor normalizado superior ($V_n +1$) tan sólo se aprecian efectos sinérgicos. El aumento de la concentración de eugenol en las distintas mezclas estudiadas lleva asociado un aumento progresivo no proporcional de la sinérgica global, acompañado de una disminución de los efectos antagonísticos, los cuales son inexistentes en los niveles de concentración superior.

Esta sinergia con el resto de antioxidantes debe estar relacionada con los mecanismos de oxidación y la posibilidad de interacción de los radicales generados. Probablemente, los radicales intermedios de la oxidación del eugenol actúen activando la producción de radicales del resto de los antioxidantes, lo cual les permite captar con mayor eficacia las ROS generadas en la oxidación del Hg/H₂O₂.

La elucidación de los mecanismos de oxidación de los antioxidantes debe, por tanto, ser muy útil para la interpretación de estos resultados.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Vertuani, S.; Angusti, A.; Manfredini, S. The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, 10, 1677-1694.
2. Marinova, E.; Toneva, A.; Yanishlieva, N. Synergistic antioxidant effect of α -tocopherol and myricetin on the autooxidation of tricylglycerols of sunflower oil. *Food Chem.* **2008**, 106, 628-633.
3. Aftab, N.; Vieira, A. Antioxidant activities of curcumin and combinations of this curcuminoid with other phytochemicals. *Phytother. Res.* **2010**, 24, 500-502.
4. Box, G.E.P; Wilson, K.G. On the experimental attainment of optimum conditions. *J. R. Stat. Soc. Series B.* **1951**, 13, 1-45.

CAPÍTULO VIII

IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA ELECTROQUÍMICA EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MUESTRAS REALES: TÉS E INFUSIONES



1. INTRODUCCIÓN

El método electroquímico desarrollado en la presente Tesis ha logrado excelentes resultados en el análisis de actividad antioxidante de compuestos puros en medio hidroetanólico, tanto de manera individualizada como formando parte de diversas mezclas sintéticas.^[1] Durante el transcurrir de la investigación, también se han obtenido resultados satisfactorios para extractos acuosos de especias y condimentos, principales fuentes alimentarias de los compuestos puros antioxidantes previamente analizados. Así pues, con la finalidad de justificar la validez del método sobre muestras reales, el presente capítulo abarca el estudio de actividad antioxidante de muestras con un interés alimentario relevante: extractos acuosos de té e infusiones comerciales, los cuales tienen una elevada complejidad en cuanto al número y diversidad de los compuestos antioxidantes que presentan.

La actividad antioxidante característica de los tés e infusiones se debe principalmente a los compuestos polifenólicos presentes en su composición, fundamentalmente flavan-3-oles, los cuales representan más del 90% de los flavonoides presentes en el té,^[2] siendo las catequinas su familia de antioxidantes más influyente: (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), (-)-epicatequina-3-galato (ECG), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epicatequina (EC), (-)-galocatequina (GC) y catequina (C).^[3-6]

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

2.1.1. VOLTAMETRÍA CÍCLICA

La voltametría cíclica puede proporcionar una medida rápida de los polifenoles fácilmente oxidables presentes en el té e infusiones.^[7-9] Los potenciales de oxidación registrados mediante VC de las muestras de té e infusiones analizadas reflejaron una actividad antioxidante reseñable, siendo superior a las obtenidas para la gran mayoría de los compuestos puros analizados en el Capítulo IV.

Las características electroquímicas de las principales catequinas presentes en el té manifiestan una fácil oxidación en un rango de potencial de 50 a 300 mV

(vs Ag/AgCl).^[7,10-11] Las galocatequinas, compuestos con tri-hidroxi sustitución del anillo B de la estructura flavan-3-ol (pirogalol), tienen potenciales formales de 74 a 109 mV, oxidándose aproximadamente 100 mV antes que las catequinas que poseen un grupo catecol (*orto*-difeno), o bien, un grupo galato, cuyos potenciales formales oscilan de 165 a 188 mV. La EGCG contiene un grupo pirogalol y un grupo galato, por lo que produce picos en ambos rangos potenciales; en cambio, la ECG presenta un grupo catecol y un grupo galato, generadores de una respuesta voltamétrica alrededor de 200 mV.^[7] Este segundo pico que presenta la onda voltamétrica es causado, además, por la oxidación de flavonoides como la rutina, la quercitina y la dihidroquercitina.^[12] No obstante, su contribución resulta insignificante debido a la baja concentración en la que están presentes en el té.^[13]

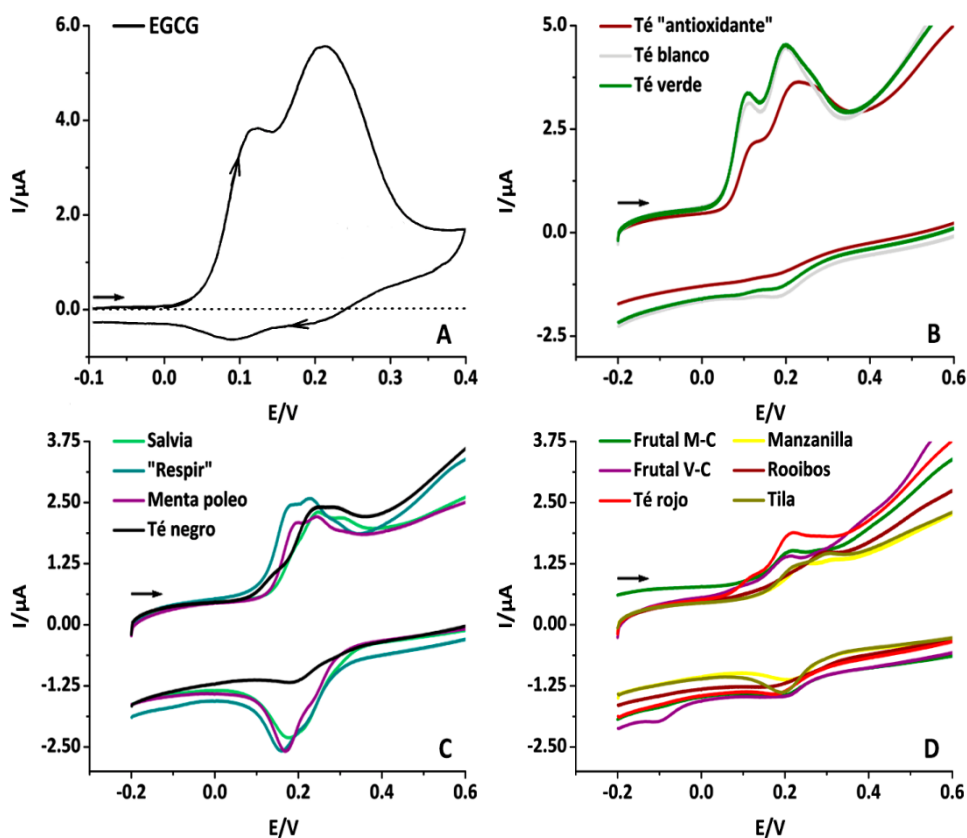


Figura 1. Voltagrama cíclico de EGCG 0.05 mM (A)^[7] y de extractos acuosos de tés e infusiones (B, C, D) a pH = 7.0 y $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

Si se compara el voltagrama cíclico de la EGCG adquirido de la referencia bibliográfica [3] con los obtenidos en la presente Tesis para las muestras de té verde y té blanco, se observa una gran similitud (Figura 1A y 1B). Este hecho se debe a que las EGCG son las catequinas más abundantes presentes en ambos tés.^[14] El té “antioxidante”, compuesto por un 35% de té blanco, un 30% de té verde y un 30% de té rojo, presenta gran similitud en la morfología y una menor intensidad en la respuesta voltamétrica, tal y como es de esperar según su composición. En el caso concreto del té negro, la onda registrada presenta un único pico próximo a los 200 mV. El primer pico desaparece como consecuencia de la oxidación del grupo pirogalol de las catequinas y su condensación debida a la acción de la polifenol oxidasa en el proceso de fermentación, que origina la formación de terubiginas y teaflavinas. Las EGCG son minoritarias en el resto de muestras de té e infusiones analizadas, por lo que la respuesta voltamétrica está relacionada con el conjunto del resto de catequinas presentes en cantidades menores (Figura 1C y 1D).

Los valores del potencial e intensidad de los picos de oxidación obtenidos son muy similares, por lo que resulta relativamente complejo establecer un orden comparativo de las actividades antioxidantes de los distintos extractos acuosos analizados mediante VC.

2.2.2. METODOLOGÍA DESARROLLADA BASADA EN LA VOLTAMETRÍA DE PULSO DIFERENCIAL

El método electroquímico VPD desarrollado evalúa el efecto global del conjunto de los antioxidantes sobre la señal del sistema H_2O_2 -Hg, puesto que es capaz de solventar el problema comparativo a nivel de resultados existente en la VC. Asimismo, es capaz de asignar un valor de actividad antioxidante a aquellas infusiones cuyos picos de oxidación voltamétricos son casi inexistentes, manzanilla y tila, entre otros (Figura 1D).

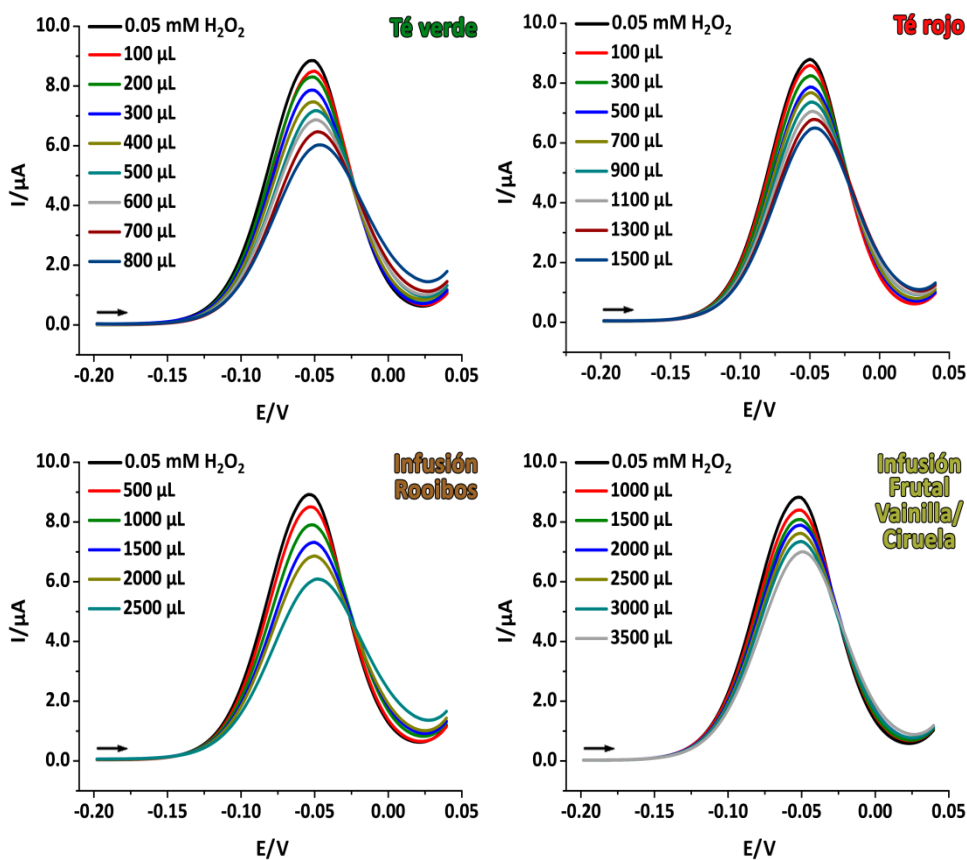


Figura 2. Determinación de la actividad antioxidante mediante VPD de té e infusiones comerciales.

La Figura 2 muestra la disminución de la intensidad, registrada mediante VPD, de la onda anódica del complejo $\text{Hg}(\text{HO}_2)(\text{HO})$, generada a partir de una concentración patrón de H_2O_2 de 0.05 mM, al añadir cantidades crecientes de antioxidantes: extracto acuoso de té verde, té rojo, infusión de rooibos e infusión frutal de vainilla y ciruela.

2.2. CONTRASTE DE LA METODOLOGÍA ELECTROQUÍMICA DESARROLLADA CON EL ENSAYO DE CAPTURA DEL RADICAL DPPH^\bullet

La EGCG presenta una alta capacidad de captación del radical DPPH^\bullet .^[15] Los resultados obtenidos para los extractos acuosos de té verde y té blanco pueden ser asociados con el elevado contenido en EGCG. Sin embargo, pese a la diferencia

en el número de grupos hidroxilos presente en su estructura con respecto a otras catequinas como EGC, ECG y GC, sus actividades de captación de dicho radical son similares.^[7] Este hecho, en relación con su contenido en la composición del té negro y té rojo,^[16] permite justificar la proximidad del resultado obtenido en el té negro respecto del té verde y del té blanco,^[6] así como el valor inferior del té rojo y del resto de tés e infusiones analizadas con cantidades de catequinas muy inferiores.

Los resultados de la actividad antioxidante obtenidos mediante VPD, a través del ensayo de captura del radical DPPH[•] para el conjunto de tés e infusiones estudiados, se recogen en la Tabla 1.

Té/Infusión	Acrón.	H ₂ O ₂ [a]		DPPH [•] [b]	
		V ₁₀ (μL)	μ ₁₀	W ₅₀ /10 ⁻² (mg)	ARP (mg ⁻¹)
Blanco	TB	41.2	243.0	8.1	12.3
Verde	TV	38.8	258.0	8.8	11.4
Rojo	TR	66.0	151.5	25.9	3.9
Negro	TN	62.7	159.4	8.8	11.4
Rooibos	Ro	136.4	73.3	30.5	3.3
Respir	Re	80.2	124.7	18.5	5.4
Antioxidante	TA	43.0	232.3	10.3	9.7
Frutal Vainilla-Ciruella	FVC	272.8	36.7	97.7	1.0
Frutal Manzana-Canela	FMC	345.3	29.0	185.2	0.5
Manzanilla	Ma	227.1	44.0	87.6	1.1
Menta Poleo	MP	61.0	163.9	18.9	5.3
Tila	Ti	58.2	171.9	59.9	1.7
Salvia	Sa	213.6	46.8	14.3	7.0

Tabla 1. Parámetros antioxidantes V₁₀, μ₁₀, W₅₀ y ARP obtenidos para los extractos acuosos de los tés e infusiones comerciales analizados.

[a] I.C. = ± 1% del valor promedio de μ₁₀.

[b] I.C. = 0.5% del valor promedio del ARP.

Las mayores actividades antioxidantes se han obtenido para los extractos acuosos de té verde y té blanco, hecho que coincide con los resultados adquiridos en VC. Las infusiones frutales y de manzanilla, por el contrario, registraron los menores valores de actividad antioxidante^[17] (Figura 3).

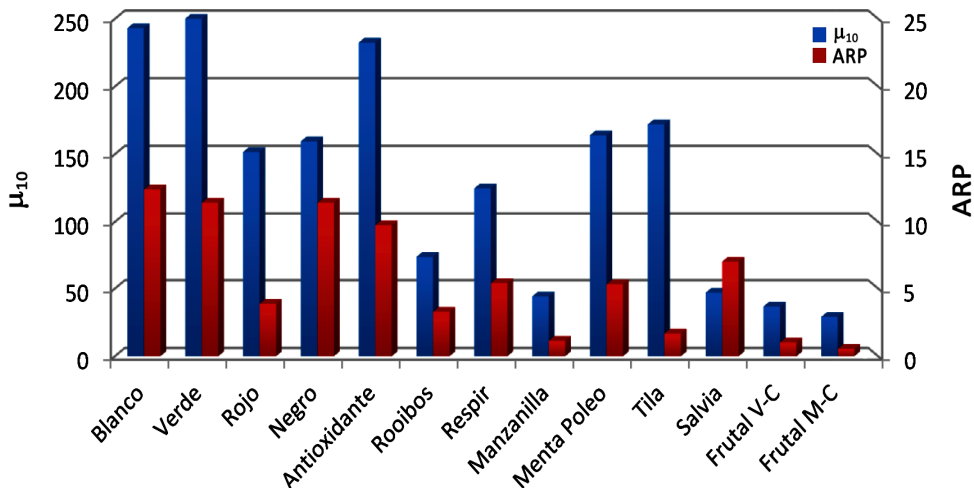


Figura 3. Actividad antioxidante (μ_{10} y ARP) de extractos acuosos de tés e infusiones analizadas.

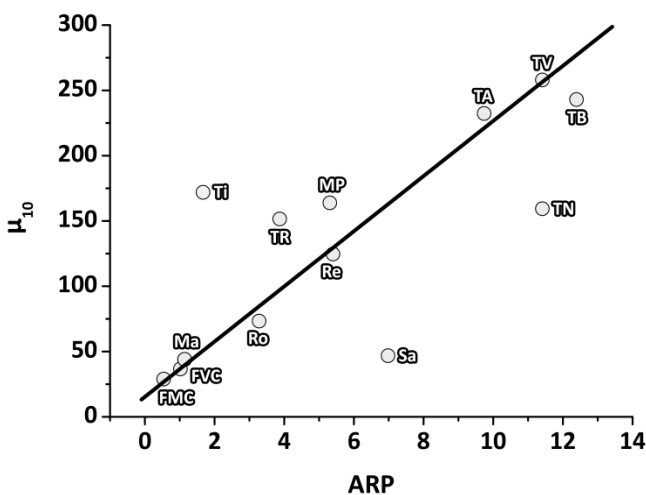


Figura 4. Correlación débil entre los parámetros μ_{10} y ARP para los extractos acuosos de tés e infusiones analizadas.

De manera similar a como sucedió en el estudio de compuestos antioxidantes puros, no existe una correlación total entre los resultados obtenidos por las distintas técnicas de análisis de actividad antioxidante para los extractos acuosos de las muestras de té e infusiones analizadas en este capítulo (Figura 4).

Aún cuando las medidas de μ_{10} , para la mayoría de los extractos estudiados, presentan una buena correlación con los valores de ARP, hay algunas excepciones. En primer lugar, la tila presenta un valor de μ_{10} muy elevado con respecto al teórico esperado por la correlación. Es decir, el extracto de tila en el ensayo de H_2O_2 -Hg tiene propiedades antioxidantes comparables a la menta poleo o al té rojo, cuando por los valores de ARP debería estar en el grupo de la manzanilla o las infusiones frutales. El té negro, por el contrario, presenta también un valor muy similar de μ_{10} cuando las medidas de ARP indican que debería situarse en el grupo de los otros té (blanco, verde y el denominado antioxidante). El ensayo de H_2O_2 -Hg permite afirmar que la actividad antioxidante del té negro es significativamente menor que la del resto debido, posiblemente, a la oxidación del grupo pirogalol de las catequinas y su condensación en el proceso de fermentación, lo que origina la formación de terubiginas y teaflavinas (afirmación que no puede hacerse a partir de las medidas de ARP). Por último, la salvia que, aparentemente estaría entre los compuestos con actividad antioxidante media-alta según su ARP, se incluye por su μ_{10} en el grupo de la manzanilla y las infusiones frutales de muy baja actividad antioxidante en comparación con el resto.

Las diferencias obtenidas con los dos tipos de medidas se debe a que ambas técnicas estudian el comportamiento antioxidante con base en la captación de radicales diferentes. El ensayo aquí propuesto se relaciona con la reactividad frente a ROS (radicales $O_2^{\bullet-}$ y HO_2^{\bullet}) y no frente a un radical sintético y de gran tamaño inexistente en los organismos vivos. Por ello, esta metodología permite establecer medidas más acordes con el efecto *in vivo* de los antioxidantes.

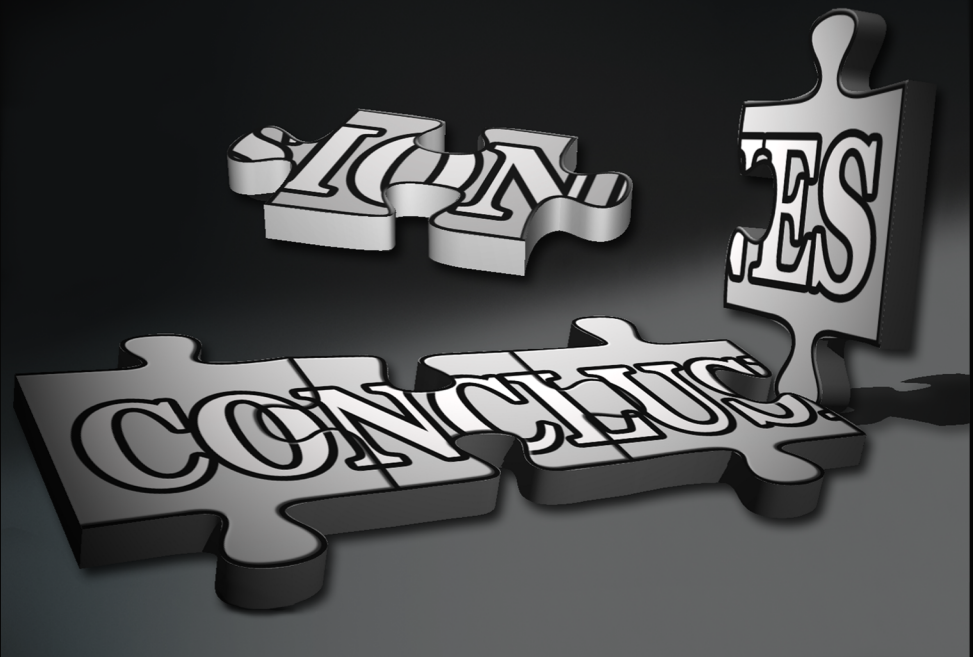
4. BIBLIOGRAFÍA

1. Arteaga, J.F.; Ruiz-Montoya, M.; Palma, A.; Alonso-Garrido, G.; Pintado, S.; Rodríguez-Mellado, J.M. Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles. *Molecules*. **2012**, *17*, 5126-5138.
2. Peterson, J.; Dwyer, J.; Bhagmat, S.; Haytowitz, D.; Holden, J.; Eldridge, A.L.; Beecher, G.; Aladesanmi, J. Major flavonoids in dry tea. *J. Food Comp. Anal.* **2005**, *18*, 487-501.
3. Yashin, A.; Yashin, Y.; Nemzer, B. Determination of antioxidant activity in tea extracts, and their total antioxidant content. *Am. J. Biomed. Sci.* **2011**, *3*, 322-335.
4. Cabrera, C.; Giménez, R.; López, M.C. Determination of tea components with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4427-4435.
5. Zuo, Y.; Chen, H.; Deng, Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*. **2002**, *57*, 307-316.
6. Horžić, D.; Komes, D.; Belščak, A.; Ganić, K.K.; Iveković, D.; Karlović, D. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chem.* **2009**, *115*, 441-448.
7. Kilmartin, P. A.; Hsu, C. F. Characterization of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry. *Food Chem.* **2003**, *82*, 501-512.
8. Roginsky, V.; Barsukova, T.; Hsu, C. F.; Kilmartin, P. A. Chainbreaking antioxidant activity and cyclic voltammetry characterization of polyphenols in a range of green, oolong, and black teas. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5798-5802.
9. Pijac-Žegarac, J.; Valek, L.; Stipčević, T.; Martinez, S. Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions. *Food Chem.* **2010**, *121*, 820-825.

10. Yang, B.; Kotani, A.; Arai, K.; Kusu, F. Relationship of electrochemical oxidation of catechins on their antioxidant activity in microsomal lipid peroxidation. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49, 747-751.
11. Furuno, K.; Akasako, T.; Sugihara, N. The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, 19-23.
12. Ziyatdinova, G.K.; Nizamova, A.M.; Aytuganova, I.I.; Budnikov, H.C. Voltammetric evaluation of the antioxidant capacity of tea on electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes. *J. Anal. Chem.* **2013**, 68, 132-139.
13. Campodall'Orto, V.; Vago, J.M.; Carballo, R.R.; Rezano, I.N. Comparison of tyrosinase biosensor and colorimetric method for polyphenol analysis in different kind of teas. *Anal. Lett.* **2005**, 38, 19-39.
14. Unachukwu, U.J.; Ahmed, S.; Kavalier, A.; Lyles, J.T.; Kennelly, E.J. White and green teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*): variation in phenolic, methylxanthine, and antioxidant profiles. *J. Food Sci.* **2010**, 75, 541-548.
15. Nanjo, F.; Coto, K.; Seto, R.; Suzuki, M.; Sakai, M.; Hara, Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-picrylhydrazyl radical. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, 21, 895-902.
16. Cabrera, C.; Giménez, R.; López, M.C. Determination of tea components with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 4427-4435.
17. Atoui, A.K.; Mansouri, A.; Boskou, G.; Kefalas, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.* **2005**, 289, 27-36.

CAPÍTULO IX

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. La actividad antioxidante de principios activos de especias y condimentos pertenecientes a la familia de antioxidantes de bajo peso molecular, se determinó mediante voltametría cíclica. Los potenciales de oxidación, $E_{p,a}$, proporcionan información específica sobre la capacidad reductora de los compuestos, presentando una fuerte correlación con los valores de ARP obtenidos en el ensayo de captación del radical DPPH \cdot . La correlación establecida permite la aplicación de la técnica electroquímica de la VC como alternativa viable y eficaz a la metodología espectrofotométrica tradicional en el estudio de actividad antioxidante.
2. El estudio sobre la influencia del pH, la concentración de antioxidante y la velocidad de barrido sobre la respuesta voltamétrica permitió establecer las condiciones experimentales óptimas de medida: pH = 7.0, $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ y $C_{AO} = 5\cdot 10^{-4} \text{ M}$. Valores bajos de $E_{p,a}$ se relacionan con altas actividades antioxidantes. El potencial de oxidación está asociado con la estructura química electrónica del antioxidante: la presencia de múltiples grupos hidroxilo y conjugación química, así como disponer de sustituyentes alquilo y/o alcoxi en posiciones *orto/para* y/o sustituyentes carbonílicos en *meta* producen una gran disminución en los valores del $E_{p,a}$.
3. En base a los resultados de $E_{p,a}$ y ARP obtenidos del conjunto de principios activos de especias y condimentos analizados, se estableció un valor límite del potencial de oxidación de $0.56 \pm 0.09 \text{ V}$. Compuestos con un $E_{p,a}$ inferior mostraron una actividad antioxidante relevante. En cambio, aquellos con potenciales superiores no presentaron valor de ARP significativo, resultaron inactivos en el ensayo de captación del radical DPPH \cdot y actuaron como moléculas prooxidantes.
4. El desarrollo de una nueva metodología electroquímica basada en la voltametría de pulso diferencial ha obtenido excelentes resultados en el análisis de la actividad antioxidante de compuestos puros en medio hidroetanólico; esto posibilita el estudio de la capacidad antioxidante de captación de los radicales $O_2^{\cdot-}$ y HO_2^{\cdot} , de interés biológico implicado en el estrés oxidativo. Dicha metodología se fundamenta en la formación de un complejo de mercurio, Hg^{2+} , con HO_2^- y HO^- , aniones generados durante

el proceso electrooxidativo del H_2O_2 sobre el EGM a pH 10.51. La cuantificación del porcentaje de disminución de área del pico de VPD del complejo, a medida que se adicionan concentraciones crecientes de antioxidante, permite una determinación rápida, reproducible y precisa de la actividad antioxidante de los principios activos de especias y condimentos, así como de mezclas sintéticas cuaternarias de los mismos. Asimismo, otra ventaja del método es la de asignar valores de actividad antioxidante, mediante diversos parámetros correlacionables, a compuestos que no presentaban valores significativos del $E_{p,a}$ y ARP.

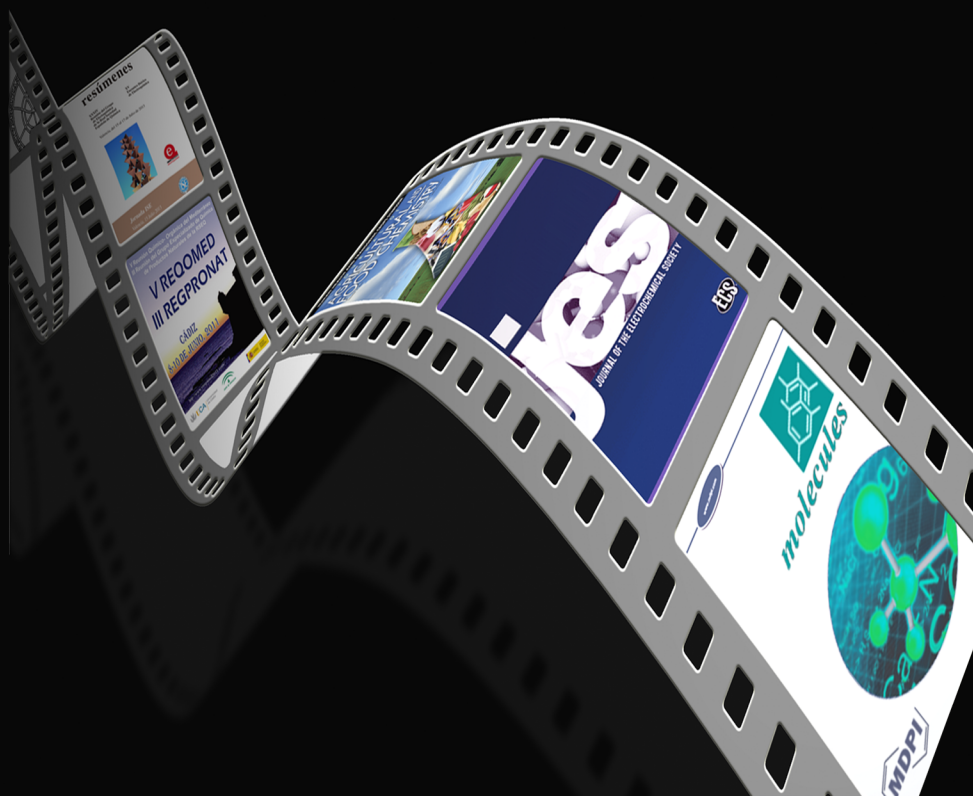
5. Se observaron evidencias significativas de efectos sinérgicos y antagónicos en diversas mezclas sintéticas antioxidantes establecidas por un diseño experimental factorial de 4 factores (limoneno, eugenol, timol y sesamol) y 3 niveles de significación (concentración) para cada uno de ellos. El análisis de la influencia estadística de las variables independientes, antioxidantes, sobre el valor de μ_{10} , obtenido mediante el análisis de actividad antioxidante por VPD, permitió establecer la influencia relativa de cada uno de ellos en el valor final de mezcla, donde el limoneno, antioxidante de menor actividad, presentó mayor influencia (12.4%) que el sesamol (8.5%) y muy próxima al timol (12.6%), ambos con mayores actividades antioxidantes individuales. El eugenol, significativamente más activo que el resto, presentó la mayor influencia (45.1%) en el valor de μ_{10} de las mezclas que lo contenían.
6. El mayor efecto sinérgico se alcanza en las mezclas donde están presentes eugenol y sesamol en sus concentraciones más elevadas, incrementándose el valor de la actividad antioxidante en un 28.5%. Por el contrario, el efecto antagónico superior se obtiene en la combinación eugenol-limoneno, donde disminuye la actividad antioxidante en un 33.5%. Las combinaciones del resto de antioxidantes de menor actividad, timol, sesamol y limoneno, presentan efectos sinérgicos y antagónicos inferiores, los cuales oscilan entre un 20.2 - 26.3% y un 8.6 - 11.8%, respectivamente.
7. La implementación del método electroquímico VPD sobre muestras reales de mayor complejidad antioxidante, extractos acuosos de especias, tés e infusiones comerciales, ha logrado excelentes resultados al permitir evaluar el efecto global del conjunto de los antioxidantes sobre la señal del sistema

H₂O₂-Hg. Asimismo, es capaz de asignar un valor de actividad antioxidante a infusiones cuyos picos de oxidación voltamétricos son casi inexistentes, manzanilla y tila, entre otros.

8. Las diferencias entre los valores no correlacionables de los parámetros μ_{10} y ARP, obtenidas con las dos metodologías aplicadas, se deben a que ambas estudian el comportamiento antioxidante en base a la captación de radicales diferentes. El ensayo electroquímico propuesto en esta Tesis Doctoral se relaciona con la reactividad frente a ROS (radicales O₂⁻ y HO₂[•]) y no frente a un radical sintético y de gran tamaño (DPPH[•]) inexistente en los organismos vivos. Por ello, esta metodología permite establecer medidas más acordes con el efecto *in vivo* de los antioxidantes.

CAPÍTULO X

ANEXOS



1. DEDUCCIÓN TEÓRICA DE LAS RELACIONES I-E DEL MECANISMO DE OXIDACIÓN DEL H_2O_2 EN EL EGM EN PRESENCIA DE ANTIOXIDANTE

En este apartado se describirá someramente la metodología para deducir las ecuaciones i-E correspondientes al esquema de oxidación del H_2O_2 en presencia de AO. Resulta conveniente esclarecer previamente ciertos puntos con el fin de facilitar el posterior análisis deductivo. Por consiguiente, consideraremos inicialmente un proceso electródico simple, sin etapas químicas ligadas a él:



Para las concentraciones C_A y C_B , o cualquier combinación lineal de concentraciones que no dependa de ninguna reacción química, C, la ecuación de difusión lineal convectiva desde, o hacia un electrodo plano que se expande, es en ausencia de migración:^[1-4]

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{2x}{3t} \frac{\partial C}{\partial x} \quad [2]$$

siendo t el tiempo, x la distancia al electrodo y D el coeficiente de difusión.

La resolución de la ecuación [2] requirió la utilización de la aproximación de estado estacionario, esto es, $(\partial c / \partial t) = 0$, y de la aproximación de la capa de difusión lineal de Nernst, resultando:^[1-4]

$$y = \frac{1}{\delta} \int_0^x \exp\left(-\frac{x^2}{3Dt}\right) dx \quad [3]$$

siendo $\delta = (3\pi Dt/7)^{1/2}$ el espesor de la capa de difusión en polarografía.

El rango de variabilidad de la distancia reducida y, en términos estrictamente matemáticos, su recorrido, es el intervalo [0,1]. Éste se corresponde con el intervalo $[0, \infty]$ de la variable x. Se empleará también las concentraciones reducidas, esto es, el cociente entre C y su valor en el seno de la disolución, C^0 :

$$c = C / C^0 \quad [4]$$

De esta forma, c presenta una variación análoga entre cero y uno y, por tanto, la ecuación diferencial queda de la siguiente manera:

$$\frac{d^2 c}{dy^2} = 0 \quad [5]$$

Llamando C^0 a la suma de las concentraciones de A y B en el seno de la disolución, $a = C_A/C^0$ y $b = C_B/C^0$, para la reacción que nos ocupa se tiene que, en la superficie del electrodo, los flujos están relacionados con la corriente farádica mediante la ecuación [6]:

$$\left(\frac{da}{dy}\right)_{y=0} = -\left(\frac{db}{dy}\right)_{y=0} = \frac{i}{i_D} = I \quad [6]$$

donde $i_D = nFAC^0/\delta$, F es la constante de Faraday y A es el área del electrodo.

Integrando las ecuaciones de flujo se llega fácilmente a las siguientes expresiones válidas en la superficie del electrodo (o sea, $y=0$) y de acuerdo con las aproximaciones realizadas: $I = 1-a$; $I = b$.

Por otra parte, la ecuación de Butler-Volmer con nuestras variables queda:

$$I = \lambda_f(a - b\theta) \quad [7]$$

$$\text{siendo, } \lambda_f = \frac{k_f d}{D} = \frac{k_f^0 \delta \exp\left(-\frac{\alpha n F (E - E^0)}{RT}\right)}{D} \text{ y } \theta = \exp\left[\frac{n F}{RT}(E - E^0)\right].$$

A partir de estas expresiones es posible obtener la relación i - E - t . Cuando la especie a considerar participa en una o varias reacciones químicas homogéneas, es necesario incluir un término que de cuenta de ello en la ecuación de transporte de masa. Si las reacciones involucradas son de primer orden, los términos adicionales correspondientes están formados por el producto de la constante de velocidad, k_i , por la concentración de especie, C_i . En nuestro sistema de variables adimensionales efectuaremos el siguiente cambio:

$$\lambda_i = \frac{3\pi t}{7} k_i \quad [8]$$

De esta manera, si el proceso se encuentra complicado con una reacción química en la que interviene, por ejemplo, la especie A, se tiene que:

$$\frac{d^2 a}{dy^2} = \pm \lambda a \quad [9]$$

donde los signos positivo y negativo indican la aparición y desaparición de A, respectivamente.

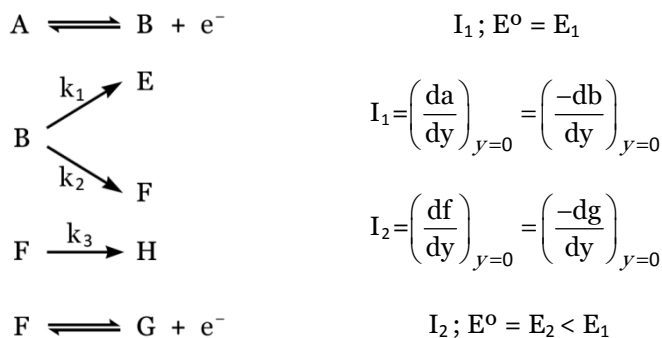
En los casos particulares en los que las reacciones no son extremadamente rápidas o extremadamente lentas, para las especies que participan en reacciones químicas y de transferencia, puede ser utilizada la aproximación del espesor de la capa de reacción,^[1-4] en la que se supone que el equilibrio químico está desplazado sólo en un espesor r mucho menor que el espesor de difusión. Así pues, a valores de $x > r$ se establece el equilibrio químico y el transporte se realiza únicamente por difusión; a distancias al electrodo menores que r el gradiente de difusión puede despreciarse frente al desplazamiento del equilibrio.

En las condiciones enunciadas, la solución de la ecuación [9], con el signo positivo de λ , puede escribirse como:

$$\left(\frac{da}{dy}\right)_{y=0} = \lambda^{1/2}a \quad [10]$$

Con estas expresiones se procederá a continuación a deducir las relaciones i-E en polarografía dc para el proceso de oxidación del H_2O_2 en presencia de AO.

Si consideramos un mecanismo genérico análogo:



Y realizando el correspondiente desarrollo matemático:

$$\begin{aligned}
 \frac{d^2a}{dy^2} &= 0 \\
 \frac{d^2b}{dy^2} &= (\lambda_1 + \lambda_2)b \Rightarrow \frac{-db}{dy} = (\lambda_1 + \lambda_2)^{1/2} b = I_1 \Rightarrow I_1 = (\lambda_1 + \lambda_2) \int_0^{y_{\max}} b dy \\
 &\Rightarrow \int_0^{y_{\max}} b dy = \frac{I_1}{(\lambda_1 + \lambda_2)}
 \end{aligned}$$

$$\frac{d^2e}{dy^2} = -\lambda_1 b \quad ; \quad \frac{d^2f}{dy^2} = -\lambda_2 + \lambda_3 f \quad ; \quad \frac{d^2h}{dy^2} = -\lambda_3 f$$

$$\frac{d^2(f+h)}{dy^2} = -\lambda_2 b \Rightarrow -\left(\frac{df}{dy}\right)_{y=0} - \left(\frac{dh}{dy}\right)_{y=0} = -\lambda_2 \frac{I_1}{\lambda_1 + \lambda_2}$$

$$-\left(\frac{df}{dy}\right)_{y=0} - \left(\frac{dh}{dy}\right)_{y=0} = -\lambda_2 \frac{I_1}{\lambda_1 + \lambda_2} \xrightarrow{I_2 = \left(\frac{df}{dy}\right)_{y=0}} I_2 = \frac{\lambda_2}{1 + \lambda_2} I_1 + \left(\frac{dh}{dy}\right)_{y=0}$$

$$\frac{d^2h}{dy^2} = -\lambda_3 f \Rightarrow \int_{I_2}^0 \frac{df}{dy} = -\lambda_2 \int_0^{y_{\max}} b dy + \lambda_3 \int_0^{y_{\max}} f dy = -I_2$$

$$\lambda_3 \int_0^{y_{\max}} b dy = -I_2 + \frac{\lambda_2}{\lambda_1 + \lambda_2} I_1 \Rightarrow \lambda_3 I_2 = -I_2 + \frac{\lambda_2}{\lambda_1 + \lambda_2} I_1 \Rightarrow (1 + \lambda_3) I_2 = \frac{\lambda_2}{\lambda_1 + \lambda_2} I_1$$

$$\Rightarrow I_2 = \frac{\lambda_2}{(\lambda_1 + \lambda_2)(1 + \lambda_3)} I_1$$

Por consiguiente, la intensidad total es:

$$I = I_1 + I_2 = \left[1 + \frac{\lambda_2}{(\lambda_1 + \lambda_2)(1 + \lambda_3)} \right] I_1$$

[11]

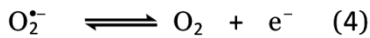
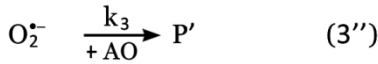
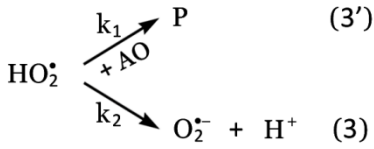
donde I_1 corresponde al intercambio de un electrón.

En ausencia de las reacciones con el AO, se tiene que $I_L^0 = 2I_1$, es decir, $I_1 = I_L^0/2$.

$$\frac{I_L}{I_L^0/2} - 1 = \frac{\lambda_2}{(\lambda_1 + \lambda_2)(1 + \lambda_3)} \Rightarrow \frac{I_L - I_L^0/2}{I_L^0/2} = \frac{\lambda_2}{(\lambda_1 + \lambda_2)(1 + \lambda_3)} \Rightarrow \frac{I_L^0/2}{I_L - I_L^0/2} = \left(\frac{\lambda_1}{\lambda_2} + 1 \right) (1 + \lambda_3)$$

$$\Rightarrow \frac{I_L^0/2}{I_L - I_L^0/2} = \frac{\lambda_1}{\lambda_2} + 1 + \frac{\lambda_1 \lambda_3}{\lambda_2} + \lambda_3 \Rightarrow \frac{I_L^0/2}{I_L - I_L^0/2} - 1 = \frac{\lambda_1}{\lambda_2} + \frac{\lambda_1 \lambda_3}{\lambda_2} + \lambda_3$$

$$\Rightarrow \frac{I_L^0/2 - I_L + I_L^0/2}{I_L - I_L^0/2} = \frac{\lambda_1}{\lambda_2} + \frac{\lambda_1 \lambda_3}{\lambda_2} + \lambda_3 \Rightarrow \frac{I_L^0 - I_L}{I_L - I_L^0/2} = \frac{\lambda_1}{\lambda_2} + \frac{\lambda_1 \lambda_3}{\lambda_2} + \lambda_3$$



Donde:

$$\lambda_1 = k_1 C_{\text{AO}} ; \lambda_2 = k_2 ; \lambda_3 = k_3 C_{\text{AO}}$$

$$\frac{I_L^0 - I_L}{I_L - I_L^0/2} = \frac{k_1}{k_2} C_{\text{AO}} + \frac{k_1 k_3}{k_2} C_{\text{AO}}^2 + k_3 C_{\text{AO}}$$



Ecuación [13]

$$\frac{A_L^0 - A_L}{A_L - A_L^0/2} = \left(\frac{k_1}{k_2} + k_3 \right) C_{\text{AO}} + \frac{k_1 k_3}{k_2} C_{\text{AO}}^2$$

2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1. MODELO MATEMÁTICO ASOCIADO AL DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño factorial seleccionado puede ser utilizado para construir modelos matemáticos de segundo orden, los cuales permiten mejorar significativamente el proceso de optimización de un modelo de primer orden que pueda sufrir falta de ajuste, debido a las interacciones entre las distintas variables y la curvatura de las superficies de contorno generadas. La ecuación general que rige un modelo de segundo orden con interacciones se definirse por:

$$Z = a_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_{ni} + \sum_{i=1}^n c_i X_{ni}^2 + \sum_{i=1; j=1}^n d_{ij} X_{ni} X_{nj} \quad (i < j) \quad [14]$$

Donde Z y X_{ni} indican las variables independientes y dependientes normalizadas respectivamente y a_0 , b_i , c_i y d_{ij} constantes desconocidas obtenidas a partir de los datos experimentales. Si bien los resultados experimentales obtenidos durante el desarrollo del DoE establecen un modelo matemático de respuesta de primer grado con interacciones:

$$Z = a_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_{ni} + \sum_{i=1; j=1}^n d_{ij} X_{ni} X_{nj} \quad (i < j) \quad [15]$$

Las variables independientes fueron previamente normalizadas (X_n) mediante el uso de la siguiente ecuación:^[5]

$$X_n = \frac{X - \bar{X}}{\left(\frac{X_{\max} - X_{\min}}{2} \right)} \quad [16]$$

Siendo X y \bar{X} el valor absoluto y el valor medio de la variable independiente considerada, respectivamente y X_{\max} y X_{\min} los valores máximo y mínimo de la variable en cuestión. Las variables independientes utilizadas en las ecuaciones que relacionan a ambos tipos de variables son los que tienen un coeficiente estadísticamente significativo (es decir aquellos que no exceden de un nivel de significación de 0.05 en la t de Student y que tienen un intervalo de confianza del 95% excluyendo el cero).

La normalización de estas variables facilita la comparación directa de los coeficientes, lo que favorece, en gran medida, la comprensión de los efectos individuales de las distintas variables independientes estudiadas sobre la variable respuesta analizada, además de mejorar sustancialmente la estimación de los coeficientes de regresión, así se reducen las interrelaciones existentes entre los términos lineales y cuadráticos.^[6]

2.2. INFLUENCIAS ESTADÍSTICAS DE LAS VARIABLES INDEPENDIENTES SOBRE LA VARIABLE DEPENDIENTE CONSIDERADA

Las gráficas reflejadas en la Figura 2 (Capítulo VII. Punto 3) responden a la representación de los valores que alcanza la variable dependiente frente a variación, entre los valores normalizados desde -1 hasta +1, de cada una de las variables independientes estudiadas.

Para un determinado valor de una variable independiente representada, la magnitud de la diferencia entre los valores máximo y mínimo correspondientes a la variable dependiente se identifica con la influencia del resto de las variables independientes sobre la variación de la variable dependiente considerada. Así pues, si las variables independientes diferentes a la representada no tuvieran influencia sobre la variable dependiente considerada, la diferencia entre los valores máximo y mínimo correspondientes a dicha variable dependiente se reduciría a un punto. Si, por el contrario, dicha influencia fuera total, de manera que no influyese la variable independiente representada, la diferencia anteriormente considerada sería igual a la altura del rectángulo cuyas bases

estarían constituidas por el intervalo de valores de la variable independiente representada, $[(X_{ni})_{\max} - (X_{ni})_{\min}]$, y por la diferencia máxima posible alcanzada entre los valores máximo y mínimo de la variable dependiente considerada, $[(Z(X_{ni}))_{\max} - (Z(X_{ni}))_{\min}]$.

Como para cada valor de la variable independiente representada, la influencia de las restantes variables sobre la variable dependiente considerada puede ser distinta, se deduce que la variación media de la variable dependiente viene dada por:

$$\frac{\int_{(X_{ni})_{\min}}^{(X_{ni})_{\max}} [Z(X_{ni})_{\max} - Z(X_{ni})_{\min}] dX_{ni}}{[(X_{ni})_{\max} - (X_{ni})_{\min}]} \quad [17]$$

A su vez, la variación media de la variable dependiente, al variar la variable independiente representada, se vería identificada con la diferencia resultante entre $[(Z(X_{ni}))_{\max} - (Z(X_{ni}))_{\min}]$ y la expresión anterior.

$$DZ_i = \left\{ \left[[Z(X_{ni})_{\max}]_{\max} - [Z(X_{ni})_{\min}]_{\min} \right] - [17] \right\} \quad [18]$$

Desarrollando la expresión:

$$DZ_i = \left\{ \left[[Z(X_{ni})_{\max}]_{\max} - [Z(X_{ni})_{\min}]_{\min} \right] - \frac{\int_{(X_{ni})_{\min}}^{(X_{ni})_{\max}} [Z(X_{ni})_{\max} - Z(X_{ni})_{\min}] dX_{ni}}{[(X_{ni})_{\max} - (X_{ni})_{\min}]} \right\}$$

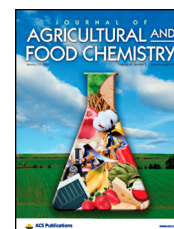
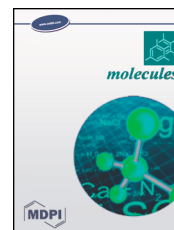
Los valores de DZ_i permiten ponderar las influencias relativas, en porcentajes, para cada una de las variables independientes sobre la variación media de la variable dependiente considerada.

3. BIBLIOGRAFÍA

1. Neudeck, A.; Dittrich, J. Determination of the kinetic parameters of the charge transfer and chemical follow-up reaction for EC, DISPl and ECE mechanisms by means of cyclic voltammetry. *J. Electroanal. Chem.* **1989**, 264, 91-119.
2. Camacho, L.; Rodríguez Mellado, J.M.; Ruíz, J.J. pH-dependence of half-wave potential for kinetic waves. *J. Electroanal. Chem.* **1983**, 146, 279-284.
3. Rodríguez Mellado, J.M.; Marín Galvín, R. Electrochemical study of the dimerization of nicotinamide. *Electrochim. Acta.* **1990**, 35, 845-848.
4. Pérez, R.; Marín, R.; Rodríguez Mellado, J.M. Ultraviolet absorption spectra and dissociation constants of diamino-1,3,5-triazines. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2002**, 67, 429-438.
5. Rodríguez, F.; Gilarranz, M.A.; Oliet, M.; Tijero, J. Pulping of lignocellulosics by organosolv processes. *Recent Res. Dev. Chem. Eng.* **1998**, 2, 9-17.
6. Montgomery, D.C. Diseño y análisis de experimentos. *México. Ed: Iberoamérica.* **1991**, 589 p.

4. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

- Arteaga, J.F.; Ruiz Montoya, M.; Palma, A.; Alonso Garrido, G.; Pintado, S.; Rodríguez Mellado, J.M. Comparison of the Simple Cyclic Voltammetry (CV) and DPPH assays for the Determination of Antioxidant Capacity of Active Principles. *Molecules*. **2012**, 17, 5126-5138.
- Palma, A.; Ruiz Montoya, M.; Arteaga, J.F.; Rodríguez Mellado, J.M. Analysis of the Interaction of Radical Scavengers with ROS Electrogenerated from hydrogen Peroxide. *J. Electrochem. Soc.* **2013**, 160, H213-H218.
- Palma, A.; Ruiz Montoya, M.; Arteaga, J.F.; Rodríguez Mellado, J.M. Determination of Antioxidant Activity of Spices and Their Active Principles by Differential Pulse Voltammetry. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62, 582-589.



PUBLICACIONES

Los artículos publicados en revistas científicas han sido retirados del apartado “Publicaciones derivadas de la tesis doctoral” debido a las restricciones relativas a los derechos de autor. Dichos artículos han sido sustituidos por las referencias bibliográficas de más abajo, además de enlace a las revistas.

- Palma López, A., Ruiz Montoya, M., Arteaga, J.F., Rodríguez Mellado, J.M.: “Analysis of the Interaction of Radical Scavengers with ROS Electrogenerated from hydrogen Peroxide. Journal of The Electrochemical Society. Vol. 160, n. 4, H213-H218, (2013). DOI: 10.1149/2.045304jes

Enlace a la revista:

<http://jes.ecsdl.org/content/160/4/H213.abstract>

- Palma, A., Ruiz Montoya, M., Arteaga, J.F., Rodríguez Mellado, J.M.: “Determination of Antioxidant Activity of Spices and Their Active Principles by Differential Pulse Voltammetry”. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 62, n. 3, págs. 582-589, (2014). DOI: 10.1021/jf404578a

Enlace a la revista:

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf404578a>

Article

Comparison of the Simple Cyclic Voltammetry (CV) and DPPH Assays for the Determination of Antioxidant Capacity of Active Principles

Jesús F. Arteaga ^{1,*}, Mercedes Ruiz-Montoya ¹, Alberto Palma ¹, Gema Alonso-Garrido ¹, Sara Pintado ² and José M. Rodríguez-Mellado ²

¹ Department of Chemical Engineering, Physical Chemistry and Organic Chemistry, University of Huelva, Campus de El Carmen, 21071 Huelva, Spain

² Department of Physical Chemistry and Applied Thermodynamic, Córdoba University, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CEIA3), ed. Marie Curie, 14014 Córdoba, Spain

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jesus.fernandez@diq.uhu.es; Tel.: +34-959-219999; Fax: +34-959-219983.

Received: 2 March 2012; in revised form: 12 April 2012 / Accepted: 25 April 2012 /

Published: 3 May 2012

Abstract: Antioxidant activity of a number of small (low molecular weight) natural compounds found in spices, condiments or drugs (gallic acid, sesamol, eugenol, thymol, carvacrol, vanillin, salicylaldehyde, limonene, geraniol, 4-hexylresorcinol, *etc.*) has been evaluated using electrochemical and DPPH[•] radical scavenging measurements. Structural analysis of the tested compound suggest a remarkable activity for phenol derivatives and the importance of the –R groups located on the phenolic ring in the molecule's ability to act as free radical scavenging as well as their influence in the electrochemical behavior. The voltammetric method can be used for the determination of the antioxidant capability in the same manner as the DPPH[•] radical scavenging because of the correlation found between oxidation potentials and anti-radical power ($ARP = 1/EC_{50}$). Such electrochemical determination is fast and cheap and allows making measurements under a variety of experimental conditions. The accuracy of the electrochemical measurements is the same for all the compounds, irrespective of their scavenging activity, the opposite of what occurs in the DPPH[•] test.

Keywords: antioxidant activity; cyclic voltammetry; DPPH; phenolics; low weight antioxidants

1. Introduction

The search for and use of natural and dietary antioxidants is growing because the public's perception of their safety *versus* synthetic analogues [1,2]. Since ancient times, spices and condiments have been considered indispensable in the culinary arts, and, in addition, they have been recognized for their physiological and medicinal properties, and their broad-spectrum of effectiveness [3,4]. The antioxidant capability of these compounds, specially phenols [5], towards free radicals normally produced by cell metabolism or in response to external factors is due to the scavenging of free radicals and reactive oxygen species (ROS), which are made inactive [6], thus avoiding or preventing degenerative disorders caused in humans by oxidations of nucleic acids, proteins or lipids [7,8]. Plant phenolics arguably deserve a special mention when one considers that the wide-ranging benefits they offer to plants and hence to other living organisms are essentially all a result of their inherent physicochemical properties bundled within the phenol functional group.

Different assays have been used to evaluate the antioxidant activity of natural products [9,10], but a comparison of the results is very difficult because of the different experimental methods adopted. Antioxidant activities of pure compounds and plant extracts have been determined, among others, by an accelerated test [11,12], by using radical species such as ABTS^{•+} [13] and DPPH[•] [14], by the ESR spin trapping technique and by measuring the oxygen consumption in a heterogeneous lipid/water emulsion with lipid oxidation initiated by metmyoglobin [15]. However, all these procedures present some drawbacks since they require the use of specific reagents and tedious and time consuming sample preparation.

Electrochemical measurements have advantages for the determination of antioxidant activity [16] such as their use as a rapid proof of the antioxidant capacity of a lot of organics. The oxidation potentials measured by cyclic voltammetry (CV) have been used to compare the antioxidant strength of compounds such as phenolic acids, flavonoids, cinnamic acids, *etc.* [16–20], being the glassy carbon electrode (GCE) the more frequently used electrode. Low oxidation potentials are associated with a greater facility or strength of a given molecule for the electrodonation and, thus, to act as antioxidant. There are some papers in the literature testing antioxidant capacity by using electrochemical measurements. Cyclic voltammetry at the GCE has been successfully applied to analyze antioxidants present in wine [21], plant extracts [22], phenolic standards [16] and even human plasma [20]. In these studies the most used parameter was the oxidation potential on the GCE, but this parameter strongly depends on the mechanism of the electrode reaction. The main drawback of the CV assay is that it is properly used to effectively characterize the reducing ability and reversibility of compounds either pure or presents in a real matrix. This value cannot always be directly related with the antioxidant ability of the sample. Besides, in the case of natural samples, the presence of compounds such as sugars or natural polymers could hinder the experimental manipulation as well as interfere with the interpretation of the potential values obtained. There are other studies comparing the data measured by cyclic voltammetry with those obtained by other methods [17–20,23–25]. The correlations are not always good [17], especially when the voltammetric and DPPH[•] assays were compared [24]. This last method evaluates the antioxidant activity of a given compound or a complex matrix by reaction in methanolic solution with a stable radical, namely 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]), which has an unpaired valence electron at one atom of its nitrogen bridge [25], the decrease of the DPPH[•]

concentration is measured from the decrease of absorbance at a characteristic wavelength. The correlation between the structure of the low molecular weight antioxidants, especially phenolics, and its antioxidant activity is not well determined at present, being the subject of intense research.

In this paper, the electrochemical behaviour and the antioxidant effectiveness of a number of bioactive compounds are evaluated comparatively by means of the DPPH[•] test and cyclic voltammetry. It is intended to establish a relation between antioxidant capacity and oxidation potential to substitute the time-consuming DPPH[•] test by a rapid voltammetric determination. The accumulation of data of this kind is expected to be useful for an improved understanding of the role and activity of organic molecules as antioxidants, and the article would benefit from the analysis of a much larger number of organic molecules of these types.

2. Results and Discussion

The compounds studied, whose structures are given in Figure 1, are mainly active principles of spices, seasonings or drugs, belonging to the family of low molecular weight antioxidants that are aromatic phenolics and non-phenolics, or cyclic and acyclic non-aromatic compounds, whose activities are based on their reducing properties.

Figure 1. Structures of most of the antioxidants studied.

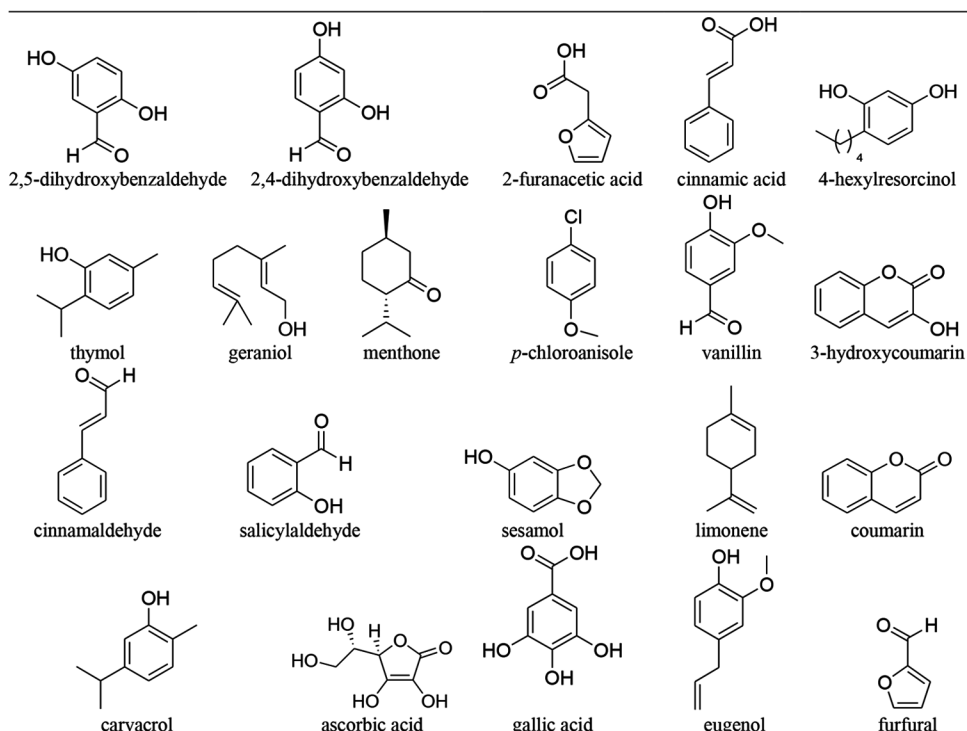
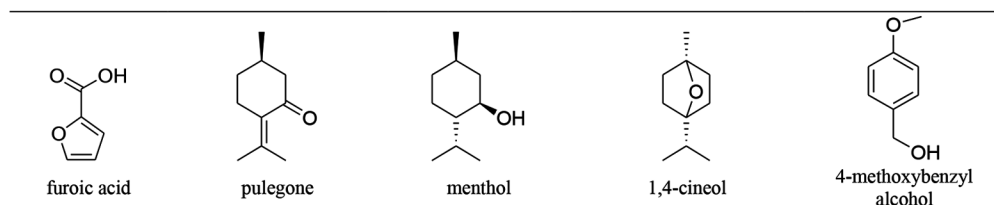


Figure 1. Cont.



The main experimental problem of this method arises from the determination of the steady state concentration, since even for antioxidant species having a fast kinetics, after 24 h the decrease of absorbance continues, though at a low rate, and so it is difficult to obtain reproducible measurements. It must be noted that low uncertainties in EC_{50} can cause important changes in the ARP values; the inaccuracies derived from these measurements may provoke alterations in the order of antioxidant activity for a given family of compounds. It was considered that the steady state was reached when the absorbance remained constant during at least 10 min in the uncertainty limits of the spectrophotometer, *i.e.* ± 0.001 absorbance units. The results obtained are gathered in Table 1.

Table 1. Values of ARP and electrochemical parameters of the voltammograms recorded for the compounds studied.

Compound	ARP ^[a]	$E_{p,a}$ ^[b] /mV	Compound	ARP ^[a]	$E_{p,a}$ ^[b] /mV
gallic acid (GA)	12.5	274	2,4-dihydroxybenzaldehyde (2,4-BZ)	$<10^{-3}$	841
sesamol (SE)	5.5	343	2,5-dihydroxybenzaldehyde (2,5-BZ)	17.5	202
eugenol (EU)	5.0	411	furfural (FU)	$<10^{-3}$	— ^[c]
4-hexylresorcinol (HR)	2.3	453	vanillin (VA)	0.11	571
thymol (TH)	0.78	529	cinnamic acid (CA)	$<10^{-3}$	552
carvacrol (CC)	0.12	552	4-methoxybenzyl alcohol (4-MA)	$<10^{-3}$	— ^[c]
cinnamaldehyde (CI)	$<10^{-3}$	588	ascorbic acid (AA)	6.39	79
3-hydroxycoumarin (HC)	$<10^{-3}$	763	3,5-dimethoxybenzaldehyde (3,5-BZ)	$<10^{-3}$	— ^[c]
salicylaldehyde (SA)	$<10^{-3}$	860	furoic acid (FA)	$<10^{-3}$	— ^[c]
coumarin (CU)	$<10^{-3}$	— ^[c]	pulegone (PU)	$<10^{-3}$	— ^[c]
geraniol (GE)	$<10^{-3}$	— ^[c]	menthol (MT)	$<10^{-3}$	— ^[c]
limonene (LI)	$<10^{-3}$	— ^[c]	1,4-cineole (CN)	$<10^{-3}$	— ^[c]
<i>p</i> -chloroanisole (CL)	$<10^{-3}$	— ^[c]	2-furanacetic acid (FN)	$<10^{-3}$	— ^[c]
benzaldehyde (BZ)	$<10^{-3}$	— ^[c]	menthone (MT)	$<10^{-3}$	— ^[c]

^[a] $\pm 0.5\%$ = average of ARP confidence interval ^[b] $E_{p,a}$, oxidation peak potential; experimental conditions: 5×10^{-4} M, pH = 7.00; $c v = 0.1$ V/s; confidence interval for $E_{p,a}$ values was always lower than ± 4 mV; ^[c] These compounds showed no peaks in cyclic voltammetry and did not cause any effect on the spectra of DPPH[•] radical.

These results were not exactly the same as those found in the literature for some of these compounds [26] although they retain the same order. These differences may be explained by the difficulty of obtaining reproducible measurements as just discussed. In the case of CV, small discrepancies on $E_{p,a}$ values [17,19] may be simply due to minimal changes in the experimental conditions (concentration, pH, scan rate, temperature) in which the voltammograms have been registered.

Cyclic voltammograms were recorded for all the compounds studied at different pH values and varying the scan rate and the substrate concentration. An initial assessment of the results allowed us to note that for non-phenolic compounds any signal was observed in CV, while DPPH[•] value is too small to be determined (Table 1). This allowed us to discriminate those molecules that should not act as prooxidants (which suffer the electrochemical phenomenon), while did not let us to know which of them, even being poorly active, can act as radical scavengers, as the inaccuracy in the measurement of ARP is large enough to determine values of molecules with low level of activity.

Figure 2 shows some examples for selected substrates at constant reactant concentration and pH. As can be seen, the intensities of the voltammograms increase as the scan rate was increased. So, a higher scan rate implies a higher sensibility, but the charging current also increases. The peak potentials of the oxidation signals shifted in all cases towards positive values, as can be seen in Table 2. The lower dependences were found for the oxidation peaks of HC, 2,4-BZ and SA, in the order of 15 ± 1 mV, followed by 2,5-BZ, SE, CI and EU, in the order of 25 ± 2 mV, being higher for the rest.

Moreover, at high scan rates the voltammograms presented distorted shapes. This could be related with the dependence of the oxidation peak current with the logarithm of the scan rate, which must be close to 0.5 for a diffusion-controlled process. This is accomplished approximately only for SE, TH and HC (Table 2), but in most cases the experimental value is greater than 0.5. These facts can be explained if adsorption processes are involved in the oxidations, causing the distortion at high scan rates and the dependences of the peak potentials towards positive values. This must also be reflected in the dependence of the voltammograms with the reactant concentration.

Figure 2. Cyclic voltammograms of A: thymol, B: 4-hexylresorcinol, C: cinnamaldehyde, D: sesamol. Experimental conditions: pH = 7.0, $c = 5 \times 10^{-4}$ M and different scan rates. Arrows indicate the initial direction of the scan.

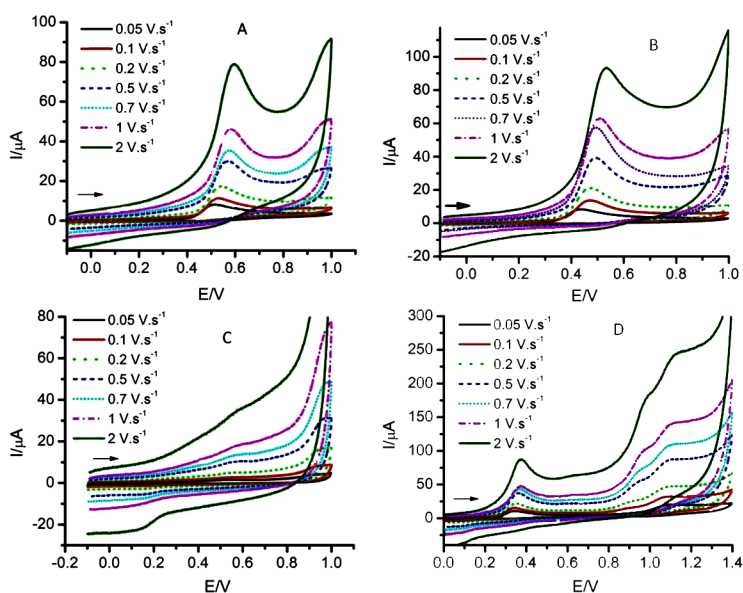


Table 2. Electrochemical parameters of the voltammograms recorded for the active compounds studied.

Parameter [*]	2,5- BZ	GA	SE	EU	HR	TH	CC	VA	CI	HC	2,4- BZ	SA
$E_{p,a}/mV$	202	274	343	411	453	529	552	571	588	763	841	860
$E_{p,c}/mV$ ^[a]	-11	—	—	71	—	—	—	—	—	—	—	—
$\Delta E/mV$ ^[a]	213	—	—	340	—	—	—	—	—	—	—	—
$I_{p,a}/\mu A$ ^[a]	35.55	16.23	15.37	11.94	15.34	11.34	7.803	15.52	3.083	10.86	25.52	13.76
$I_{p,c}/\mu A$ ^[a]	11.25	—	—	2.18	—	—	—	—	—	—	—	—
$E_{p/2}/mV$ ^[a]	163.2	167.4	290.9	361.4	389.6	477.1	473.8	473.2	342.5	756	709.9	643.5
$E_{p,a}-E_{p/2}/mV$ ^[a]	38.8	106.6	52.1	49.6	63.4	51.9	78.2	97.8	245.5	104	131.1	92.5
$\partial \log I_{p,a}/\log v$ ^[b]	0.645	0.351	0.535	0.728	0.725	0.575	0.722	0.678	0.753	0.594	0.630	0.622
$\partial E_{p,a}/\log v$ ^[b]	21.15	146.89	24.33	27.70	56.69	50.73	40.89	9.42	24.35	14.63	14.00	16.27
$\partial E_{p,a}/\log c$ ^[c]	-1.12	130.13	3.06	20.00	-42.48	28.68	-55.38	29.57	13.16	11.5	7.44	-49.25

^[a] 5×10^{-4} M, pH = 7.00; $c v = 0.1$ V/s; ^[b] 5×10^{-4} M, pH = 7.00; ^[c] pH = 7.00; $c v = 0.1$ V/s. [*]

Acronyms of Table 2: $E_{p,a}$, oxidation peak potential; $E_{p,c}$, reduction peak potential; $\Delta E = E_{p,a} - E_{p,c}$; $I_{p,a}$, anodic peak current; $I_{p,c}$, cathodic peak current; $E_{p/2}$, potential to a current value corresponding to half of $I_{p,a}$.

Figure 3 shows some examples for selected substrates at a constant scan rate and pH and, as can be seen, the intensities of the voltammograms increase as the antioxidant concentration increases. In this case, a higher concentration implies a higher sensibility, but the charging current increases also, as occurred when the scan rate was increased. The peak potentials of the oxidation signals shifted in all cases towards positive or negative values, as can be seen in Table 2, with the exception of SE, for which the variation can be considered null.

For a pure diffusion first-order process, the peak potential is not expected to vary with the concentration. So, the values of $\partial E_{p,a}/\log c$ indicate that adsorption processes must complicate the electrochemical reactions, as it was concluded above. In most cases, as can be seen in Figure 1, the antioxidants studied here have groups that present acid-base characteristics such as $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$ or both. So, the effect of pH on the voltammetric response must be taken into account. For this reason, experiments were made at constant scan rate and reactant concentration, and varying the acidity of the medium, as is shown in Figure 4 for some selected substrates.

The optimal conditions to carry out the measurements for the determination of antioxidant activity can be obtained from the examination of these experimental results. So, it is important to perform the voltammetric measurements with the minimal charging current possible, because this implies that the extrapolation of the charging current to the potentials corresponding to the peak is more reliable. So, as it can be seen in Figure 2, this requirement implies the use of low scan rates, this being found for the rest of antioxidants studied. Nevertheless, it is also important to obtain the voltammetric curves with the minimal distortion, this implying not extremely low scan rates. On the other hand, the higher sensibility in intensity was intended and so, the concentration values (and also the scan rates) must be high.

Finally, in general as the pH was increased the oxidation potentials shifted towards less positive values (see Figure 4), this implying that the oxidation becomes easier. But high pH values imply the dissociation of weak acidic groups of the molecules and no physiological conditions. So, equilibrium

between the above considerations let the authors to take as the optimal conditions to made the measurements those following: pH = 7, $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ and $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

Figure 3. Cyclic voltammograms of A: carvacrol, B: 4-hexylresorcinol, C: salicylaldehyde, D: sesamol. Experimental conditions: pH = 7.0, $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ and different concentrations. Arrows indicate the initial direction of the scan.

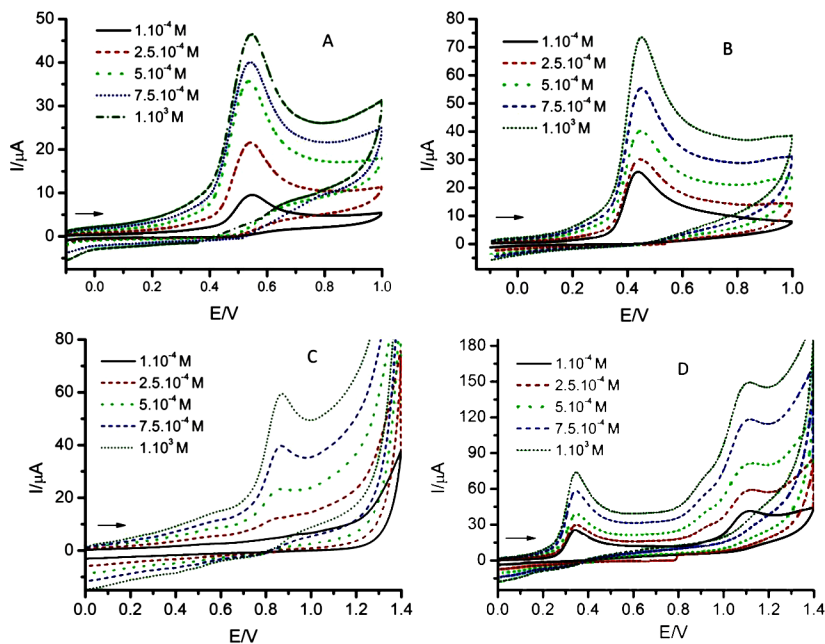


Figure 4. Cyclic voltammograms of A: gallic acid, B: eugenol, C: thymol, D: 3-hydroxycoumarin. Experimental conditions: $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ and different pH values. Arrows indicate the initial direction of the scan.

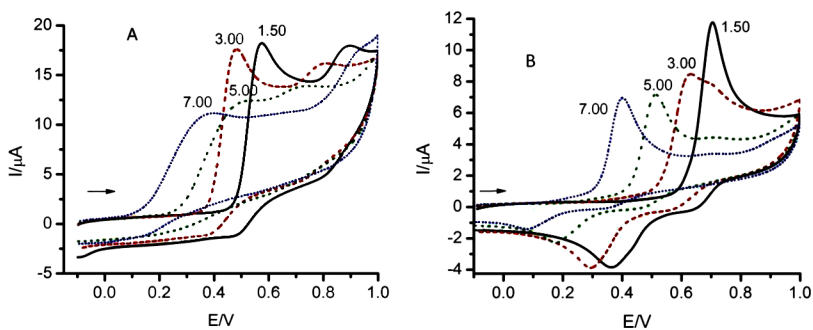
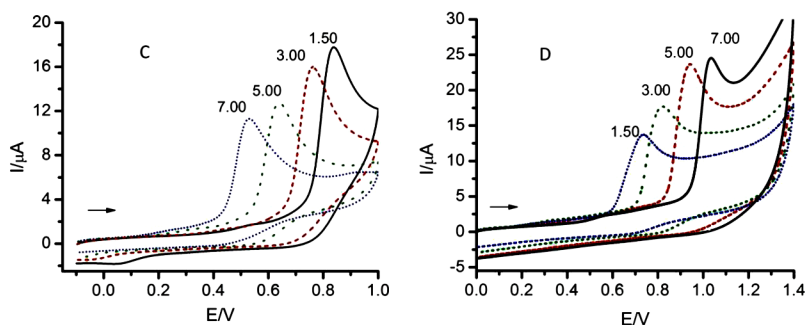
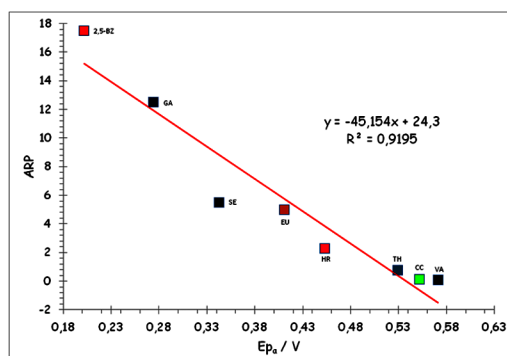


Figure 4. Cont.



The voltammograms corresponding to the different antioxidants studied in this paper under the above conditions show that the antioxidants exhibit well-defined oxidation voltammetric peaks and, in some cases, as EU or SE, a reduction peak, accompanying the oxidation one, is also found. The peak oxidation potential can be measured accurately for each compound, this being gathered in Table 1. The area of each voltammetric peak (which can be interpreted as a charge) is related with the concentration of antioxidant and with the specific oxidation mechanism, mainly with the number of electrons involved in the oxidation and thus it cannot be taken as a measurement of the antioxidant capacity of the compound in question. Figure 5 shows the correlation obtained between the ARP and the oxidation potential values of the most significant compounds of the study. As can be seen this correlation is good, having $r = -0.984$, a slope of -29.40 ± 2.68 and an intercept of 16.25 ± 1.17 (at a confidence level of 95%). From the above results it follows that the good correlation existing between oxidation potentials and ARP indicates that the voltammetric method can be used for the determination of antioxidant activity, in the same way as the DPPH[•] assay. So, the values of the oxidation potentials can be interpreted in the same way as the ARP values obtained from DPPH[•], that is, the quality of the information obtained is the same in both cases.

Figure 5. ARP-oxidation potentials correlation of the studied compounds at pH = 7.0, scan rate $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ and concentration $5 \times 10^{-4} \text{ M}$.



Linear regression equation: $y = -45.154x + 24.3$; determination coefficient: $R^2 = 0.968$.

From a mechanistic point of view, the process involves the loss of electrons from the starting structure, related to the experimentally found potential value ($E_{p,a}$). The addition of a single hydroxyl-group on a benzene (phenyl) ring has drastic consequences on the chemical properties of this otherwise quasi-inert aromatic system [28]. It is generally assumed that the initial stage in phenols, especially under conditions of pH close to 7.0, leads to the formation of a phenoxenium cation *via* phenoxy radical that subsequently evolves through other chemical processes such as loss of a proton, coupling reactions or nucleophilic substitutions [29]. Thus, phenolic species possessing -alkyl and/or -alkoxy substituents at *ortho* and *para* and/or carbonylic substituents at *meta*-, produce a drastic decrease in the potential values.

In our hands the phenolic compound with a lower potential ($E_{p,a}$) value has been 2,5-BZ, that possess a *p*-aromatic phenoxy group and a *m*-aldehyde; its isomer 2,4-BZ shows a higher $E_{p,a}$ value since it has not the substituents in positions that favored its electrochemical activity: the aldehyde group in *para* and the alcohol in *meta*. In second place appeared GA, having neighboring phenoxy groups which are prone to oxidation with formation of hydrogen peroxide, quinones, and semiquinones [30], and an acid group responsible for contributing to the stabilization of the specie resulting from the oxidative process. Next, phenolic compounds having *ortho* or *para* -alkyl or -alkoxy groups as SE, EU, HR (*p*-substituted) and TH, VA or CC (*o*-substituted).

The oxidation potential of a given compound candidate to have antioxidant activity has a limiting value of 0.56 ± 0.09 V (the value of the correlation at which the ARP is zero). This means that above this oxidation potential the investigated compound must not show antioxidant activity in the DPPH[•] test. This is illustrated in Table 1: SA, CI and HC, for example, have ARP values lower than 10^{-3} (which, on the other hand, have low accuracy due to the uncertainty in the measurements), and CC is in the limit of considering the molecule as antioxidant. In the cases of CU and LI among others (Table 1), no antioxidant activity was found irrespective the DPPH[•] assay or voltammetric measurements were used. This was also found in the literature in the investigation of free radical scavenging capacity of conducting polymers [31]. The high potentials of aniline and pyrrole monomers were related to less readily interaction with DPPH[•], which has a formal potential of reduction 0.340 V *versus* Ag/AgCl at pH = 7 [32], that is, in the same conditions of the experiments here reported. This means that DPPH[•] assay can assess radical scavenging for substances that are thermodynamically capable to react with agents with a redox potential below a given value, related to the reduction potential of DPPH[•]. Nevertheless, other less stable radicals of biological interest, as ROO[•] and OH[•], exhibit much higher formal potentials than DPPH[•] [31] and can react with species having oxidation potentials that prevents the determination of the antioxidant activity by the DPPH[•] assay.

An advantage of the electrochemical measurements over the DPPH[•] assay is that oxidation potentials of the individual compounds can be determined with the same accuracy, irrespective the antioxidant character of such compounds, obviously provided that oxidation peaks are well defined. Thus, in the conditions of this work, the uncertainty in E_p is lower than ± 3 mV. This is not true for the DPPH[•] experiments because, in this determination, the lower the antioxidant activity, the higher the concentration needed and the longer the experiment, the variations in absorbance being subjected to more inaccuracy, this being the cause of the difference in ARP measurements reported by different laboratories for the same compound. At low antioxidant activities the results can be subject of a great uncertainty, as noted at the beginning of this section.

Other advantages of the electrochemical determination are that it is fast and cheap. Thus, a typical voltammetric experiment is made in less than 10 min. Moreover there is no necessity to use other reactants, lowering the cost. In addition, the low time of use of the instrumentation improves the optimization of research resources and, at the same time, the use of a small amount of organic solvents implies a minimum waste management.

Finally, conversely as occurs for the DPPH[•] assay, the electrochemical measurements can be made at different pH values, as well as in different reaction media, this allowing the comparison between the antioxidant activity of candidate molecules under a variety of experimental situations such as physiological conditions, low pH environments as in the digestive system, *etc.*

3. Experimental

3.1. Reference Standards

Eugenol, sesamol, 3-hydroxycoumarin, cinnamaldehyde, 4-hexylresorcinol, carvacrol, 2,4-dihydroxybenzaldehyde, 2,5-dihydroxybenzaldehyde, 3,5-dimethoxybenzaldehyde, 4-methoxybenzyl alcohol, furfural, vanillin, cinnamic acid, ascorbic acid, 4-chloroanisole, geraniol, benzaldehyde, pulegone, menthol, 1,4-cineole, 2-furanacetic acid, menthone and salicylaldehyde were purchased from Aldrich; thymol, coumarin and limonene from Sigma and gallic acid from Sigma-Aldrich. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]), free radical, 95% was purchased from Sigma-Aldrich. For the other compounds, Merck analytical grade reagents were used without further purification.

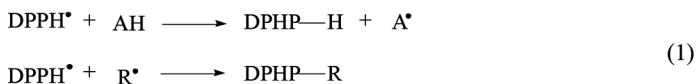
3.2. Cyclic Voltammetry

The working concentration of antioxidants was 5×10^{-4} M, with the exception of the experiments in which the influence of this variable was studied. Solutions of 0.1M in both acetic and phosphoric acids, for $1.5 < pH < 8$, were used as supporting electrolyte. The aqueous solutions were prepared using ultrapure water type I (resistivity 18.2 M Ω .cm at 25 °C) obtained from an ultrapure water system Millipore Simplicity®. Antioxidants were dissolved in ethanol and the stock solutions were stored in darkness at 277 K to avoid decomposition. The concentration of ethanol in cell was 5%. Ionic strength was adjusted to 0.5 M with solid NaCl and the pH was adjusted with solid NaOH. Solutions were purged with purified nitrogen and the temperature was kept at 298 ± 0.1 K.

Measurements were made on a CHI650A electrochemical workstation from IJCambria. The working electrodes was a glassy carbon electrode from IJCambria (geometrical area = 38.5 mm²) which was cleaned by polishing with 0.3 μ m alumina powder (Buehler Micropolish II). All potentials were measured against a Ag|AgCl|KCl_{sat} electrode (BAS MF-2052). A platinum counter electrode BAS MW-1034 was used.

3.3. Spectrophotometric Measurements. DPPH[•] Radical Scavenging Assay

The maximum wavelength of the UV-visible absorption band of the DPPH[•] is 515 nm and the action of an antioxidant (AH) or a given radical (R[•]) causes the decrease of this band or its eventual disappearing through the following general reactions:



Caution was taken with this assay due, among other causes, to possible differences between structural and kinetic characteristics of the compounds, which could make necessary to investigate the interaction mechanism between each antioxidant and the DPPH[•] radical.

UV measurements were made on a Genesys 10 uv spectrophotometer from Thermo Electron Corporation with quartz cuvettes of path-length 1.0 cm.

Different concentrations of antioxidants were added to DPPH[•] methanolic solution. The initial DPPH[•] concentration was 6×10^{-5} M. The DPPH[•] concentration in the reaction medium was calculated from a calibration curve with the equation:

$$\text{Abs}_{515 \text{ nm}} = 12.195 \times C_{\text{DPPH}^{\bullet}} - 0.0137 \quad (2)$$

as determined by linear regression.

The amount of antioxidant required to decrease the initial concentration of DPPH[•] to 50% (efficient concentration or EC₅₀) measures the antioxidant activity. The reverse value, namely anti-radical power, ARP = 1/EC₅₀, should be higher as the antioxidant is more efficient.

4. Conclusions

In conclusion, our study showed that antioxidant capacities of some active principles of spices and condiments belonging to the low molecular weight antioxidants (LMWA) family as deduced from CVs strongly correlate with those determined using a well-known spectrophotometric technique (DPPH[•] assays). This good correlation between oxidation potentials and ARP indicates that the voltammetric assay can be used for the determination of antioxidant activity, in the same way as the DPPH[•] assay. The method has been tested also for non-aromatic compounds with different characteristics such as acids, sugars or enzymes. The electrochemical measurements present several advantages over the DPPH[•] assay, the most significant being that oxidation potentials of the individual compounds can be determined with the same accuracy, irrespective the antioxidant character of such compound and that it is faster and cheaper than the ARP determination. Moreover the electrochemical measurements can be carried out at different pH values, as well as in different reaction media, this allowing the comparison between the antioxidant activity of candidate molecules under a wide variety of experimental conditions. A limiting value of the oxidation potential of a given compound candidate to have antioxidant activity in the DPPH[•] test was found, this being explained by the difference of the formal potentials of the antioxidant and the DPPH[•] radical.

References and Notes

1. Dastmalchi, K.; Dorman, H.J.D.; Kosar, M.; Hiltunen, R. Chemical composition and *in vitro* antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. *Food Sci. Technol.* **2007**, *40*, 239–248.
2. Singh, G.; Marimuthu, P.; Murali, H.S.; Bawa, A.S. Antioxidative and antibacterial potentials of essential oils and extracts isolated from various spice materials. *J. Food Saf.* **2005**, *25*, 130–145.

3. Arora, D.S.; Kaur, J. Antimicrobial activity of spices. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **1999**, *12*, 257–262.
4. Pacheco, P.; Sierra, J.; Schmeda-Hirschmann, G.; Potter, C.W.; Jones, B.M.; Moshref, M. Antiviral activity of Chilean medicinal plant extracts. *Phytother. Res*. **1993**, *7*, 415–418.
5. Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*. **2006**, *99*, 191–203.
6. Valenzuela, A.; Nieto, S.; Cassels, B.K.; Speisky, H. Inhibitory effect of boldine on fish oil oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, *68*, 935–937.
7. Blomhoff, R. Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol*. **2005**, *16*, 47–54.
8. Bourgeois, C.F. *Antioxidant Vitamins and Health: Cardiovascular Disease, Cancer, Cataracts, and Aging*; HNB Publishing: New York, NY, USA, 2003.
9. Frankel, E.N.; Finley, J.W. How to Standardize the Multiplicity of Methods to Evaluate Natural Antioxidants. *J. Agric. Food Chem*. **2008**, *56*, 4901–4908.
10. Moon, J.-K.; Shibamoto, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J. Agric. Food Chem*. **2009**, *57*, 1655–1666.
11. Bendini, A.; Toschi, T.G.; Lercher, G. Determination of the antioxidant activity of vegetable extracts by Oxidative Stability Instrument (OSI). *Ind. Aliment*. **2001**, *403*, 525–528.
12. Kahkonen, M.P.; Hopia, A.; Vuorela, H.; Rahua, J.P.; Pihlaja, K.; Kujala, T.; Heinonen, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem*. **1999**, *47*, 3954–3962.
13. Cano, A.; Hernández-Ruiz, J.; Garcia-Canovas, F.; Acosta, M.; Arnao, M.B. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem. Anal.* **1998**, *9*, 196–202.
14. Sánchez-Moreno, C.; Larrueri, J.A.; Saura-Calixto, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric*. **1998**, *76*, 270–276.
15. Madsen, H.L.; Nielsen, B.R.; Bertelsen, G.; Skibsted, L.H. Screening of antioxidative activity of spices. *Food Chem*. **1996**, *57*, 331–337.
16. Kilmartin, P.A.; Zou, H.; Waterhouse, H. A cyclic voltammetry method suitable to characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J. Agric. Food Chem*. **2001**, *49*, 1957–1965.
17. Bortolomeazzi, R.; Sebastianutto, N.; Toniolo, R.; Pizzariello, A. Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chem*. **2007**, *100*, 1481–1489.
18. Samra, M.A.; Chedea, V.S.; Economou, A.; Calokerinos, A.; Kefalas, P. Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: part I. studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry. *Food Chem*. **2011**, *125*, 622–629.
19. Yakovleva, K.E.; Kurzeev, S.A.; Stepanova, E.V.; Fedorova, T.V.; Kuznetsov, B.A.; Koroleva, O.V. Characterization of plant phenolic compounds by cyclic voltammetry. *Appl. Biochem. Microbiol*. **2007**, *43*, 661–668.
20. Chevion, S.; Roberts, M.A.; Chevion, M. The Use of Cyclic Voltammetry for the Evaluation of Antioxidant Capacity. *Free Rad. Biol. Med*. **2000**, *28*, 860–870.
21. Kilmartin, P.A.; Honglei, Z.; Waterhouse, A.L. Correlation of wine phenolic composition versus cyclic voltammetry response. *Am. J. Enol. Viticult*. **2002**, *53*, 294–302.

22. Chevion, S.; Chevion, M.; Boon Chock, P.; Beecher, G.R. Antioxidant capacity of edible plants: Extraction protocol and direct evaluation by cyclic voltammetry. *J. Med. Food* **1999**, *2*, 1–10.
23. Martinez, S.; Valek, L.; Resetic, J.; Ferenc Ruzic, D. Cyclic voltammetry study of plasma antioxidant capacity. Comparison with the DPPH and TAS spectrophotometric methods. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *588*, 68–73.
24. Cosio, M.S.; Buratti, S.; Mannino, S.; Benedetti, S. Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from Labiatae family. *Food Chem.* **2006**, *97*, 725–731.
25. Gomes, A.; Fernandes, E.; Garcia, M.B.Q.; Silva, A.M.S.; Pinto, D.C.G.A.; Santos, C.M.M.; Cavaleiro, J.A.S.; Lima, J.L.F.C. Cyclic voltammetric analysis of 2-styrylchromones: Relationship with the antioxidant activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 7939–7943.
26. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Tech.* **1995**, *28*, 25–30.
27. Eklund, P.C.; Langvik, O.K.; Warna, J.P.; Salmi, T.O.; Willfor, S.M.; Sjöholm, R.E. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *21*, 3336–3347.
28. Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységú, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 586–621.
29. Ferreira, M.; Varela, H.; Torresi, R.M.; Tremiliosi-Filho, G. Electrode passivation caused by polymerization of different phenolic compounds. *Electrochim. Acta* **2006**, *52*, 434–442.
30. Wong, S.K.; Sytnyk, W.; Wan, J.K.S. Electron spin resonance study of the selfdisproportionation of some semiquinone radicals in solution. *Can. J. Chem.* **1972**, *50*, 3052–3057.
31. Gizdavic-Nikolaidis, M.; Travas-Sejdic, J.; Bowmaker, G.A.; Cooney, R.P.; Kilmartin, P.A. Conducting polymers as free radical scavengers. *Synth. Metals* **2004**, *140*, 225–232.
32. Zhuang, Q.-K.; Scholz, F.; Pragst, F. The voltammetric behaviour of solid 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) microparticles. *Electrochem. Comm.* **1999**, *1*, 406–410.

Sample Availability: Contact the authors.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

5. COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

- **Autores:** Jesús F. Arteaga; Mercedes Ruiz-Montoya; Alberto Palma; Gema Alonso-Garrido.

Título: Electrochemical and spectrometric study of antioxidant/prooxidant properties of spices and condiments.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: V Mediterranean Organic Chemistry Meeting. III Reunión del Grupo de Productos Naturales RSEQ.

Lugar de celebración: Cádiz.

Fecha: 8-10 Junio 2011.



- **Autores:** A. Palma; J.M. Rodríguez Mellado; M. Ruiz Montoya; J.F. Arteaga.

Título: Interacción de antioxidantes con ROS generados electroquímicamente a partir de peróxido de hidrógeno.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XXXIV Reunión del Grupo de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química. XV Encontro Ibérico de Electroquímica.

Lugar de celebración: Valencia.

Fecha: 15-17 Julio 2013.



- **Autores:** A. Palma; M. Ruiz-Montoya; J.F. Arteaga; J.M. Rodríguez-Mellado.

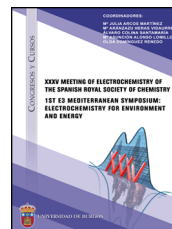
Título: Catalytic wave in the voltammetric oxidation of hydrogen peroxide on mercury.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XXXV Meeting of Electrochemistry of the Spanish Royal Society of Chemistry and 1st E3 Mediterranean Symposium.

Lugar de celebración: Burgos.

Fecha: 14-16 Julio 2014.



P4. Electrochemical and spectrometric study of antioxidant / prooxidant properties of spices and condiments

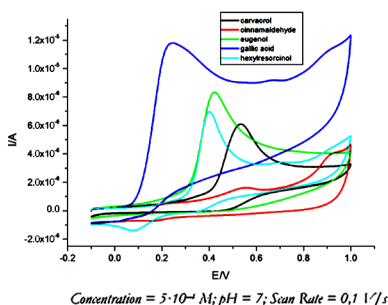
Jesús F. Arteaga,* Mercedes Ruiz-Montoya, Alberto Palma, Gema Alonso-Garrido

Department of Chemical Engineering, Physical Chemistry and Organic Chemistry, University of Huelva, Campus de El Carmen, Avda. 3 de Marzo s/n, 21071 Huelva, Spain, e-mail: jesus.fernandez@diq.uhu.es; mmontoya@uhu.es

Oxidative stress has been one of the most widely studied biochemical processes for several years as it has been considered as an entity similar to the inflammation syndrome, arising as the consequence of an imbalance between pro- and antioxidant species. Dietary antioxidants take part in redox reactions where they can act as either antioxidants (electron donors) or pro-oxidants (electron acceptors), depending on their environment. For instance, vegetables and fruits contain very many dietary phenol derivatives that exhibit varying degrees of antioxidant and pro-oxidant activity.

Electrochemistry deals with electron transfer phenomena between an electrode and oxidized or reduced molecules. It therefore represents a suitable methodology to study the redox properties of solid, liquid or gaseous media and to detect oxidant and antioxidant species. Oxidation potentials of the peaks showed in cyclic voltammetry have been widely used to compare the antioxidant activity of several biologically active natural products [1-3].

The electrochemical behaviour and the antioxidant effectiveness of some active principles of spices, seasonings and drugs (Figure 1), belonging to the family of low molecular weight antioxidants (LMWA), which activities are based on the reducing properties, were evaluated by means of cyclic voltammetry and spectrometric test by using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (DPPH), respectively. Attempts have been made to find correlation between antioxidant capacity and oxidation potential.



Concentration = $5 \cdot 10^{-4}$ M; pH = 7; Scan Rate = 0,1 V/s

Compuesto	ARP	Eap/ mV
Ácido Gálico	12,5	274
Hexil-resorcinol	2,3	472
Eugenol	5,0	411
Carvacrol	0,12	548
Cinamaldehído	-	588

Figure 1.

Strong positive correlation was established between antioxidant capacities deduced from CVs with those determined using the well known spectrophotometric technique (DPPH assays). Based on the obtained results, the highest antioxidant activity was found at gallic acid followed by hexylresorcinol and eugenol.

References

- 1.- P. A. Kilmartin, H. Zou, A. L. Waterhouse, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1957–1965.
- 2.- R. Bortolomeazzi, N. Sebastianutto, R. Toniolo, A. Pizzariello, *Food Chem.* **2007**, *100*, 1481–1489.
- 3.- A. Gomes, E. Fernandes, M. B. Q. Garcia, A. M. S. Silva, D. C. G. A. Pinto, C. M. M. Santos, J. A. S. Cavaleiro, J. L. F. C. Lima, *Biorg. & Med. Chem.* **2008**, *16*, 7939–7943.

Interacción de antioxidantes con ROS generados electroquímicamente a partir de peróxido de hidrógeno

A. Palma^a, J. M. Rodríguez Mellado^b, M. Ruiz Montoya^a, J. F. Arteaga^a

^aDepartamento de Ingeniería Química, Química Física y Química Orgánica Facultad de Ciencias Experimentales, Campus de "El Carmen," Universidad de Huelva, CEIA3, E-21071 Huelva, España

^bDepartamento de Química Física y Termodinámica Aplicada, Facultad de Ciencias, Campus Universitario Rabanales, edificio Marie Curie, Universidad de Córdoba, CEIA3, E-14014-Córdoba, España

Un antioxidante se define como una sustancia que puede retrasar o evitar la oxidación de un sustrato, a concentraciones relativamente bajas. Los antioxidantes primarios (prooxidantes) previenen la formación de radicales libres, particularmente, especies reactivas de oxígeno (ROS).

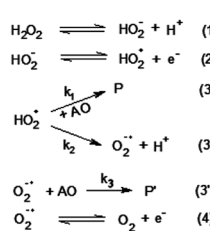
En la oxidación de peróxido de hidrógeno sobre mercurio [1, 2] los radicales anión superóxido e hidroperóxido aparecen como intermedios de reacción. Se ha desarrollado un método electroquímico para la determinación de la actividad antioxidante basada en la inhibición de los radicales producidos en la oxidación electroquímica del peróxido de hidrógeno, utilizando la voltametría diferencial de pulso (DPV) sobre electrodo de mercurio. Esta técnica conduce a picos bien definidos cuya área es directamente proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno en célula. Consideremos un antioxidante, AO, que actúa como un inhibidor de radicales capaz de reaccionar con los generados en las reacciones 2 (radical hidroperóxido) y 3 (radical anión superóxido) para dar los productos P y P' según el esquema I. Se han obtenido ecuaciones teóricas para dicho esquema usando la aproximación de difusión convectiva en condiciones de estado estacionario, y resolviendo las ecuaciones diferenciales, aplicando la aproximación de la capa de difusión de Nernst y el método de variables adimensionales [3-5], obteniendo la ecuación:

$$\frac{A^0 - A}{A - A^0/2} = \left(\frac{k_1}{k_2} + k_3 \right) [AO] + \frac{k_1 k_3}{k_2} [AO]^2$$

donde [AO] es la concentración de antioxidante, A es en cada caso el área del pico en DPV y A⁰ el área de este pico en ausencia de antioxidante.

El pico de oxidación del H₂O₂ disminuye a medida que aumenta la concentración de antioxidante, como en el caso de la 3-hidroxycumarina (figura 1). Esta disminución no fue nunca superior al 50%, tal como se deduce del esquema de reacción propuesto. La disminución del pico en DPV es diferente para los diferentes antioxidantes debido a diferencias en los valores de k₁ y k₃, es decir, debido a la diferente actividad inhibidora de radicales. A valores de concentración de AO lo suficientemente altos, la velocidad de la reacción 3' es mayor que las de las reacciones 3, 3" y 4 y el proceso consiste esencialmente en una oxidación monoeléctrica seguida de una reacción química (3').

La figura 2 muestra la dependencia de la función de área, AF = (A⁰ - A)/(A - A⁰/2), con la cantidad de 3-hidroxycumarina adicionada. La forma de las representaciones corresponde a curvas que pasan por el origen de coordenadas, tal como se esperaba. En todos los casos, a concentraciones suficientemente bajas de antioxidante las representaciones se pueden aproximar a líneas rectas con pendientes, m = (k₁/k₂) + k₃. El parámetro m proporciona información sobre la actividad inhibidora de radicales del antioxidante a través de k₁ y k₃ (a pH y temperatura constante k₂ es un valor constante ya que corresponde a la oxidación del peróxido de hidrógeno). Por tanto, un mayor valor de pendiente (m) indica una mayor actividad inhibidora de radicales del antioxidante.



Esquema I

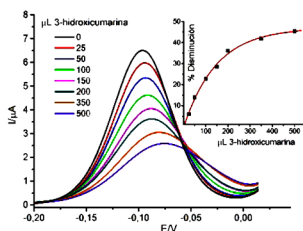


Figura 1

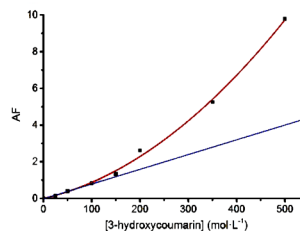


Figura 2

Bibliografía

1. K. Kikuchi, T. Murayama, Bull. Chem. Soc. Japan 49 (1976) 1554.
2. M. Brezina, M. Wedell, Collect. Czech. Chem. Commun. 49 (1984) 2320.
3. P. Andrieux, L. Nadjo, J. M. Savéant, J. Electroanal. Chem. 42 (1973) 223.
4. L. Nadjo and J. M. Savéant, J. Electroanal. Chem. 137 (1982) 149.
5. J. E. Cosano, A. M. Heras, L. Camacho, J. L. Avila, J. M. Rodríguez Mellado, J. Electroanal. Chem. 195 (1985) 321.

CATALYTIC WAVE IN THE VOLTAMMETRIC OXIDATION OF HYDROGEN PEROXIDE ON MERCURY

A. Palma^{*1}, M. Ruiz-Montoya¹, J.F. Arteaga², J.M. Rodríguez-Mellado³

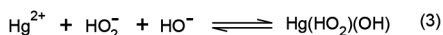
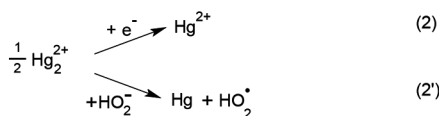
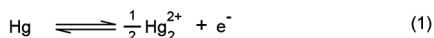
¹ Departamento de Ingeniería Química, Química Física y Química Orgánica. Centro de Investigación en Tecnología de Productos y Procesos Químicos (Pro²TecS). Campus de 'El Carmen'. Universidad de Huelva. E-21071, Huelva, Spain, Phone: 959218202, 959218202, email: alberto.palma@diq.uhu.es, mmontoya@diq.uhu.es

² CIQSO-Centro para la Investigación en Química Sostenible y Departamento de Ingeniería Química, Química Física y Química Orgánica, Campus de "El Carmen", Universidad de Huelva, E-21071, Huelva, Spain

³ Departamento de Química Física y T. A. CEIA3, Campus Universitario de Rabanales, edificio Marie Curie. Universidad de Córdoba. E-14014, Córdoba, Spain, Phone: 957218647, jmrodriguez@uco.es.

ABSTRACT

The overall process of the anodic wave of H₂O₂ observed on mercury electrodes is due to the oxidation of Hg to Hg²⁺ and the subsequent formation of a mixed complex with HO₂⁻ and OH⁻ ions [1]. Though antioxidants could act by reacting with the dissociated hydrogen peroxide, decreasing the concentration of the complex, with a consequent decrease in the polarographic limiting current, this implies that the antioxidant must react in the solution with H₂O₂. But experiments made to prove are opposed to this possibility. It is known [2] that the anodic oxidation of the mercury involves both the Hg(II) and Hg(I) ions in equilibrium, and eventually the complexes formed with chloride or bromide ions present in the solution. This takes place at potentials 0.1-0.2 V more positive than the peak here analyzed. This behavior is common to the redox processes of metal ions, that is, the electron transfers are one-electron and the redox state of the ions increase or decrease in one unity [3]. So, it seems that the Hg(I) ions are formed after the first one-electron transfer and the following reactions could take place:



When a radical scavenger is added, this species reacts with the hydroperoxyde radical produced in reaction 2' and decreases the available concentration of the Hg(I) ion to give Hg(II) ion and, consequently, the oxidation current. This behaviour can be related to the antioxidant activity. The scheme explains the experimental results obtained.

ACKNOWLEDGMENTS: Financial supports from Junta de Andalucía (Research Groups FQM-0198 and RNM371) are gratefully acknowledged.

REFERENCES

- [1] D. Ž. Sužnjević, F. T. Pastor, S. Ž. Gorjanović, *Talanta*, 85, 1398-1403, 2011.
- [2] B. Behr, J. Taraszewska, *J. Electroanal. Chem.*, 19, 373-384, 1968.
- [3] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed. (John Wiley and Sons, 2000).

