

# Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“Determinación de la capacidad antioxidante y características estructurales de metabolitos secundarios de extractos polares y aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) mediante la técnica de voltamperometría diferencial de pulso”**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Presenta:**

Fanny Jaqueline González Fuentes

**Dirigida por:**

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Noviembre de 2009  
México



Universidad Autónoma de Querétaro  
 Facultad de Química  
 Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“Determinación de la capacidad antioxidante y características estructurales de metabolitos secundarios de extractos polares y aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) mediante la técnica de voltamperometría diferencial de pulso”**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**Presenta:**

**L. Q. Fanny Inés García González Fuentes**

**Dirigido por:**

**Dra. Sandra Olimpia Meadiza Díaz**

**SINODALES**

Dra. Sandra Olimpia Meadiza Díaz  
 Presidente

Firma

Dr. Eleazar Máximo Escamilla Silva  
 Secretario

Firma

Dr. Luis Arturo Godínez Mora-Tovar  
 Vocal

Firma

Dra. Ma. Guadalupe Luján Loarca Hija  
 Suplente

Firma

Dr. Mamdouh Mostapha Bah  
 Suplente

Firma

Q. B. Miguel E. Aguilar Ortiz  
 Director de la Facultad

Dr. Luis Gerardo Hernández Sánchez  
 Director de Investigación y Desarrollo

Centro Universitario  
 Querétaro, Qro.  
 Noviembre de 2009  
 México

OFREZCO ESTA TESIS AL ÚNICO DIOS:

*Señor y Rey de gloria, omnipotente, omnisciente, omnipresente, al que Fue, Es y Será, que con su gran amor y misericordia nos dio vida y libertad. A ti creador que día a día me das la oportunidad de disfrutar de tu amor, de tu gracia, de tu misericordia, de mis padres y mi hermano, de toda mi familia (a quienes amo profundamente), de mis amigos a quienes tanto quiero, de éste proyecto de tesis que ahora culmina, de mis planes a futuro donde desde luego siempre estás tú en todos los aspectos de mi vida; a ti que vives y reinas por los siglos de los siglos.*

*Este triunfo es para ti.*

...MAS NO ESTOY SOLO PORQUE  
EL PADRE ESTA CONMIGO.  
JN 16:32

## **AGRADECIMIENTOS.**

Agradezco principalmente a Dios, por que le conozco, por los padres tan hermosos que me ha dado, y porque desde siempre ha sido mi ayuda, mi fortaleza, mi refugio, mi sustento, mi todo, en fin no podría terminar de agradecerle tanto amor. Sin su ayuda nada sería posible.

Agradezco a mis padres, por su apoyo incondicional, por creer en mí por todos sus consejos, por su amor, por tantas y tantas noches de desvelo, por enseñarme el valor del amor de Dios, del amor en general, de la sinceridad, de la fidelidad, de la perseverancia... mmm si enumerara todo aquello por lo que les agradezco no cabrían tantas palabras en esta tesis. En fin por ser los mejores padres, doy gracias a Dios por haberlos puesto en mi vida.

Agradezco a Miguel Ángel mi hermano, por todo tu cariño y apoyo, por tus consejos, tu enseñanza, tu paciencia, por explicarme cuando tenía dudas en fin porque eres un ejemplo a seguir para mí desde que era pequeña ¡¡ Cuando sea grande quiero ser como tu!! Jijiji Te quiero mucho hermanito vales 1000000. También agradezco a mi cuñada Ali por su amistad y apoyo mil gracias!!.

A mi toda mi familia (González Fuentes y Fuentes Rodríguez) por su cariño y apoyo de siempre, los quiero muchísimo y deseo que Dios les guarde en el hueco de su mano y llene de bendiciones siempre

Agradezco a la familia Jiménez Sandoval, a la familia Mesa Jiménez y claro a la familia Beula por sus oraciones, su amistad, sus consejos, su apoyo, saben que los quiero mucho y que para mí son más que amigos, una familia que Dios puso en mi camino. En especial gracias a Omar porque eres esa persona en quien sé que puedo confiar, por nuestras largas pero oportunas y amenas platicas que al final parecía que habían pasado tan sólo unos minutos, por tu cariño y por esa forma de ser que me alegra, me anima en tiempos difíciles y los felices es grato compartirlos contigo, gracias también por tu apoyo espiritual y no lo olvides: Te llevo en el corazón, ¡¡Te quiero para siempre!!

A la Dra. Sandra O. Mendoza, al Dr. Alberto Escarpa, al maestro Pedraza a Janet, al Dr. Frade, al Dr. Frontana y a mis sinodales por sus atinados comentarios y aportaciones para la realización de este proyecto de tesis.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC), y a la Universidad de Alcalá de Henares (UAH) Madrid, España por su apoyo para la realización de este proyecto.

Un agradecimiento especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para mis estudios de maestría así como también el apoyo económico recibido para la realización de una estancia en el extranjero.

A mis buenos amigos: Miguel por su amistad, por escucharme por las charlas y los miles de café's que nos tomamos en ese restaurante que "casi no conocemos" jajaja. A Aldrin, Eriquita, Susi, Viri, Magda, Bebecito Cristofer, Fer, Alex Tamayo, chicos,

saben que los quiero y los llevo en mi corazón, hombre, que los voy a echar de menos. Dios les guie y guarde en el hueco de su mano.

Gracias a mis amigos de laboratorio Héctor, Leticita gracias por ser esos amigos con quienes pude compartir momentos agradables los quiero mucho y lo saben, desearía conservar su amistad para siempre, ojalá así sea, Dios me los bendiga y guie siempre.

Gracias a Raquel por su paciencia en las clases por las charlas y las risas incansables mientras me enseñabas a usar el HPLC uhh que tiempos jaja. A Janet, Marisol, Karla, Alma, Beti, Adriana, Mariela, Tania, gracias por su compañía y por todos los buenos momentos que disfrutamos juntas, deben saber que pueden contar conmigo como una amiga (a pesar de los rondines en el laboratorio jajaja, lo siento nenas, nunca fue con mala intención)

A mis amigos en Madrid: Alison, Kent, Alex, Iván, Almudena, Yandri y bebecito Sami, Miguel (ñoñiss) jiji, Lauri, Cris, Eli, Javi: chicos se les echa de menos pero primeramente Dios nos volveremos a ver sepan que en México hay alguien que les estima en verdad. Gracias por abrirme las puertas en su vida, por ser todos tan amables a tan poco de conocernos, por su amistad y apoyo, mil gracias!!.

## Resumen

El orégano Mexicano, *Lippia graveolens* es una planta usada como un agente analgésico, antiséptico, anti-inflamatorio y anti-espasmódico y para el tratamiento de desorden menstrual y diabetes. El propósito de este trabajo fue analizar la actividad antioxidante de extractos y compuestos puros de *L. graveolens* colectado en Puebla, Querétaro y Guanajuato por medio de “Voltamperometría Diferencial de Pulso”, ya que las técnicas electroquímicas no requieren el uso de reactivos adicionales, son métodos altamente sensibles y de bajo costo. El aceite esencial de *L. graveolens* fue obtenido a través de hidro-destilación de la muestra y el agua remanente fue concentrada para obtener los extractos polares. Los flavonoides galangina, apigenina, luteolina, quercetina, naringenina y floridzina así como los monoterpenos carvacrol y timol fueron analizados a 100  $\mu\text{M}$  y pH 2, 5, 7.5 y 10. Para todos los estándares y los extractos de orégano, la señal de oxidación fue desplazada a potenciales menos positivos conforme se incremento el pH. Así, la capacidad de las moléculas para transferir sus electrones es altamente incrementada a pH alto. Señales de oxidación y reducción bien definidas fueron obtenidas para floridzina, luteolina, quercetina, carvacrol y timol. La reversibilidad del sistema fue analizada por voltamperometría cíclica y se encontró que es dependiente del pH, solo floridzina a pH 5 y luteolina a pH 5 y 7.5 mostraron un comportamiento reversible. Los otros estándares presentaron propiedades irreversibles a todos los rangos de pH probados. Los estándares con un grupo catecol en el anillo B exhiben procesos de transferencia de dos electrones y dos protones. Los voltamperogramas de los extractos polares y aceite esencial exhiben una sola señal de oxidación correspondiendo a la actividad antioxidante de una mezcla compleja, y muestran un comportamiento irreversible. A través del análisis de las corrientes, se observó que el orden del incremento en la capacidad antioxidante para los extractos fue Querétaro < Guanajuato < Puebla. Se comprobó que Voltamperometría diferencial de pulso es una técnica útil y conveniente para determinar el índice electroquímico de actividad antioxidante incluso en muestras complejas. Los resultados obtenidos de ésta técnica van de acuerdo con aquellos obtenidos por cromatografía de gases-masas. Así puede ser usada en control de calidad en recepción de materia prima. Adicionalmente, realizamos un estudio del mejoramiento de la sensibilidad de la técnica con el uso de electrodos serigrafiados (electrodos de una pared, multi-paredes, desnudo y modificados con nanopartículas de oro) con carvacrol, timol y aceite esencial de *L. graveolens* colectado en Puebla y Querétaro. La mejor respuesta fue obtenida con el electrodo de una pared. Éste hecho prueba que aunque las técnicas electroquímicas son altamente sensibles, es posible mejorar su rendimiento con el uso de electrodos modificados.

Palabras clave: Orégano, Voltamperometría Diferencial de Pulso, Electroquímica.

## Summary

The Mexican oregano, *Lippia graveolens* is a plant used as analgesic, antiseptic, anti-inflammatory, and anti-spasmodic agent and for the treatment of menstrual disorder and diabetes. The purpose of this work was to analyze the antioxidant activity of extracts and pure compounds from *L. graveolens* collected from Puebla, Querétaro and Guanajuato, by the use of “Differential Pulse Voltammetry”, since the electrochemical techniques don't require the use of additional reagents those are highly sensitive and low cost methods. The essential oil of *L. graveolens* was obtained through hydro-distillation of the sample and the remainder water was concentrated to obtain the polar extracts. The flavonoids galangin, apigenin, luteolin, quercetin, naringenin and phloridzin, as well as the monoterpenes carvacrol and thymol were analyzed at 100  $\mu$ M and pH 2, 5, 7.5 and 10. For all the standards and the oregano extracts, the oxidation signal was displaced to less positive potentials as the pH was increased. Thus, the capacity of molecules to transfer their electrons is highly increased at high pH. Well defined oxidation and reduction signals were obtained for phloridzin, luteolin, quercetin, carvacrol and thymol. The reversibility of the systems was analyzed by cyclic voltammetry and it was found to be dependent on the pH, only phloridzin at pH 5 and luteolin at pH 5 and 7.5 demonstrated a reversible behavior. The other standards presented irreversible properties at all the pH range surveyed. The standards with a catechol group in the B ring exhibit two electrons and two protons transfer process. The voltammograms of the polar extracts and essential oil exhibit a single oxidation signal belonging to antioxidant activity of a complex mixture, and show an irreversible behavior. Through the analysis of the currents, it was observed that the order of increasing antioxidant capacity for the extracts was Queretaro < Guanajuato < Puebla. Differential Pulse Voltammetry proved to be a useful and convenient technique to determine the electrochemical index of antioxidant activity even in complex samples. The results obtained from this technique is in good agreement with those obtained by gas chromatography-mass. Thus it can be used in quality control of prevails matter reception. Additionally, we carried out a study of the sensibility improvement of the technique with the use of xerigraphed electrodes (single wall, multi-wall, bare and modified gold nano-particles electrodes) with carvacrol, thymol and essential oil of *L. graveolens* collected in Puebla and Querétaro. The best response was obtained with the single wall electrode. This fact proves that, although the electrochemical techniques are highly sensitive, it is possible to improve their performance with the use of modified electrodes.

Keywords: Orégano, Differential Pulse Voltammetry, Electrochemical

# ÍNDICE GENERAL

Resumen	I
Summary	II
Índice	III
Índice de cuadros	V
Índice de figuras	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Estrés oxidativo	2
2.2 Nutraceuticos	3
2.3 Antioxidantes	3
2.3.1. Orégano	6
2.4. Técnicas para la determinación de capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	20
2.4.1. Técnicas convencionales	20
2.4.2. Técnicas electroquímicas	24
2.4.2.1. Voltamperometría diferencial de pulso	25
3. JUSTIFICACIÓN	30
4. OBJETIVO	31
4.1 Objetivos específicos	31
5. METODOLOGÍA	31
5.1. Materiales y métodos	31
5.1.1 Materiales	31
5.1.2 Métodos	32
5.1.2.1. Extracción	32
5.1.2.2. Voltamperometría diferencial de pulso	32
5.1.2.3. Voltamperometría cíclica	33
5.1.2.4. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
6.1 Voltamperometría cíclica	36

6.2 Voltamperometría diferencial de pulso	52
6.3 correlación capacidad antioxidante-estructura	60
6.4 Extracto acuoso de orégano	68
6.5 Aceite esencial de orégano	77
6.6 Uso de electrodos modificados para análisis del aceite esencial de orégano mexicano	80
7. Conclusiones	88
8. Referencia bibliográfica	91

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación de nutraceuticos	4
2. Clasificación de antioxidantes	5
3. Constituyentes del aceite esencial en <i>Lippia graveolens</i>	8
4. Estructura de los flavonoides detectados en <i>Lippia graveolens</i>	9
5. Ventajas y desventajas de los métodos para determinación de capacidad antioxidante	22
6. Coeficientes de actividad antioxidante para algunos productos alimenticios y fármacos	30
7. Potenciales detectados en VDP para los estándares de flavonoides que se encuentran en el orégano mexicano	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química de los monoterpenos mayoritarios en <i>Lippia graveolens</i>	10
2. Concentración de los componentes mayoritarios en el aceite esencial de orégano mexicano	11
3. Inhibición de la peroxidación lipídica de especias y aditivos comunes	11
4. Estructura química de la quercetina	12
5. Estructura química de la rutina	14
6. Estructura química de la naringenina	15
7. Espectro de absorbancia para Naringenina	16
8. Estructura química de la floridzina	17
9. Estructura química de la luteolina	18
10. Estructura química de la apigenina	19
11. Voltamperogramas de estándares fenólicos	27
12. Voltamperogramas traslapados de jugo de manzana y pera	28
13. Curvas del cambio relativo de la densidad de corriente de reducción de oxígeno contra la concentración del antioxidante	28
14. Curva del cambio relativo de la densidad de corriente de reducción del oxígeno contra volumen de extracto de té verde	29
15. Esquema del equipo electroquímico	33
16. Grupos importantes para la actividad antioxidante en flavonoides	34
17. Voltamperograma diferencial de pulso de catecol, resorcinol y taxifolin	39 35
18. Mecanismo de oxidación del grupo catecol	36
19. Voltamperogramas cíclicos de floridzina a diferentes velocidades de barrido pH 2 y 5	37
20. Voltamperogramas cíclicos de floridzina a diferentes velocidades de barrido pH 7.5 y 10	38

Figura	Página
21. Variaciones del potencial de oxidación en floridzina con respecto al cambio de pH	39
22. Gráfico representativo del sistema para floridzina (Dependencia del $\Delta E_p$ y de la relación de corrientes con el pH)	40
23. Determinación de la reversibilidad en floridzina a pH 5	42
24. Traslape de voltamperogramas cíclicos de quercetina a pH 2, 5, 7.5 y 10	43
25. Grafico representativo del sistema para quercetina	44
26. Voltamperogramas cíclicos de rutina a diferentes valores de pH	45
27. Grafico representativo del sistema para rutina	45
28. Voltamperogramas cíclicos de naringenina	46
29. Voltamperogramas cíclicos de luteolina a diferentes velocidades de barrido pH 2 y 5	48
30. Voltamperogramas cíclicos de luteolina a diferentes velocidades de barrido pH 7.5 y 10	49
31. Grafico representativo del sistema para la luteolina	50
32. Voltamperogramas cíclicos de galangina a diferentes valores de pH	51
33. Voltamperograma cíclico de apigenina a diferentes valores de pH	51
34. Voltamperograma diferencial de pulso de floridzina	53
35. Voltamperograma diferencial de pulso de Quercetina	53
36. Voltamperograma diferencial de pulso de rutina	54
37. Voltamperograma diferencial de pulso de Naringenina	54
38. Voltamperograma diferencial de pulso de luteolina	55
39. Voltamperograma diferencial de pulso de galangina	55
40. Voltamperograma diferencial de pulso de apigenina	56
41. Voltamperogramas diferenciales de pulso de la mezcla quercetina y rutina a pH 2 y 5	57
42. Voltamperogramas diferenciales de pulso de la mezcla quercetina y rutina a pH 7.5 y 10	58

Figura	Página
43. voltamperogramas cíclicos de la mezcla quercetina y rutina a pH 5 y 7.5	59
44. Grafico potencial formal (E <sub>0</sub> ) contra pH de estudio para quercetina	62
45. Grafico potencial formal (E <sub>0</sub> ) contra pH de estudio para rutina	63
46. Grafico potencial formal (E <sup>0</sup> ) contra pH de estudio para luteolina	64
47. Grafico potencial formal (E <sup>0</sup> ) contra pH de estudio para Floridzina	65
48. Modificación estructural en quercetina al ser oxidada	66
49. Cambio estructural en rutina al ser oxidada	66
50. Cambio estructural en luteolina a su forma oxidada	67
51. Cambio estructural en floridzina a su forma oxidada	67
52. Voltamperograma diferencial de pulso y cíclico del concentrado de aguas madres del Orégano colectado en Querétaro a diferentes valores de pH	70
53. Voltamperograma diferencial de pulso y cíclico del concentrado de aguas madres del Orégano colectado en Puebla a diferentes valores de pH	71
54. Voltamperograma diferencial de pulso y cíclico del concentrado de aguas madres del Orégano colectado en Guanajuato a diferentes valores de pH	72
55. Voltamperograma diferencial de pulso y cíclico del concentrado de aguas madres de las tres colectas de orégano traslapados a pH 2	73
56. Voltamperograma diferencial de pulso y cíclico del concentrado de aguas madres de las tres colectas de orégano traslapados a pH 5	74
57. Voltamperograma diferencial de pulso y cíclico del concentrado de aguas madres de las tres colectas de orégano traslapados a pH 7.5	75
58. Voltamperogramas diferenciales de pulso de la mezcla del estándar Floridzina y Orégano colectado en Querétaro a pH 2, 5 y 7.5	76
59. Voltamperogramas diferenciales de pulso y cíclicos de los aceites esenciales de las tres colectas	78

Figura	Página
60. Voltamperogramas diferenciales de pulso y cíclicos del aceite de las colectas y la mezcla timol y carvacrol	79
61. Electrodo serigrafiados y potenciostato empleados	80
62. Voltamperogramas diferenciales de pulso de carvacrol con electrodo normal sin activar, activado	82
63. Voltamperogramas diferenciales de pulso con los electrodos usados (Multi-capas de nanotubos de carbono, UC=una capa de nanotubos de carbono, NG=Nanopartículas de oro) para carvacrol y timol	83
64. Voltamperogramas diferenciales de pulso del aceite de orégano colectado en Querétaro y el aceite con adición de carvacrol y timol	84
65. Voltamperogramas diferenciales de pulso del aceite de orégano colectado en Puebla y el aceite con adición de timol y carvacrol	85
66. Voltamperogramas diferenciales de pulso resultantes en el aceite de orégano colectado en Querétaro y Puebla, obtenidos usando el electrodo serigrafiado de una capa de nanotubos de carbono y con la celda convencional de tres electros separados	86
67. Comparación entre Cromatograma y voltamperograma diferencial de pulso obtenido mediante celda de tres electrodos convencional del aceite de orégano colectado en Puebla, Guanajuato y Querétaro.	87

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, se ha informado un incremento en el padecimiento de algunas enfermedades crónico-degenerativas tales como *Diabetes mellitus*, hipertensión arterial, síndrome metabólico, cáncer, arterosclerosis, porfirias, cataratas, sobrecarga de hierro y cobre, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y otras demencias, artritis, enfermedades autoinmunes, inflamaciones crónicas entre otras. Estos padecimientos en México se han acrecentado debido a una alimentación de baja calidad nutricional (McCullough *et al.*, 2002) y han sido vinculados al estrés oxidativo (Asotra *et al.*, 2007). Existen muchos estudios epidemiológicos que han demostrado el papel que desempeña en la dieta el consumo de vegetales, por lo que la falta de éstos puede constituir una causa más de la generación de dichos padecimientos (Dwyer, 2006). Recientemente, se ha descubierto que algunas plantas contienen metabolitos secundarios capaces de prevenir o curar dichas enfermedades. El orégano mexicano es objeto de estudio en el campo industrial y médico, debido a que posee muchas características que promueven la salud, tales como propiedades antimicrobianas, antimutagénicas y antioxidantes, de las cuales ésta última es proporcionada por los compuestos fenólicos que contiene. Éstos son capaces de retardar, inhibir o eliminar procesos de oxidación al ceder electrones a radicales libres, de ésta manera protegen a las moléculas circundantes evitando con ello una reacción en cadena. Las propiedades antioxidantes de los alimentos, dependerá entonces de la concentración y tipos de compuestos fenólicos que en ellos se encuentren, por lo que resulta interesante realizar análisis que indiquen cuan capaces son éstos de proteger a moléculas de su oxidación y de este modo evitar daños celulares. Se han desarrollado diversas técnicas para la determinación de capacidad antioxidante de extractos y compuestos puros; sin embargo existen técnicas electroquímicas las cuales no se han tomado en cuenta como una opción para estos estudios; una de ellas es la voltamperometría diferencial de pulso la cual posee gran sensibilidad por lo que podría determinarse con mayor exactitud la capacidad antioxidante. En este trabajo se propone el uso de la voltamperometría diferencial de pulso para evaluar la capacidad antioxidante de los extractos y compuestos puros de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Estrés oxidativo

Se llama estrés oxidativo a la producción descontrolada de radicales libres (Zafrilla *et al.*, 2002), los cuales son átomos o moléculas que tienen electrones impares y son extremadamente dañinas para células y/o tejidos en altas concentraciones (Block, 1999). Se forman continuamente en el organismo y en pequeñas cantidades no causan efectos nocivos, ya que son neutralizados por antioxidantes propios del organismo (enzimas) o provenientes de los alimentos como la vitamina E (Li-Ping *et al.*, 2007), C (Rodrigo *et al.*, 2008), flavonoides (Choi *et al.*, 2004), etc., que ejercen un efecto protector en las células. El estrés oxidativo se presenta debido a exposiciones prolongadas de agentes oxidantes, por disminución en la capacidad antioxidante del sistema, o ambos. Éste se asocia a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo otros radicales libres los cuales se encuentran ampliamente implicados en la patofisiología de enfermedades como cáncer, artritis reumatoide, cirrosis y arteriosclerosis, así como en procesos degenerativos asociados con envejecimiento (Willcox *et al.*, 2004). Se ha sugerido que el equilibrio entre radicales libres y antioxidantes es perdido debido a una mala alimentación, alguna (s) enfermedad (es), hábitos y otros factores. Éste desequilibrio entre la velocidad de formación de los radicales libres y la velocidad de su destrucción provoca una elevada producción celular de los radicales libres los cuales reaccionan químicamente con lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN al interior de las células, y con componentes de la matriz extracelular, desencadenando daños irreversibles que incluso pueden llevar a la muerte celular (Morello y Shahidi, 2002). Los radicales libres, pueden provenir de dos tipos de fuentes, las endógenas que incluyen los procesos fisiológicos normales y metabólicos como la respiración mitocondrial y las exógenas entre las que se encuentran la exposición a contaminantes, radiaciones, hábitos, etc. (Halliwell, 1991).

## 2.2 Nutracéuticos

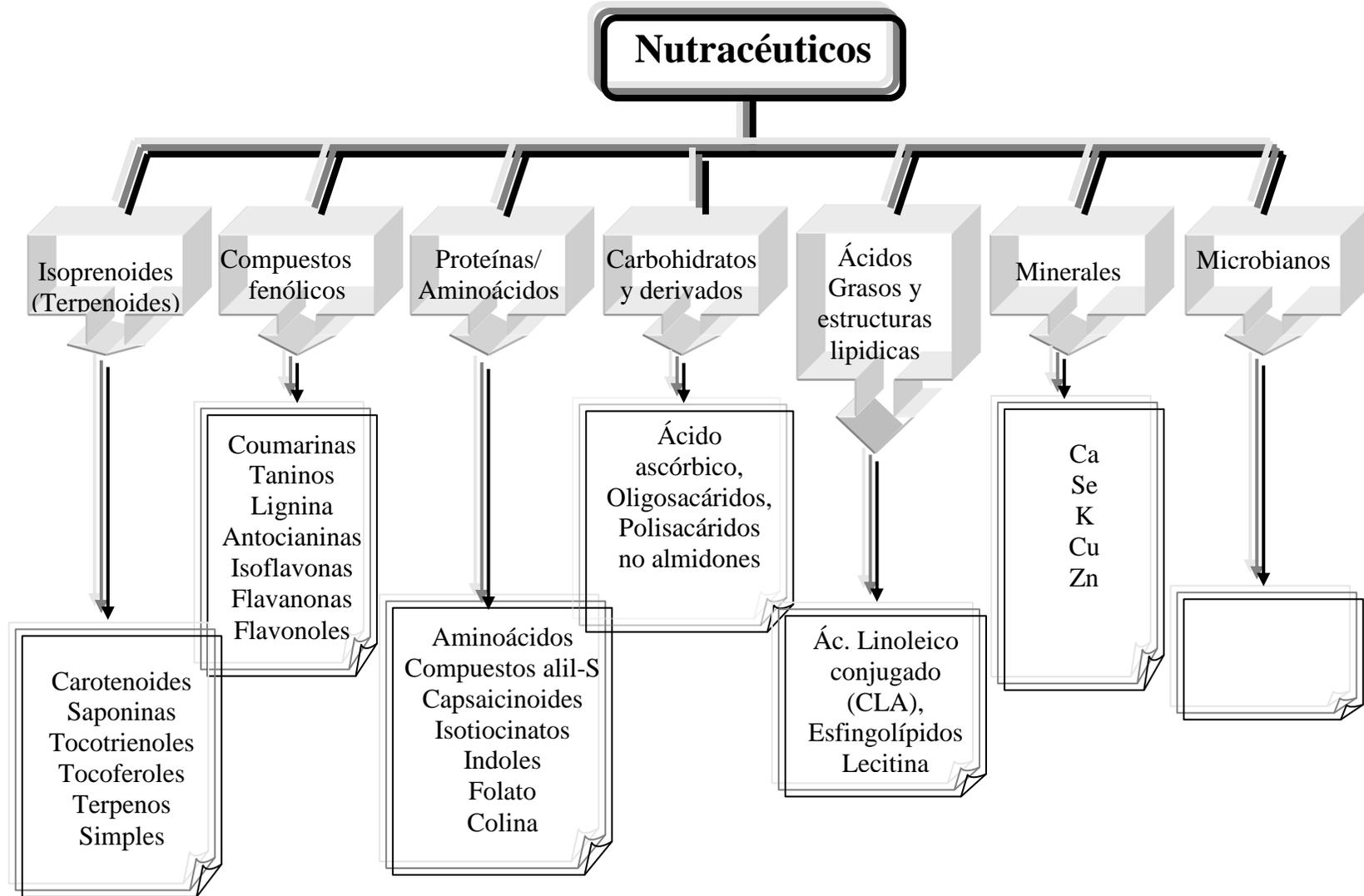
Estudios sobre el efecto del consumo de frutas y vegetales en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas han revelado una acción protectora de estos alimentos al disminuir la presencia de estos padecimientos (Nakamura, 2008). En los lugares con más incidencia de cáncer, un cuarto de la población con más bajo consumo de frutas y vegetales tiene dos veces más riesgo de padecer cáncer, que aquellos con alto consumo de los mismos. Esto se debe a los compuestos químicos que los constituyen y que a menudo son productos de su metabolismo secundario (fitoquímicos). Los agentes nutracéuticos son compuestos químicos que se encuentran en alimentos como componentes naturales y que son benéficos para el cuerpo humano previniendo o tratando una o más enfermedades o bien mejorando el desempeño fisiológico. Pueden formar parte del alimento natural (sin tratamientos posteriores), como el licopeno contenido en el tomate, ser parte de un alimento procesado como el licopeno contenido en las salsas de tomate, funcionar como aditivo como el licopeno adicionado a los jugos de fruta o bien puede ser provisto en forma de suplemento. Muchos de estos compuestos abundan en plantas y son metabolitos secundarios, es decir, no ejercen acción directa en el desarrollo y reproducción de la planta. Los nutracéuticos pueden ser clasificados en base a la fuente del alimento que lo contiene, a su mecanismo de acción y a su naturaleza química (Wildman, 2001). El Cuadro 1 muestra la clasificación de nutracéuticos de acuerdo a los componentes químicos.

## 2.3 Antioxidantes

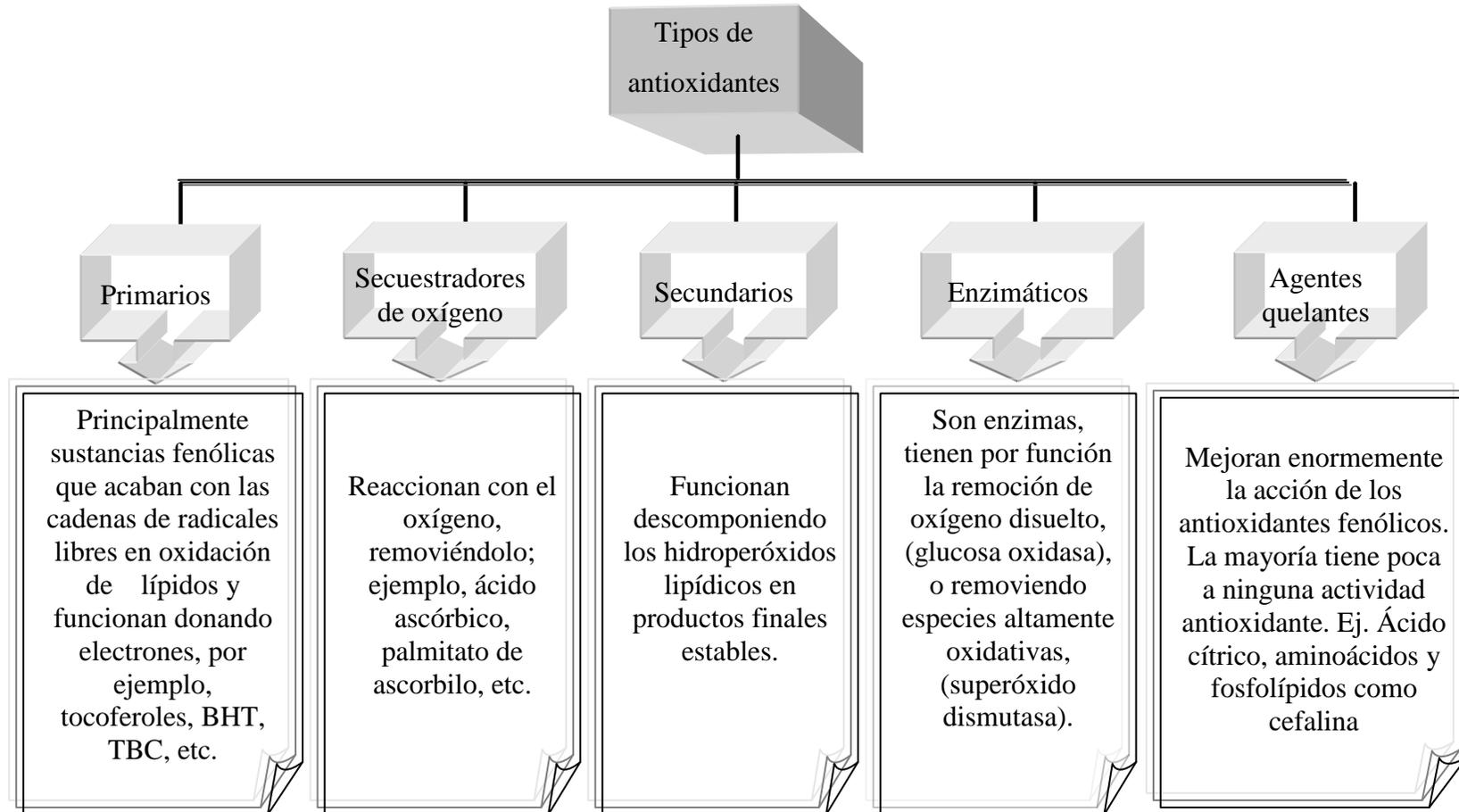
Existen cinco tipos de antioxidantes principales, los cuales son descritos en el Cuadro 2 de acuerdo a la función que desempeñan (Mukhopadhyay, 2000).

Dentro de los antioxidantes primarios se encuentran los compuestos fenólicos, los cuales están presentes en muchas hierbas y plantas (Proestos *et al.*, 2006) y son considerados metabolitos secundarios cuya base es un fenol, un grupo hidroxilo sobre un anillo aromático, y de éste se forman moléculas como antocianinas, cumarinas, fenilpropanoides, flavonoides, taninos y lignanos.

Cuadro 1. Clasificación de nutraceuticos (Wildman, 2001).



Cuadro 2. Clasificación de antioxidantes (Mukhopadhyay, 2000).



Su función en las plantas es variada: defendiendo contra insectos y patógenos, absorbiendo luz, promoviendo la polinización, reduciendo el crecimiento de plantas competitivas (Wildman, 2001). Son sustancias bioactivas que se encuentran en alimentos en bajas proporciones y se relacionan con las características sensoriales de vegetales (Kris-Etherton *et al.*, 2002).

Los compuestos fenólicos presentan propiedades antioxidantes favorables. Se encuentran en diferentes partes de las plantas como en hojas, raíces y partes aéreas. Están presentes en plantas aromáticas (especias), por esta razón el uso de algunas especias no es sólo para mejorar el sabor en alimentos, sino también para incrementar la vida de anaquel de los mismos debido a su actividad antioxidante y antimicrobiana. Así, especias como pimientas inglesas, clavo de olor, orégano, nuez moscada, jengibre, mejorana, variedades de menta y tomillo, poseen significantes propiedades antioxidantes. Sin embargo, de todas las especies mencionadas, el orégano es el más efectivo como conservador para alimentos que contienen lípidos, debido a su capacidad antioxidante. El rasgo estructural necesario de los compuestos para poseer actividad antioxidante, es un anillo aromático que contiene sustituyentes capaces de donar electrones y dichas características son propias de los compuestos constituyentes del aceite esencial de todas las hierbas de la familia labiatae como el romero y orégano (Mukhopadhyay, 2000).

### 2.3.1 Orégano

Muchas plantas son nombradas como orégano y pertenecen a diversos géneros que cuentan con muchas especies y subespecies. Por ejemplo el orégano griego se refiere a *Origanum vulgare* L. *ssp. hirtum*, el turco a *Origanum onites* L., el español a *Thymus capitatus* L. y el mexicano a *Lippia graveolens* HBK.

El orégano ha sido usado como condimento en alimentos y como remedio en la medicina tradicional. Su aceite esencial es usado en la preparación de sabores y fragancias, y como ingrediente en pasta dentífrica y goma de mascar. El orégano tiene propiedades antioxidantes, y estas se deben a la presencia de componentes fenólicos.

Algunas de las propiedades que se reportan del aceite esencial de orégano son antimicrobianas, citotóxicas y antifúngicas (Silva y Dunford, 2005).

Una de las aplicaciones recientemente investigadas del orégano es el empleo de su aceite esencial en películas comestibles a las cuales confiere un valor agregado, debido a su capacidad antimicrobiana. Estos estudios revelan que la adición del aceite esencial de orégano a películas comestibles es efectiva contra algunas bacterias como *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 35218), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (NCTC 2167) y *Lactobacillus plantarum* (DSM 20174) y resulta incluso mejor que la adición del extracto de ajo o romero (Seydim y Sarikus, 2006). La capacidad del aceite esencial del orégano para inhibir dichas bacterias se debe a la presencia de carvacrol y p-cimeno en concentraciones relativamente altas. El carvacrol actúa desintegrando la membrana externa de bacterias Gram-negativas, liberando lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplásmica al ATP (Seydim y Sarikus, 2006).

*Lippia graveolens* H.B.K. (Verbenaceae) es el nombre científico del orégano mexicano, un arbusto aromático que es ampliamente usado en la preparación de platillos y en otros alimentos como bebidas alcohólicas, productos cocidos, productos cárnicos, condimentos, productos lácteos, vegetales procesados y bocadillos. Las hojas se han usado como remedios con fines analgésicos, anti-inflamatorios, anti-piréticos, anti-espasmódicos, abortivos, para el tratamiento de desordenes gastrointestinales y respiratorios (Salgueiro *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2007).

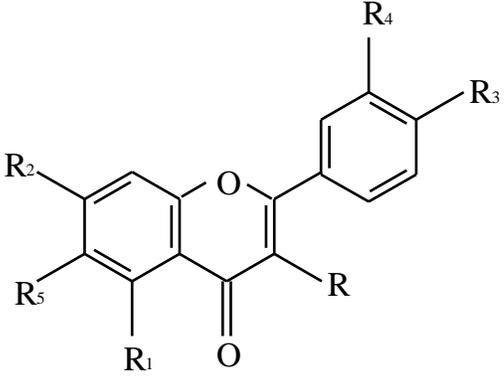
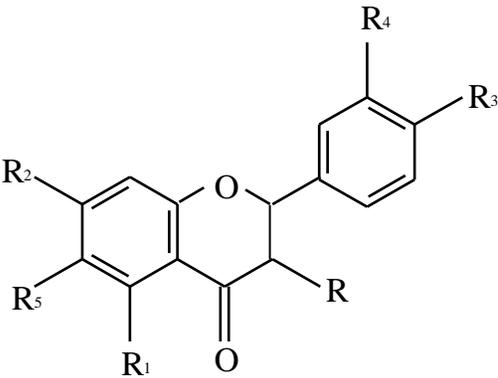
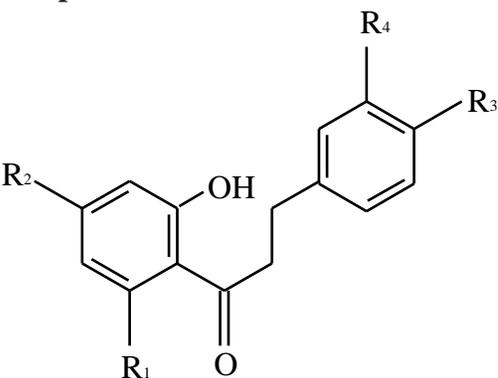
La composición química del aceite esencial de orégano consiste en hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres), sustancias azufradas y nitrogenadas. Dicho aceite es de gran importancia debido a su actividad biológica. Un estudio para la determinación de la actividad antimicrobiana y composición química del aceite esencial de *L. graveolens* revela su actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como contra levaduras y hongos filamentosos. Dicha actividad se puede relacionar con la presencia de los monoterpenos timol, carvacrol y p-cimeno (Salgueiro *et al.*, 2003). Esta propiedad antibacteriana explica su uso en la medicina tradicional para solucionar problemas de enfermedades infecciosas.

En el Cuadro 3 se presentan algunos constituyentes del aceite esencial en *Lippia graveolens* (Salgueiro *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha detectado un alto contenido de flavonoides totales, identificándose la presencia de más de veinte flavonoides, lo cual hace del orégano una hierba potencialmente saludable (Lin *et al.*, 2007). En el Cuadro 4 se enlistan los flavonoides que se han detectado en *L. graveolens*, clasificados en tres grupos de los cuales se ilustra su estructura.

Cuadro 3. Constituyentes del aceite esencial en *Lippia graveolens* (Salgueiro *et al.*, 2003).

Componentes	Porcentaje en muestra	Componentes	Porcentaje en muestra
$\alpha$ Tujeno	0.6	<b>Timol</b>	7.4
$\alpha$ Pineno	0.4	<b>Carvacrol</b>	44.8
<b>Camfeno</b>	0.1	<b>Eugenol</b>	0.1
<b>Oct-1-en-3-ol</b>	0.2	<b>Metil eugenol</b>	3.4
<b>Sabine</b>	-	$\alpha$ -Copaeno	0.1
$\beta$ -pineno	-	$\beta$ -Bourbuneno	-
$\beta$ -Myrceno	2.1	$\gamma$ -Muuroleno	0.1
$\alpha$ -felandreno	-	<b>Germacreno D</b>	-
$\Delta$ -3-Careno	0.2	$\beta$ -Selineno	0.2
$\alpha$ -Terpineno	1.7	$\alpha$ -Muuroleno	-
<i>p</i> -cimeno	21.8	$\gamma$ -Cadineno	0.4
<b>1,8-Cineol</b>	1.0	<b>Cis-Calameleno</b>	0.1
<b>Limoneno</b>	t	$\delta$ -Cadineno	0.2
<b>Z-<math>\beta</math>-Ocimeno</b>	0.1	<b>Elemol</b>	-
<b>E-<math>\beta</math>-Ocimeno</b>	-	<b>E-Nerolidol</b>	-
$\gamma$ -Terpineno	4.4	<b>Espatulenol</b>	0.2
<b>Cis-sabine-hidratado</b>	-	<b>Oxido de cariofileno</b>	0.9
<b>Terpinoleno</b>	t	<b>Globulol</b>	0.1
<b>Linalol</b>	0.9	<b>Sesquiterpenos hidrocarbonados</b>	7.7
<b>Cis-p-menth-2-en-1-ol</b>	-	<b>Sesquiterpenos conteniendo Oxígeno</b>	1.8
<b>Terpineno-4-ol</b>	1.1	<b>Guaiol</b>	0.2
<b>Borneol</b>	0.1	<b>Otros</b>	0.2
<b>Cis-piperitol</b>	-	<b>Total de identificados</b>	96.9
<b>Timil-metil éter</b>	-		
$\beta$ -Eudesmol	0.4		
<b>Monoterpenos hidrocarbonados</b>	31.4		
<b>T-Cadinol</b>	0.1		
<b>monoterpenos conteniendo Óxigeno</b>	55.8		

Cuadro 4. Estructura de los flavonoides detectados en *Lippia graveolens* (Lin *et al.*, 2007).

<p><b>Grupo I: Flavonas (R=H) y Flavonoles (R=OH o O-gli)</b></p> 	<p><b>Galangina (I-1): R=R1=R3=OH, R2=R4=R5=H</b>  <b>Apigenina 7-O-glucosido (I-2-A), Escutelareina (I-3): R1=R2=R3=R5=OH, R=R4=H</b>  <b>Luteolina (I-6): R1=R2=R3=R4=OH, R=R5=H</b>  <b>Luteolina 7-O-glucoside (I-6-A)</b>  <b>Quercetina (I-7): R=R1=R3=R2=R4=OH, R5=H</b></p>
<p><b>Grupo II: Flavanonas</b></p> 	<p><b>Pinocembrina (II-1): R1=R2=OH, R=R3=R4=R5=H</b>  <b>Naringenina (II-2): R1=R2=R3=OH, R=R4=R5=H</b>  <b>Sakuranetina (II-3): R1=R3=OH, R2=OMe, R=R4=R5=H</b>  <b>Eriodictiol (II-4): R1=R2=R3=R4=OH, R=R5=H</b>  <b>Taxifolina (II-5): R=R1=R2=R3=R4=OH, R5=H</b></p>
<p><b>Grupo III: Dihidrochalconas</b></p> 	<p><b>Floridzina (Floretina-6-O-glucosido) (III-1-A)</b></p>

Adicionalmente, se ha reportado el aislamiento de diez iridoides de los extractos metanólicos de hojas de *L. graveolens*. Los constituyentes minoritarios fueron loganina, secologanina, secoxiloganina, dimetilsecologanósido, ácido logánico, ácido 8-epi-logánico y carioptósido; como iridoides mayoritarios el ácido carioptosídico y sus derivados 6'-O-*p*-coumaroil y 6'-O-*p*-cafeoil (Rastrelli *et al.*, 1998). También se han identificado flavononas como naringenina y pinocembrina y el naftoquinoido lapachenol (Domínguez *et al.*, 1989).

El aceite esencial de orégano mexicano contiene tres compuestos mayoritarios (monoterpenos) a los que se atribuyen algunas propiedades biológicas (antioxidante y antimicrobiana) en sistemas *in vitro*: carvacrol, timol y *p*-cimeno (Silva y Dunford, 2005; Salgueiro *et al.*, 2003). En la Figura 1 se ilustra la estructura química de éstos compuestos y en la Figura 2, se presenta la concentración en que se han detectado.

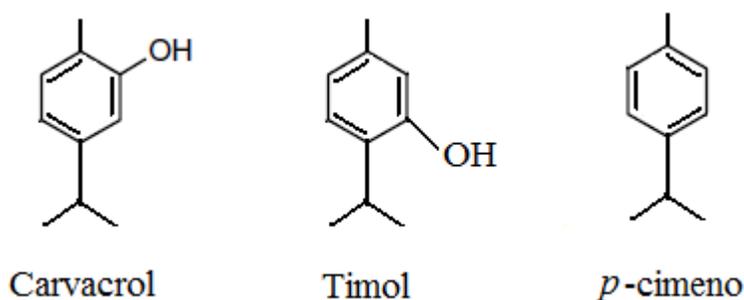


Figura 1. Estructura química de los monoterpenos mayoritario en *Lippia graveolens* (Arcila-Lozano *et al.*, 2004)

Otra aplicación muy interesante del aceite esencial de orégano, es su uso con el objetivo de disminuir la peroxidación lipídica, que es uno de los principales problemas a los que se enfrenta la industria de cárnicos durante el procesamiento, preparación y almacenamiento. Su efecto antioxidante ha generado resultados efectivos. El uso del aceite esencial de orégano, como alimento suplementario en animales destinados para consumo humano, es otra forma de evitar la peroxidación de los ácidos grasos en su carne (Botsoglou *et al.*, 2002; 2003a,b). De este modo, en aves tal como pavo y pollo, a los cuales se ha suministrado una alimentación enriquecida con estos aceites, la oxidación lipídica en su carne cruda y cocinada mantenida en refrigeración se ha reducido significativamente asignándolo así como una buena alternativa al uso del  $\alpha$ -tocoferol (Botsoglou *et al.*, 2002; 2003a,b).

Esto confirma que los compuestos antioxidantes del orégano son absorbidos y entran al sistema circulatorio después de ingerirlos lo cual advierte sus efectos contra enfermedades crónico-degenerativas (Botsoglou *et al.*, 2002; 2003a,b). La Figura 3 muestra el porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica de especias y aditivos comunes.

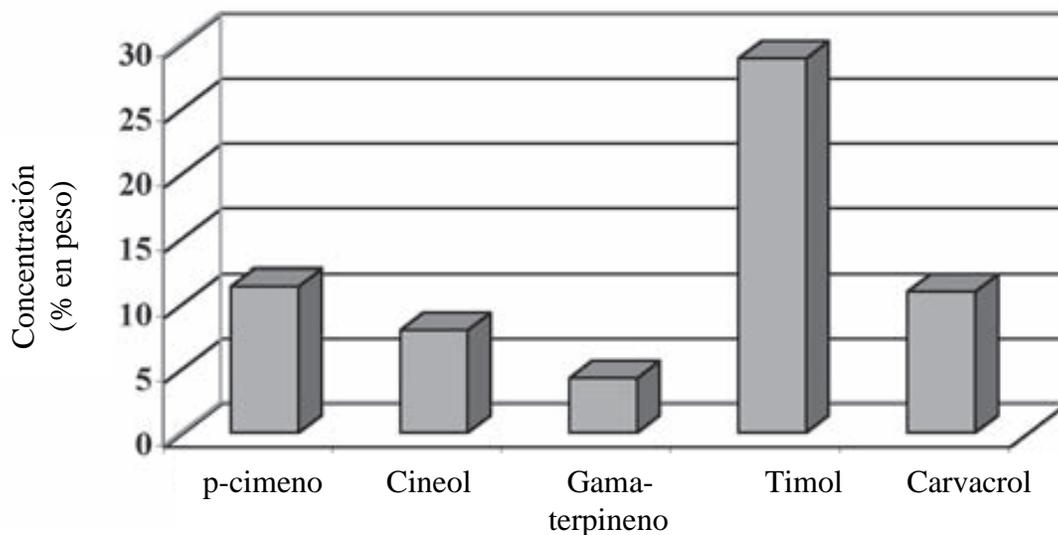


Figura 2. Concentración de los componentes mayoritarios en el aceite esencial de orégano mexicano (Silva y Dunford, 2005).

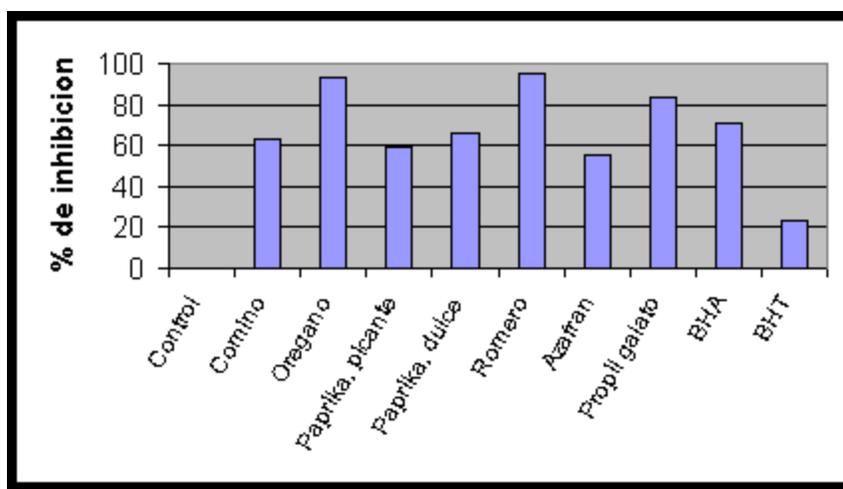


Figura 3. Inhibición de la peroxidación lipídica de especias y aditivos comunes (Arcila-Lozano *et al.*, 2004).

Martínez-Rocha y colaboradores (2008) estudiaron la actividad antioxidante y antimutagénica de extractos libres de aceite esencial de *L. graveolens* Kunth por medio de las técnicas de DPPH y microsuspensión de Kado, respectivamente. Para estos estudios se utilizaron tres muestras, las cuales fueron colectadas en Querétaro, Guanajuato y Puebla. Los resultados muestran que todos los extractos fueron capaces de atrapar los radicales DPPH. Los valores de IC<sub>50</sub> se relacionan con el contenido fenólico. Los extractos resultaron no tóxicos para las cepas TA100 y TA98 a las concentraciones probadas e inhibieron un 39 y 30% el efecto antimutagénico producido por los mutágenos 4-nitro-*o*-fenilendiamina y azida de sodio, respectivamente.

### 2.3.2 Características de metabolitos secundarios antioxidantes presentes en el Orégano mexicano

#### Quercetina

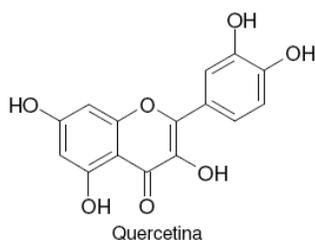


Figura 4. Estructura química de la quercetina

La quercetina (Figura 4) forma parte de la familia de los flavonoides, compuestos de dos anillos bencénicos unidos a través de un anillo pirona heterocíclico y se encuentra principalmente en manzanas, tés, vino rojo, etc. Algunas de las propiedades que se han detectado en quercetina son protección cardiovascular, anti-cáncer, anti-úlceras, anti-viral, anti-alérgica y anti-inflamatoria y esto a causa de su capacidad antioxidante, actividad para atrapar radicales libres, efecto protector en DNA, anti-tumor, anti-bacterial (Lin *et al.*, 2006)

La quercetina se encuentra en alimentos de consumo general y está presente en plantas principalmente en su forma glicosilada (rutina), se considera que estos metabolitos antes de ser adsorbidos son primero hidrolizados por la microflora. Normalmente, la

quercetina se encuentra presente junto con rutina o bien está presente como producto hidrolítico de la misma. En tanto que es posible la presencia de quercetina y rutina en medicamentos y en hierbas, resulta importante la detección de ambos compuestos en dichas muestras y existen diversas técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), electroforesis capilar, técnicas de separación acopladas con técnicas de detección como espectrofotometría UV, espectrofotometría de masas, técnicas electroquímicas, etc. Estas técnicas suelen ser efectivas en cuanto a selectividad en el análisis, sin embargo con algunas desventajas. Lin en el 2006, desarrollo una técnica electroquímica para la detección de éstos dos compuestos en una mezcla, para lo cual propuso el uso de un electrodo de pasta de nanotubos de carbono empleando voltamperometría cíclica y diferencial de pulsos obteniendo señales de oxidación y reducción bien definido y una buena diferenciación de quercetina y rutina (Lin *et al.*, 2006).

La quercetina es considerada el mejor antioxidante debido a su estructura química ya que presenta un grupo catecol en el anillo B y un grupo 3-hidroxi en el anillo C (Teixeira *et al.*, 2005). En todos los flavonoles, la señal de oxidación detectada a potenciales altos corresponde a los grupos -OH ubicados en la posición meta del anillo A. En condiciones de concentración de quercetina de  $3.2 \times 10^{-5}$  M, en una solución de metanol al 70%, solución amortiguadora de acetato de sodio-ácido acético (0.1M, pH 4.5) y velocidad de barrido de 100 mV/s, se ha detectado mediante voltamperometría cíclica tres potenciales de oxidación de 108, 530 y 806 (mV) y una señal de reducción a 88 mV. La señal de oxidación presente a 530 mV se debe probablemente a la formación de un radical producido durante el proceso de oxidación (Cosio *et al.*, 2005).

Los responsables de la capacidad antioxidante de la quercetina son los grupos -OH presentes en su anillo B (Cosio *et al.*, 2005). Una señal de oxidación a potenciales bajos positivos se presenta en voltamperometría cíclica debida a la oxidación del grupo catecol 3,4-dihidroxi en el anillo B y es un proceso generado por la transferencia de dos protones y dos electrones (Zare *et al.*, 2005, Lin *et al.*, 2006). A potenciales mayores, es posible apreciar una segunda señal de oxidación la cual se debe al grupo 3 hidroxilo en el anillo C. Los grupos 5,7 hidroxilo del anillo A también son capaces de donar electrones pero a

potenciales muy elevados. A pH mayor que 9, soluciones fuertemente básicas, la quercetina se encontrará deprotonada y por lo tanto estable (Lin *et al.*, 2006).

### Rutina

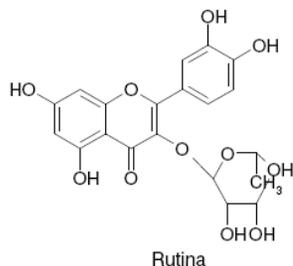


Figura 5. Estructura química de la rutina

La rutina (Figura 5) está presente en plantas y en la dieta humana, también ha sido usada como medicina terapéutica (Zare *et al.*, 2007). Este flavonoide es el glucósido de quercetina y es posible encontrarlo en las hojas de las verduras en vinos y tés (Bravo 1998) y en grandes cantidades en flores y hojas de alfalfa (Kreft *et al.*, 1999). La rutina, tiene propiedades vasoconstrictoras, espasmolíticas, antivirales (Kreft *et al.*, 2002), anti-inflamatorias, anti-trombóticas, antioxidantes, anticarcinogénicas, vasoprotectoras, citoprotectoras, hepatoprotectoras, y relajante muscular (Srinivasan *et al.*, 2005). La rutina también ha sido estudiada electroquímicamente mediante voltamperometría diferencial de pulso encontrando que éste flavonoide presenta una señal de oxidación a un potencial de 383 mV a pH 2 (Romani *et al.*, 2000).

La rutina, conocida también como 3-rutinósido de quercetina contiene una ortohidroquinona en su estructura. La rutina ha sido empleada para sensar hidroxilamina.

Para las reacciones redox de rutina en el rango de pH 2 a 11 presenta una transferencia de dos protones y dos electrones (Zare *et al.*, 2007).

## Naringenina

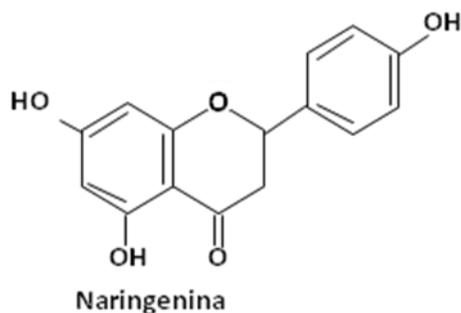


Figura 6. Estructura química de la naringenina

La naringenina (Figura 6) se encuentra presente en jugo de naranja y toronja principalmente en su forma glicosilada (Morikawa *et al.*, 2008). Es considerado como un compuesto con actividad antioxidante débil o ninguna (Buratti *et al.*, 2006), ya que posee solo tres grupos hidroxilos y su anillo heterocíclico C es saturado lo cual genera una menor interacción entre el anillo A y B (Soobrattee *et al.*, 2005). Otra observación importante es que la naringenina no presenta un grupo catecol en el anillo B, motivo por el cual tiene actividad débil para atrapar radicales, Esto se debe a que el grupo catecol en el anillo B es capaz de ceder al radical fácilmente dos electrones para transformarse en quinona (Won *et al.*, 2006). Se ha sugerido que las flavanonas tienen un efecto protector contra cánceres relacionados con hormonas tal como de pecho y próstata y síntomas de la menopausia (Soobrattee *et al.*, 2005), hiperlipidemia y biosíntesis lipídica. En ratas hiperlipidémicas la forma glicosilada de naringenina (naringina), reduce la concentración de plasma de triglicérido y colesterol (Morikawa *et al.*, 2008).

La naringenina, al igual que muchos flavonoides presenta propiedades ácido-base por lo cual pequeños cambios de pH pueden generar grandes efectos en su actividad biológica, así su actividad dependerá siempre de algunas propiedades del medio en que se encuentre (pH, salinidad y fuerza del solvente) ya que dichos parámetros pueden cambiar la estructura de la molécula. Webb y Ebeler en el 2004 realizaron un estudio sobre la estabilidad de los flavonoides mediante espectrofotometría de UV visible variando el pH en un intervalo de 3 a 9. La naringenina presenta un cambio en la longitud de onda de

absorbancia máxima que va de 290 nm a 325 nm tal como se observa en la Figura 7, lo cual indica que hay un cambio en su estructura molecular en ese rango de pH (Webb y Ebeler, 2004).

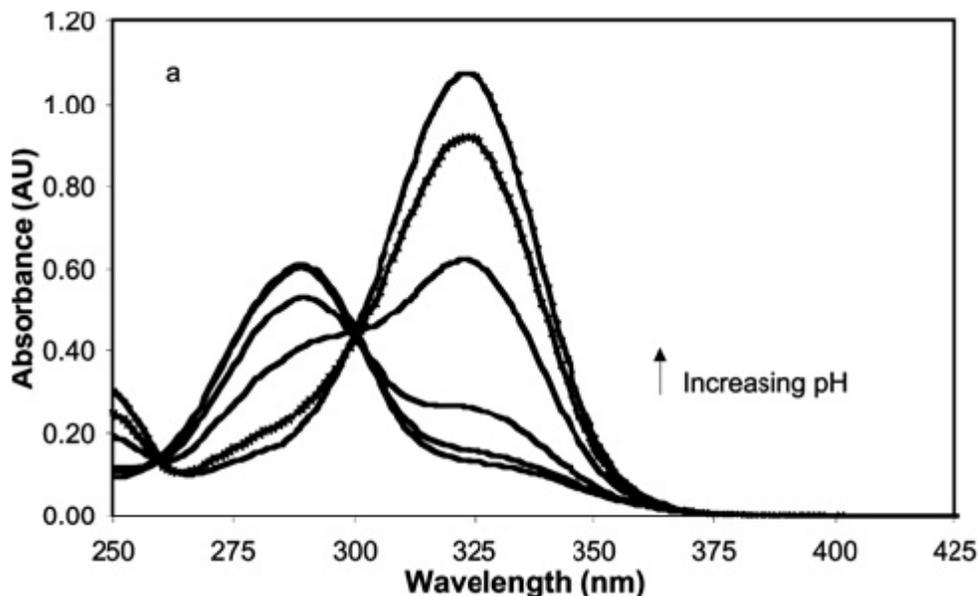


Figura 7. Naringenina 370  $\mu$ M en 10% de metanol con pH ajustado por adición mínima de NaOH o HCl para pH de 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9 (Webb y Ebeler, 2004).

Diversos ensayos para determinar la actividad antioxidante de la naringenina han sido utilizados, entre éstos el ABTS y DPPH. Usando HPLC acoplado con un ensayo de detección coulombimétrico, es posible correlacionar la actividad antioxidante de ácidos fenólicos con su respuesta de potencial máximo detectado. Sin embargo, según Yang y colaboradores en el 2001, para flavonoides dicha técnica no pudo ser establecida, probablemente por la sobreestimación en los valores de respuesta de potencial, así cuando fue evaluada la actividad antioxidante para la naringenina los valores resultantes eran iguales a los resultados obtenidos para quercetina a pesar de su diferencia estructural, mientras que en realidad el potencial de oxidación de quercetina es menor que el de la naringenina (Yang *et. al.*, 2001)

Floridzina

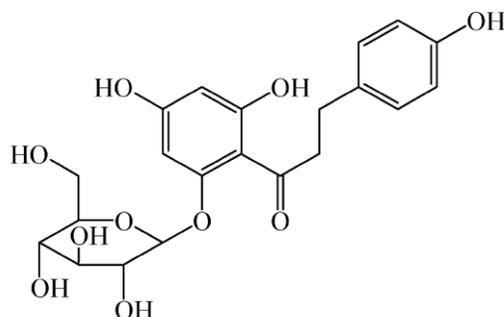


Figura 8. Estructura química de la floridzina

La Floridzina (Figura 8), es un flavonoide que se encuentra presente en productos derivados de la manzana y es la forma glucosídica (monoglucosido) de la fletina. Al llegar la floridzina al intestino delgado, puede ser hidrolizada a fletina. Es capaz de inhibir la absorción de glucosa intestinal presentando efectos antidiabéticos (*Zhao et al.*, 2004, *Shao et al.*, 2008). De manera adicional, inhibe la reabsorción de glucosa renal (*Zhao et al.*, 2004). Por otra parte, existen algunos compuestos que generan complicaciones diabéticas, la floridzina consigue evitar la formación de los mismos ya que atrapa eficazmente especies reactivas dicarbonilo tal como metilglioxal y glioxal bajo condiciones fisiológicas, los cuales de estar presentes en el organismo reaccionan con sustancias biológicas tales como proteínas, fosfolípidos y ADN formando productos finales de glicosilación avanzada que generan trastornos mayores en personas diabéticas (*Shao et al.*, 2008). Se ha encontrado que la floridzina es un potente antioxidante en sistemas *in vitro* y que mejora la resorción de hueso e inhibe la actividad osteoblástica esto se debe a que los antioxidantes son capaces de simular la formación de hueso y reducir la generación de radicales libres, así puede sugerirse que la floridzina es capaz de prevenir la pérdida acelerada de hueso en osteoporosis y proporcionar actividad antioxidante y anti-inflamatoria (*Puel et al.*, 2005). La Floridzina, también ha sido detectada en fresa por técnicas cromatográficas combinadas con espectrometría de masas, por lo que ésta puede ser usada como control de autenticidad de productos de fresa, así por ejemplo, la presencia de la floridzina en jugo de pera indica adulteración de éste con jugo de manzana (*Hilt et al.*, 2003).

## Luteolina

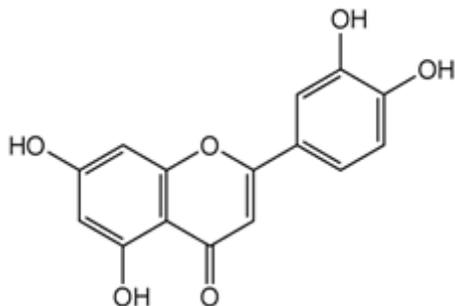


Figura 9. Estructura química de la luteolina

La luteolina (Figura 9) es una flavona con cuatro grupos hidroxilos ubicados en las posiciones 3', 4', 5 y 7, se encuentra en muchas plantas de carácter medicinal y es uno de los flavonoides con gran actividad biológica. Principalmente está presente en perejil, tomillo y menta. Tiene propiedades tales como protección cardiovascular, anti-cáncer, anti-úlceras, anti-alérgicas, anti-inflamatorias y anti-viral (Liu *et al.*, 2008). La luteolina es el principal colorante natural y se obtiene de las hojas y tallos de *Reseda luteola L.* cultivada en el centro de Europa, India y China. La luteolina junto con la apigenina son ampliamente usados en la industria textil (Corredor *et al.*, 2009). En el 2000, Romani y colaboradores, realizaron un análisis para la detección de luteolina en extractos naturales mediante la técnica electroquímica de voltamperometría diferencial de pulso (DPV) con electrodos serigrafados. Los resultados obtenidos con ésta tecnica se correlacionan bien con los obtenidos mediante HPLC-DAD en una muestra compleja (extracto de uva); sin embargo, una mayor sensibilidad es observada con la técnica electroquímica usando concentraciones de micromoles en lugar de milimoles en HPLC-DAD (Romani *et al.*, 2000). El grupo catecol de luteolina y los grupos hidroxilos en la posición 5 y 7 la hacen un antioxidante más potente que otros flavonoides como la apigenina (Soobrattee *et al.*, 2005). Gomes y colaboradores en el 2008 realizaron voltamperometría cíclica para la determinación de la actividad antioxidante de algunos compuestos, entre ellos la luteolina diluida en dimetilsulfoxido (DMSO) y en solución amortiguadora de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a un pH de

7.4 donde detectan una señal de oxidación en +0.223 V y una de reducción (Gomes *et al.*, 2008). Liu y colaboradores en el 2008, realizaron un estudio de luteolina mediante voltamperometría cíclica y voltamperometría diferencial de pulso a pH 4, a fin de conocer su comportamiento electroquímico, donde encuentran que la luteolina presenta dos señales de oxidación de las cuales la primera presenta un sistema químicamente reversible, con un potencial de pico anódico (Epa) de 0.410 V y potencial de pico catódico (Epc) de 0.379 V y la segunda señal de oxidación, presenta un sistema irreversible a un potencial de 1,05 V (Liu *et al.*, 2008).

### Apigenina

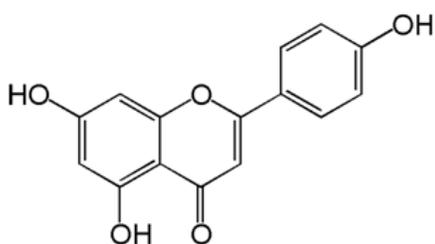


Figura 10. Estructura Química de la apigenina

La apigenina (Figura 10) pertenece al grupo de las flavonas y está presente en condimentos, hierbas, en frutas como la naranja y vegetales (Liu *et al.*, 2008, Xing *et al.*, 2009) y ha mostrado poseer actividad antioxidante y efectos biológicos con propiedades anti-carcinogénicas, anti-inflamatorias y anti-mutagénicas. La apigenina ha sido analizada mediante HPLC, los estudios mediante esta técnica en muestras complejas por lo general tienen limitantes tal como tiempos elevados en el análisis, poca resolución y fácil contaminación en la columna (Xing *et al.*, 2009). El análisis de la apigenina en plantas puede ser realizado mediante técnicas como quimioluminiscencia con inyección de flujo, electroforesis capilar y cromatografía de gases, sin embargo éstas por lo general requieren de pre-tratamientos complicados de la muestra y no son lo suficientemente sensibles para detectar la apigenina en muestras pequeñas. Otra opción para su análisis es el empleo de las técnicas electroquímicas las cuales son muy sensibles capaces de detectar concentraciones

del orden de nanomolar e incluso picomolar (Liu *et al.*, 2008). Gomes y colaboradores en el 2008, realizaron un estudio de actividad antioxidante de la apigenina mediante voltamperometría cíclica, detectando dos señales de oxidación poco definidas.

## 2.4 Técnicas para la determinación de capacidad antioxidante in vitro

### 2.4.1 Técnicas convencionales

Los requisitos necesarios para que un antioxidante sea realmente efectivo, incluyen algunos rasgos estructurales (Rice-Evans, 1999):

- Existencia de donadores de electrones y su interacción con radicales libres.
- Los donadores de electrones deben poseer potenciales de reducción apropiados, en relación a aquellos de los pares redox de los radicales para ser atrapados.
- Habilidad para deslocalizar el radical resultante.

A los compuestos fenólicos se les ha demostrado su capacidad antioxidante. Algunas de las técnicas para medir dicha capacidad antioxidante son: Poder Antioxidante Reductor de Fierro (FRAP), Folin-Ciocalteu (F-C), 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>), Capacidad para Absorber el Radical Oxígeno (ORAC), Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC) (Prior *et al.*, 2005), entre otros.

#### ORAC:

Un antioxidante puede inhibir las oxidaciones generadas por el radical peróxido. ORAC es la técnica que mide dicha capacidad. La actividad antioxidante determinada por ésta técnica refleja el rompimiento de la cadena de radicales por transferencia de átomos de hidrógeno. El radical peróxido se hace reaccionar con una sonda fluorescente que forma un producto no fluorescente que puede ser cuantificado fácilmente por fluorescencia. La capacidad antioxidante se determina por disminución en la velocidad y cantidad de producto formado conforme avanza el tiempo (Prior *et al.*, 2005).

#### FRAP:

Mide la capacidad del sustrato para reducir  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , esta reacción es seguida por la capacidad del  $\text{Fe}^{2+}$  para formar un complejo colorido con la tripiridil-s-triazina (TPTZ). La reacción detecta compuestos con potenciales redox  $<0.7\text{V}$  (el potencial redox de  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) (Prior *et al.*, 2005)

#### ABTS<sup>+</sup>:

Se basa en la habilidad de los antioxidantes para atrapar el radical catión de larga vida ABTS<sup>•+</sup>. Preliminarmente el ABTS es oxidado por radicales peróxido u otros oxidantes a su radical catión ABTS<sup>•+</sup> el cual presenta un color azul intenso. La capacidad antioxidante se determina como la capacidad de los compuestos para estabilizar al ABTS<sup>•+</sup>, lo que se ve reflejado en la decoloración de la mezcla de reactivos (Prior *et al.*, 2005).

#### DPPH:

El DPPH<sup>•</sup> tiene un color púrpura intenso y a diferencia del ABTS<sup>•</sup> no se produce antes del desarrollo de la técnica ya que se encuentra disponible comercialmente. Se basa en la medición de la capacidad de los antioxidantes para reducir al DPPH<sup>•</sup>. Dicha capacidad se sigue a  $\lambda_{\text{max}} = 515 \text{ nm}$  medida por la disminución en su absorbancia (Prior *et al.*, 2005).

#### Folin-Ciocalteu

La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se puede llevar a cabo por la técnica de Folin-Ciocalteu cuyo fundamento se basa en una reacción de oxidación/reducción. Es un método simple, sensible y preciso; sin embargo, la reacción es lenta a pH bajo, y carece de especificidad.

En el Cuadro 5 se resumen algunas ventajas y desventajas de los métodos para la determinación de capacidad antioxidante en alimentos y suplementos dietéticos descritos anteriormente (Van den Berg *et al.*, 1999, Prior *et al.*, 2005).

Cuadro 5. Ventajas y desventajas de métodos para la determinación de capacidad antioxidante y fenólicos. \* Transferencia protónica.

\*\*Transferencia electrónica (Van den Berg *et al.*, 1999; Prior *et al.*, 2005)

Método	Mecanismo de reacción	Ventaja	Desventaja
ORAC	TP*	Proporciona una fuente controlable de radicales peróxido. Se pueden evaluar compuestos o extractos hidrofílicos e hidrofóbicos	Es sensible a la temperatura y poca variación de la misma en áreas externas del microplato, pueden disminuir la reproducibilidad. Debido a que usa marcadores fluorescentes, requiere detección por fluorómetro el cual no se encuentra fácilmente en laboratorios. Requiere de un gran tiempo de análisis (~1h)
FRAP	TE**	Es simple, rápido, barato y no requiere equipo especializado.	No siempre las reacciones se completan en 4 min, por lo que sus resultados pueden variar grandemente dependiendo de la escala de tiempo del análisis. Algunos Polifenoles requieren tiempos largos de reacción para la detección (ej. 30 min). Mide sólo la capacidad de reducción basada en ión férrico el cual no es relevante fisiológicamente para la actividad antioxidante.
Folin-Ciocalteu	TP* y TE**	Es simple, puede ser usado en caracterización y estandarización de muestras botánicas.	Algunas sustancias inorgánicas pueden reaccionar con el reactivo F-C y dar con ello concentraciones de fenólicos aparentemente elevadas.

Cuadro 5. (Continuación). Ventajas y desventajas de métodos para la determinación de capacidad antioxidante y fenólicos. \* Transferencia protónica. \*\*Transferencia electrónica (Van den Berg *et al.*, 1999; Prior *et al.*, 2005)

ABTS <sup>+</sup>	TP* y TE**	Es operacionalmente simple, el ABTS <sup>+</sup> reacciona rápidamente con antioxidantes, puede usarse en un amplio rango de pH, es aplicable con solventes acuosos y orgánicos, no es afectado por la fuerza iónica, puede determinar capacidad de antioxidantes hidrofílicos e hidrofóbicos	Esta técnica se basa en la hipótesis de que las reacciones redox se llevan a cabo rápidamente y que son completadas en 6min, sin embargo esto no siempre es así, por lo que sus resultados pueden variar dependiendo del tiempo de análisis. Por ejemplo, algunos Polifenoles reaccionan mas lentamente y requieren tiempos de reacción mayores (incluso hasta 30min) para su detección, por lo que si la determinación es realizada en menor tiempo puede estarse haciendo una lectura antes de que la reacción finalice y de este modo obtenerse valores minimizados de TEAC, provocando conclusiones erróneas. La evaluación cuantitativa de la capacidad antioxidante usando TEAC, puede ser dificultosa o incluso imposible, sin embargo puede ser usada para clasificar el orden de los antioxidantes.
DPPH	TP* y TE**	Es simple, rápida, solo requiere un espectrofotómetro UV-Vis	Los compuestos probados pueden tener espectros que se traslapan con los del DPPH a 515 nm lo que provoca una interpretación complicada. Antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peróxidos, pueden reaccionar lentamente e incluso ser ineficaces debido a la inaccesibilidad estérica. El DPPH es decolorado también por agentes reductores así como por transferencia de hidrógeno, lo cual contribuye a interpretaciones inexactas de la capacidad antioxidante.

#### 2.4.2 Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas han sido empleadas para la evaluación de extractos de alimentos en términos de poder antioxidante, debido a su rapidez, simplicidad y bajo costo (Barros *et al.*, 2008).

Existe una relación entre la conducta electroquímica y el poder antioxidante, de donde se dice que un bajo potencial de oxidación significa alto poder antioxidante. Esta técnica puede diferenciar fácilmente la composición de ácidos fenólicos totales y flavonoides. Una de las ventajas es la determinación rápida del poder antioxidante *in vitro* (Blasco *et al.*, 2004).

El mecanismo de reducción electroquímica del oxígeno en el electrodo dentro de una celda electroquímica, es muy similar al metabolismo del oxígeno en humanos, donde se lleva a cabo una reducción de dos electrones de oxígeno por la cadena respiratoria y finalmente el resultado es la formación de moléculas de agua. El ión superóxido ( $O_2^-$ ) altamente reactivo, es un producto del metabolismo de oxidación que se forma a partir de una reducción mono-electrónica y puede ser oxidado y de este modo transformarse en oxígeno, o bien se puede reducir más para formar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). En una persona sana, durante el proceso biológico normal, tanto el superóxido como el peróxido de hidrógeno, se forman en cantidades muy pequeñas y existen mecanismos de defensa naturales así como la enzima superóxido dismutasa, la cual remueve de manera efectiva al superóxido y otras especies de oxígeno activas (Korotkova *et al.*, 2001). No obstante en situaciones como ingesta de fármacos, radiación UV o disfunción metabólica, dichas especies reactivas de oxígeno se pueden generar en cantidades lo suficientemente altas como para exceder la capacidad de defensa normal del cuerpo lo cual puede causar efectos deletéreos en tejidos. De ese modo, el superóxido es altamente reactivo, tóxico y es capaz de causar la oxidación de biomacromoléculas, tejidos y la inicialización de la reacción en cadena; por lo tanto, se buscan sustancias que puedan reaccionar rápidamente con el superóxido.

En las técnicas electroquímicas, los antioxidantes reaccionan con el superóxido disminuyendo su concentración en el electrodo. De ese modo la corriente de reducción

electroquímica del oxígeno disminuye y por lo tanto puede ser usado como un valor comparativo de la actividad antioxidante en la solución de análisis. De ese modo la técnica voltamperométrica permite no sólo la determinación de antioxidantes activos sino también permite considerar el comportamiento electroquímico, la influencia de velocidad y tiempo de acción de oxidación sobre la reducción electroquímica del oxígeno; eliminando con ello los problemas en la investigación de antioxidantes como composición, dosificación, grado de actividad, periodo y velocidad de la misma (Korotkova *et al.*, 2001).

Los antioxidantes pueden actuar como agentes reductores y en disolución son fácilmente oxidados sobre electrodos (Barros *et al.*, 2008).

#### 2.4.2.1 Voltamperometría diferencial de pulso

La voltamperometría diferencial de pulso es una técnica extremadamente útil para mediciones de especies orgánicas e inorgánicas presentes en cantidades mínimas (trazas). La voltamperometría diferencial de pulso permite mediciones a concentraciones tan bajas como  $10^{-8}$  M (cerca de  $1\mu\text{g L}^{-1}$ ), (Wang, 2000).

La técnica de voltamperometría diferencial de pulso, puede ser un excelente método para determinar los compuestos fenólicos y flavonoides constituyentes del orégano, establecer la capacidad antioxidante de los mismos y la concentración de fenoles totales. Con esta técnica no se necesitan otros reactivos, sólo se requiere de los estándares, la muestra, un electrolito soporte y un sistema de celda de tres electrodos. También se sabe, que dada la sensibilidad de la técnica, nuevos compuestos pueden ser identificados (Blasco *et al.*, 2004).

En un estudio para la diferenciación de flavonoides y ácidos fenólicos predominantes en jugos de manzana y pera, se empleó la voltamperometría diferencial de pulso usando un electrodo de carbón vítreo. Esta técnica permitió la rápida detección de dichos compuestos por oxidación electroquímica a pH seleccionados. En la Figura 11, se presentan los voltamperogramas de algunos estándares fenólicos, y en la Figura 12, los voltamperogramas traslapados de los jugos de manzana (Figura 12 A) y de pera (Figura 12 B), ambos a pH 2.0 y 7.5 (Blasco *et al.*, 2004).

Un estudio para determinar la actividad antioxidante de compuestos bien conocidos como ácido ascórbico y cítrico, glucosa, mezcla de los mismos, extracto de té verde, vinagre de manzana y de los fármacos ahemodesum, poliglucinum y solución Ringer, fue realizado empleando la técnica de voltamperometría diferencial de pulso. En las Figuras 7 y 8 se muestran las curvas del cambio relativo de la densidad de corriente de reducción de oxígeno a diferentes concentraciones del antioxidante; y en el Cuadro 6 se muestran los coeficientes de actividad antioxidante ( $K$ ) y el porcentaje de error experimental ( $\sigma/\%$ ) para los antioxidantes estudiados. Los valores de  $K$  con signo menos mostrados en el Cuadro, denotan un incremento de la corriente de reducción del oxígeno al adicionar esas sustancias al electrolito soporte (Korotkova *et al.*, 2001).

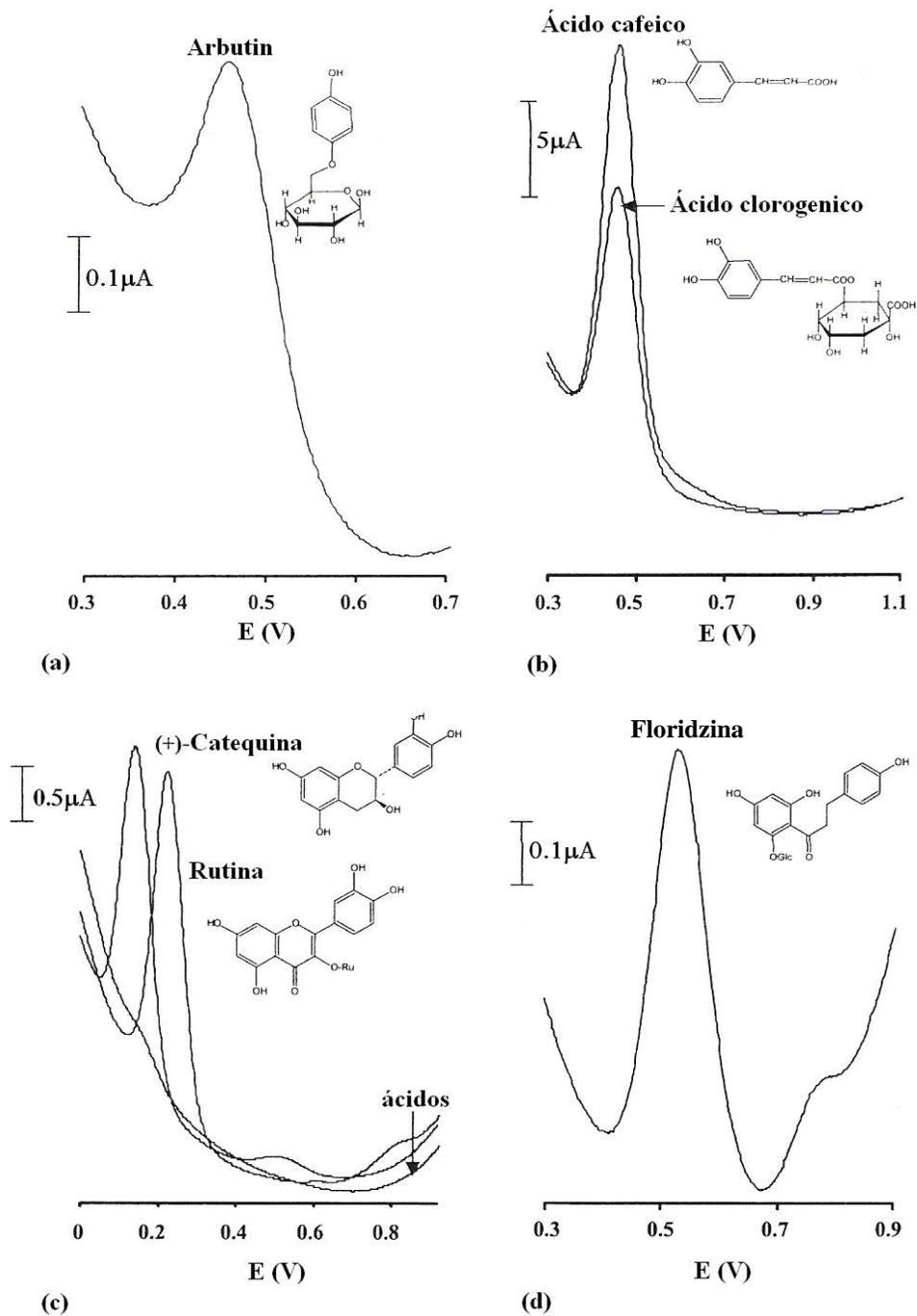


Figura 11. Voltamperogramas de estándares fenólicos: (a) característico para fenólicos: arbutín (pH 7.5); (b) Ácidos cinámicos predominantes: ácido cafeico y clorogénico (pH 2.0); (c) Flavonoides predominantes: Flavan 3-ols ((+)-catequina) y flavanoles (rutina) (pH 7.5 ); (d) fenólico fingerprint: Floricidín (pH 7.5) (Blasco *et al.*, 2004).

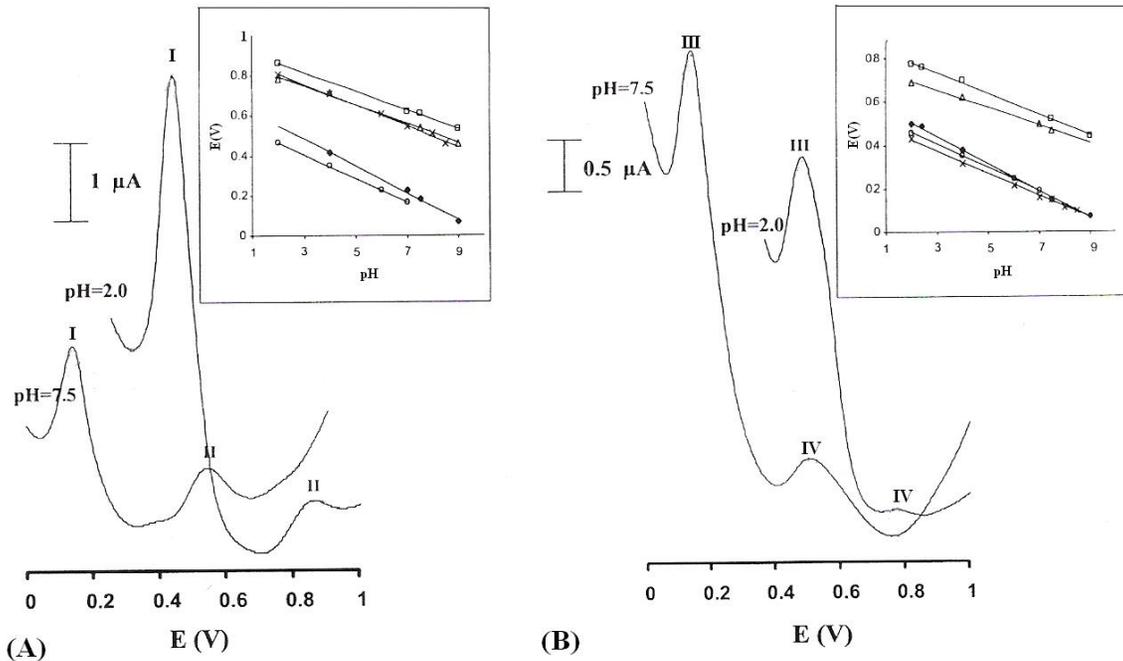


Figura 12. Voltamperogramas traslapados de (A) jugo de manzana y (B) jugo de pera a pHs leídos. El pico I, fue asignado a (+)-catequina a pH 7.5 y por (+)-catequina + cinámico a pH 2.0. El pico II fue asignado a (+)-catequina + floridicin a ambos pHs. El pico III fue asignado a (+)-catequina a pH 7.5 y por (+)-catequina + cinámico a pH 2.0. Pico IV, asignado a (+)-catequina + arbutína a ambos pHs (Blasco *et al.*, 2004).

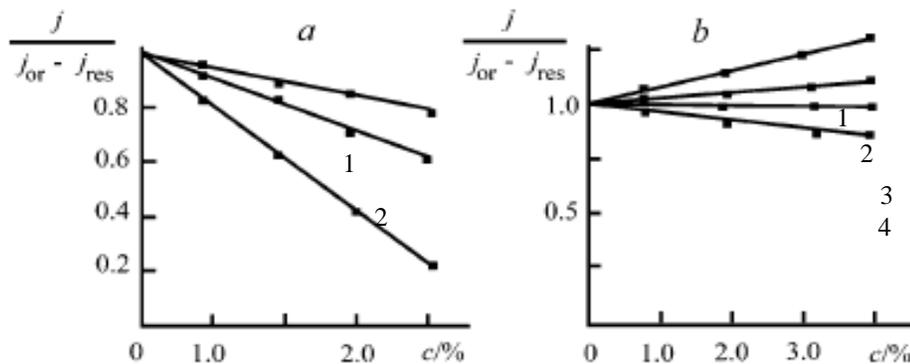


Figura 13. Curvas del cambio relativo de la densidad de corriente de reducción de oxígeno ( $j/(j_{or} - j_{res})$ ) contra la concentración del antioxidante en la solución soporte para (a) antioxidante: 1, ácido cítrico; 2, glucosa; 3, ácido ascórbico; (b) 1, vinagre de manzana; Fármacos: 2, poliglucinum; 3, Solución Ringer; 4, Haemodesum. Cabe mencionar que el orden descrito va de arriba hacia abajo ( $j_{or}$  es la densidad de corriente límite de la reducción de oxígeno sin antioxidantes en la solución y  $j_{res}$  es la densidad de corriente residual sin oxígeno en la solución a potencial constante,  $j$  es la densidad de corriente) (Korotkova *et al.*, 2001).

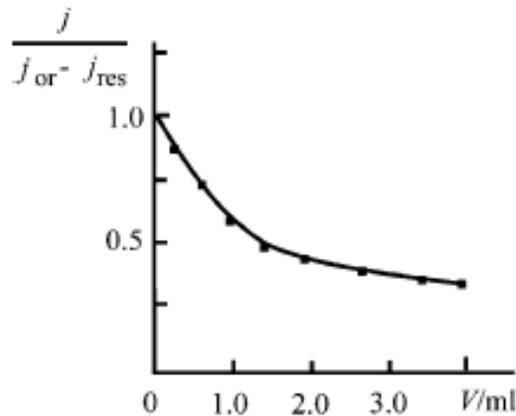


Figura 14. Curva del cambio relativo de la densidad de corriente de reducción del oxígeno contra volumen de extracto de té verde en 5ml de solución soporte (Korotkova *et al.*, 2001).

En el Cuadro 6, se muestran los coeficientes de actividad antioxidante de algunas sustancias, productos alimenticios y fármacos. Se puede observar que tanto el ácido ascórbico como la glucosa, muestran mayor actividad antioxidante en comparación con el ácido cítrico, los fármacos y productos alimenticios de estudio. El vinagre de manzana y la solución de poliglucinum no presentan actividad antioxidante, incluso la corriente de reducción electroquímica del oxígeno, se ve incrementada en presencia de dichas sustancias. En lo que respecta al té verde, éste muestra una buena actividad antioxidante debido a su contenido de flavonoides. Sin embargo en la Figura 14, se puede observar que la curva del cambio de la densidad de corriente de reducción del oxígeno contra el volumen del extracto es muy diferente a las curvas de los demás antioxidantes (Figura 13). Se deduce que grandes volúmenes de té verde no provocarán una mayor reducción en la corriente de oxígeno por lo que se puede decir que el consumo del té verde no genera daño en el cuerpo humano incluso en grandes cantidades no así para el caso del ácido ascórbico y glucosa.

Cuadro 6. Coeficientes de actividad antioxidante para las sustancias investigadas, algunos productos alimenticios y fármacos (Korotkova *et al.*, 2001).

Substancia	K	$\sigma/\%$	Substancia	K	$\sigma/\%$
Ácido ascórbico	0.50	4.7	Solución ringer	0.001	3.6
Glucosa	0.32	4.5	Poliglucinum	-0.09	5.6
Ácido cítrico	0.18	3.9	Extracto de té verde	0.45	4.5
Haemodesum	0.08	5.8	Vinagre de manzana	-0.03	5.6

Los resultados en el estudio mencionado, demuestran que la técnica electroquímica de voltamperometría diferencial de pulso es un enfoque altamente atractivo, conveniente y especialmente sensible (Korotkova *et al.*, 2001).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las especies vegetales usadas como condimento han creado expectativas prometedoras no sólo en aspectos culinarios, sino también como agentes antimicrobianos y antioxidantes para su uso en la industria y en la medicina. Este es el caso del orégano mexicano del cual ha sido estudiado el contenido de su aceite esencial y la actividad antioxidante de sus compuestos fenólicos a través de técnicas convencionales; sin embargo, existen técnicas electroquímicas, las cuales poseen gran sensibilidad, bajo costo, son fáciles de usar, no requieren reactivos adicionales y por lo tanto, con ellas es posible obtener, utilizando pequeñas cantidades, de manera rápida, fácil y confiable, información sobre la actividad antioxidante, incluso en muestras complejas.

Es por esto que en el presente proyecto se plantea el análisis de la actividad antioxidante de los compuestos metabólicos y componentes polares y no polares de *Lippia graveolens* mediante la técnica electroquímica de voltamperometría diferencial de pulso.

## 4. OBJETIVO

Determinar la capacidad antioxidante y evaluar la relación estructura molecular-actividad antioxidante de los metabolitos secundarios puros, extractos polares y aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) al ser oxidados, mediante la técnica de voltamperometría diferencial de pulso.

### 4.1 Objetivos específicos

Obtener las respuestas voltamperométricas de los compuestos puros mayoritarios contenidos en los extractos polares y el aceite esencial del orégano

- Extraer el aceite esencial de *Lippia graveolens* de muestras de orégano colectadas en Querétaro, Guanajuato y Puebla.
- Obtener la actividad antioxidante de los extractos polares y no polares de *L. graveolens* mediante voltamperometría diferencial de pulso
- Comparar los resultados de los estudios electroquímicos para el aceite esencial con los resultados de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Materiales y métodos

#### 5.1.1 Materiales

Para el desarrollo de la presente disertación, se utilizó orégano mexicano (*Lippia graveolens*) recolectado en su etapa de floración en las comunidades de San Juan Raya, Puebla; Victoria, Guanajuato y Peñamiller, Querétaro. Los estándares usados para la determinación de los compuestos metabólicos en el aceite esencial fueron p-cimeno, timol y carvacrol; y para los extractos polares se identificaron tres grupos de flavonoides: flavonas (galangina, apigenina, luteolina, quercetina); flavanonas (naringenina) y dihidrochalconas (floridzina) todos obtenidos de la compañía Sigma-Aldrich. El metanol y demás reactivos no especificados fueron adquiridos de la compañía J.T. Baker.

## 5.1.2. Métodos

### 5.1.2.1 Extracción:

La extracción del aceite esencial se realizó mediante una hidrodestilación de 100 g de orégano usando un equipo tipo Clevenger.

### 5.1.2.2 Voltamperometría diferencial de pulso.

Esta técnica fue empleada para la determinación de la actividad antioxidante de los compuestos metabólicos del aceite esencial del orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) y de sus extractos polares; para lo cual se empleó un potencióstato Bas Epsilon y un sistema de celda de tres electrodos a la que se incorporó un electrodo sólido estacionario (carbón vítreo) como electrodo de trabajo, Ag/AgCl (3M KCl) como electrodo de referencia y un electrodo auxiliar de alambre de platino.

Los estándares que se sabe están contenidos en el extracto polar del orégano se diluyeron apropiadamente en una solución amortiguadora Britton-Robinson (0.04 M en los ácidos fosfórico, acético y bórico) a pH 2, 5, 7.5 y 10, los estándares que se encuentran en el extracto no polar fueron diluidos en una solución amortiguadora Sørensen a pH 2, 5, 7.5 y 10, todos a una concentración de 100  $\mu$ M. El electrodo de carbón vítreo fue pulido con alúmina sobre un paño suave y enjuagado con agua desionizada después de cada experimento y pulido con lija y posteriormente con alúmina después de hacer el análisis en los aceites esenciales.

Se obtuvo inicialmente un voltamperograma de la solución amortiguadora (electrolito soporte) antes de adicionar el analito de estudio. El barrido se realizó en una ventana de potencial de 0 a + 1.2 V y se adecuó a ventanas mas apropiadas para cada analito según su voltamperograma resultante. El sistema fue operado a una amplitud de pulso de 70 mV y velocidad de barrido de 5 mV/s.

Antes de adicionar la muestra, se agregaron los estándares, a fin de analizarlos con el mismo método y de éste modo evitar interferencias con las muestras y aumentar así la

exactitud en los resultados (Blasco *et al.*, 2004). El esquema del equipo electroquímico se ilustra en la Figura 15.

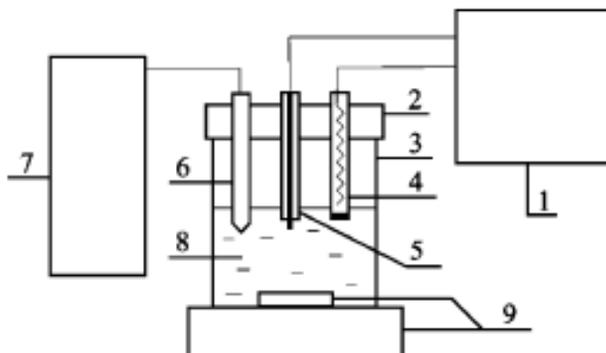


Figura 15. Esquema del equipo electroquímico. 1, analizador voltamétrico; 2, contenedor de tapa; 3, celda electroquímica; 4, electrodo de referencia; 5, electrodo de trabajo; 6, tubo de gas; 7, contenedor del gas (nitrógeno); 8, electrolito soporte y analito de estudio; 9, agitador magnético.

#### 5.1.2.3. Voltamperometría cíclica.

La voltamperometría cíclica fue empleada para conocer de forma rápida el comportamiento redox de los estándares floridzina, galangina, apigenina, luteolina, quercetina, naringenina, rutina, timol y carvacrol y de las especies electroactivas presentes en el concentrado de aguas madres y aceite esencial de orégano. La ventana de potencial fue de 0 a 1.2 V y las velocidades de barrido fueron 20, 50, 80 y 100 mV/s. Faltan los datos del experimento, ventana de potencial, velocidades de barrido.

#### 5.1.2.4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

El análisis de los aceites volátiles por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se realizó utilizando una columna SupelcoWax 10, 30 m x 0.20 mm i.d. espesor de película 0.2  $\mu\text{m}$ . Los componentes se identificarán por traslape de su espectro de masa a 70 eV con estándares ya existentes en la bibliografía. El equipo se operó en una rampa de 55 °C durante 5 min, luego se incrementó la temperatura en 4 °C/min hasta

llegar a 160 °C para posteriormente usar una segunda rampa que va de 15 °C hasta llegar a 260 °C con una proporción de Split de 100:1 y un volumen de inyección de 200 nL.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad antioxidante de los flavonoides depende del número y posición de los grupos hidroxilos que contienen y del pH del medio en que se encuentren. De este modo, una mayor capacidad antioxidante será manifestada en aquellos flavonoides con un mayor número de grupos OH (Oliveira *et al.*, 2003, Dugas, 1999).

Existen tres grupos importantes en la estructura de los flavonoides que les conceden actividad para actuar contra las especies reactivas de oxígeno (EROS): a) la estructura *o*-dihidroxi (o grupo catecol) en el anillo B el cual es oxidado a potenciales muy bajos (Dugas *et al.*, 2000, Oliveira *et al.*, 2003.), b) el doble enlace C2-C3 en conjunto con la función 4-oxo en el anillo C y c) la presencia de un 3,5 OH en los anillos C y A (Dugas *et al.*, 2000), tal como se ejemplifica en el Figura 16.

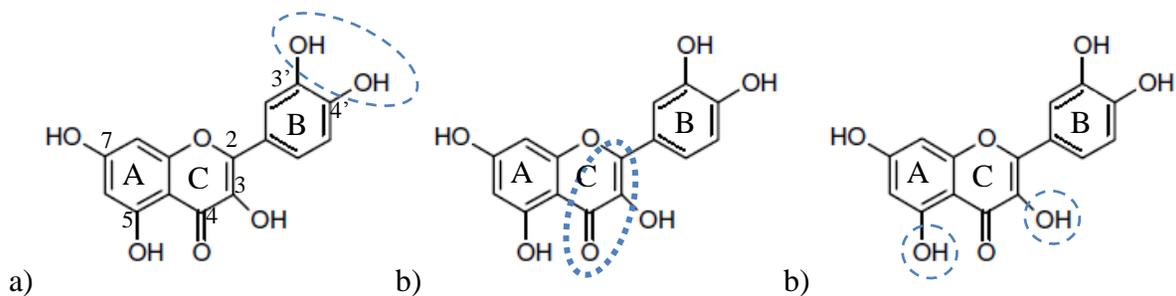


Figura 16. Grupos importantes para una efectiva actividad en los flavonoides contra las EROS a) grupo catecol, b) grupo 4-oxo en anillo C y doble enlace C2-C3 c) 3,5 OH en anillo C y A.

El grupo catecol en el anillo B se oxida a potenciales positivos muy bajos, es decir tiene una gran facilidad para ceder sus electrones. El grupo resorcinol ubicado en el anillo A se oxida a potenciales más elevados, esto se debe a que el grupo catecol es el sitio más ácido por lo que dicho grupo se encontrará deprotonado, estado que generalmente mejora la actividad antioxidante, por su parte, el grupo 7OH, (Figura 16a) es el grupo menos ácido y por lo tanto con menos facilidad para ceder electrones. Por otro lado,

estudios mediante voltamperometría diferencial de pulso del catecol y resorcinol, realizados por Janeiro y colaboradores en el 2004, revelan que a pH 7, el catecol se oxida a potenciales positivos bajos, alrededor de 0.2 V y el resorcinol a potenciales cercanos a 600 mV, por lo que la señal de oxidación alrededor a 600 mV a pH 7 en los flavonoides, corresponde a la oxidación del 5,7 dihidroxi ubicado en el anillo A, ver Figura 17. Los electrodos que en dicho estudio utilizaron fueron un minielectrodo de carbón vítreo, Ag/AgCl como electrodo de referencia y uno de platino como contraelectrodo. (Oliveira *et al.*, 2003, Janeiro *et al.*, 2004, Zare *et al.*, 2005, Jurasekova *et al.*, 2009). En la Figura 18 se presenta un esquema de la oxidación del grupo catecol (Janeiro *et al.*, 2004).

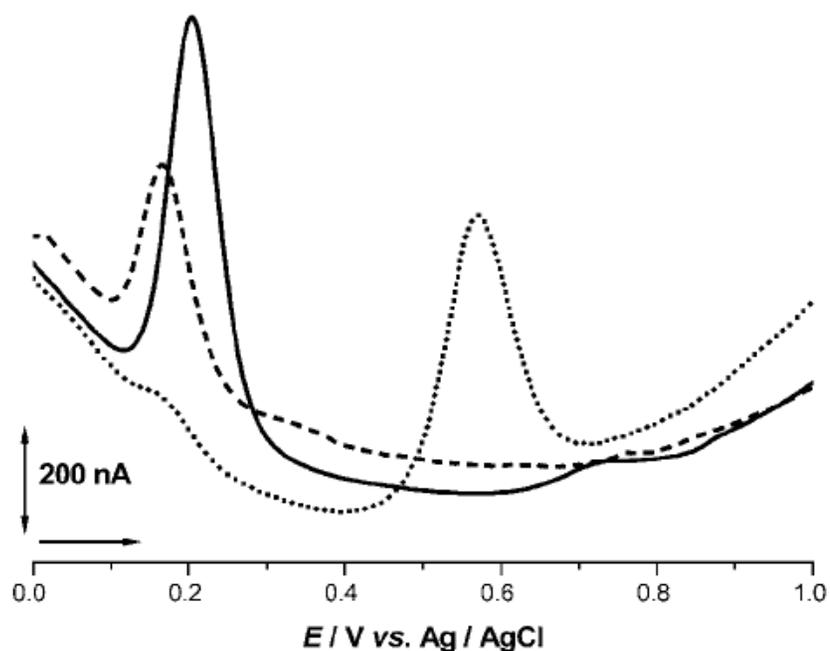


Figura 17. Voltamperograma diferencial de pulso en solución amortiguadora de fosfato pH 7 y 10 mM de (- - -) catecol, (· · ·) resorcinol y (—) Taxifolin. Velocidad de barrido 5 mV/s (Janeiro *et al.*, 2004)

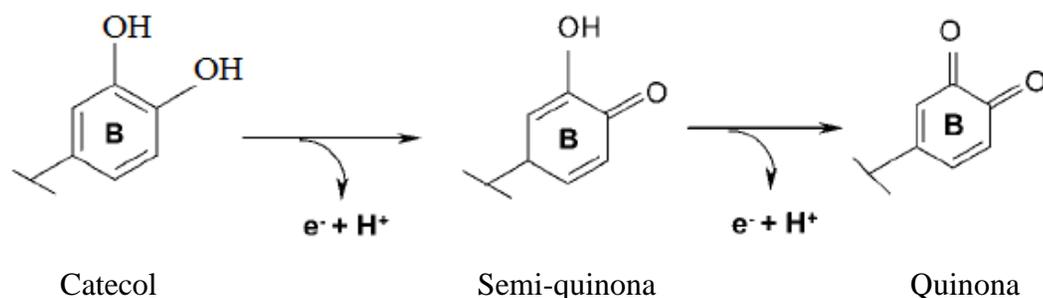


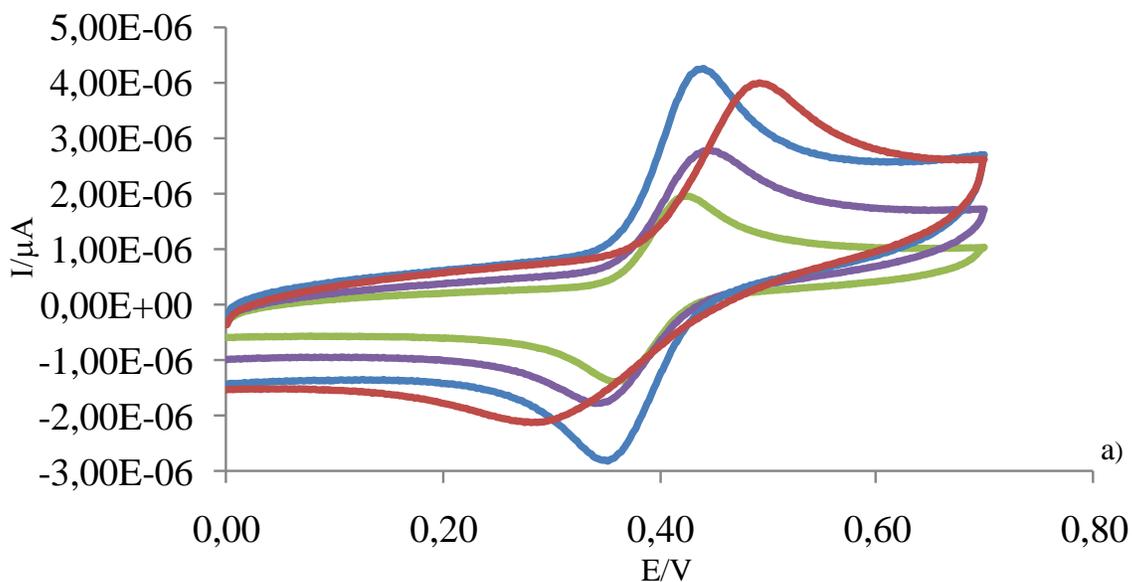
Figura 18. Mecanismo de oxidación del grupo catecol (Janeiro *et. al.*, 2004).

### 6.1 Voltamperometría cíclica

Todos los voltamperogramas son el resultado del análisis de los flavonoides de estudio en una solución amortiguadora de fosfatos, Briton Robinson, en una concentración de 100  $\mu\text{M}$  a diferentes valores de pH (2, 5, 7.5 y 10) en una ventana de potencial inicial de 0-1200 mV, posteriormente ésta fue adecuada. Las velocidades de barrido empleadas fueron de 20, 50, 80 y 100 mV/s. En la Figura 19 se muestran los voltamperogramas cíclicos traslapados a las diferentes velocidades de barrido de floridzina a pH 2 (a) y 5 (b), y en la Figura 20 a pH 7.5 (a) y 10 (b). A pH 5 y 50 mV se observan los potenciales del pico anódico (Epa) y catódico (Epc) a 275 mV y 219 mV, respectivamente. También se observa que a pH 5 la dependencia del potencial de oxidación y reducción es prácticamente independiente de la velocidad de barrido pues no hay un desplazamiento significativo lo cual sugiere una cinética de transferencia de carga rápida bajo las condiciones de estudio ya mencionadas.

La variación resultante en los potenciales con respecto al cambio de pH, se muestra en la Figura 21 donde se puede observar que conforme se incrementa el pH el potencial de oxidación es notablemente desplazado hacia potenciales más bajos lo cual se traduce en una mayor capacidad antioxidante.

## Floridzina pH 2



## Floridzina pH 5

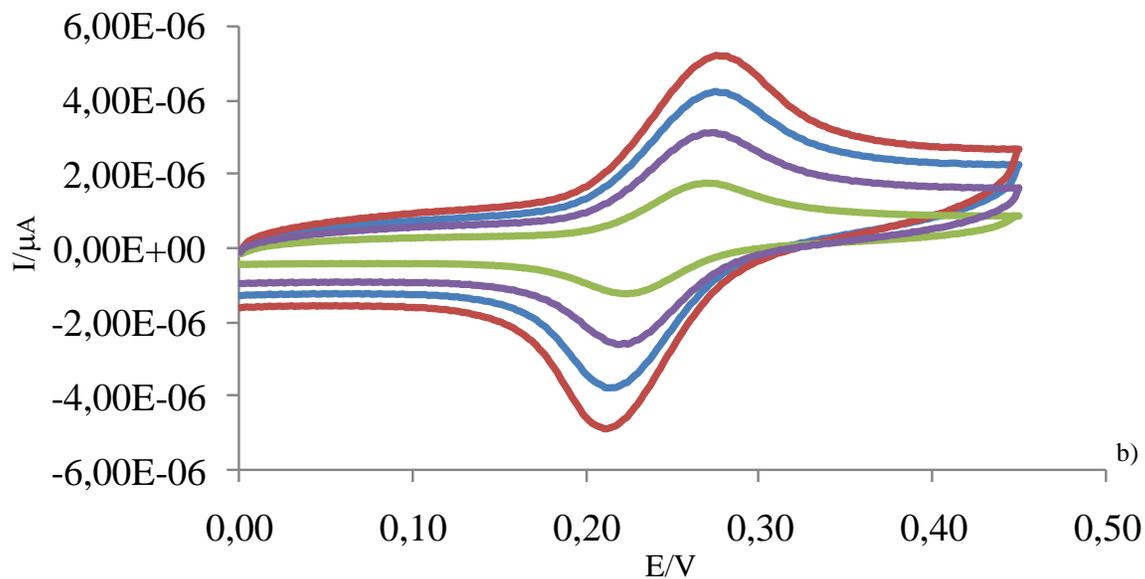
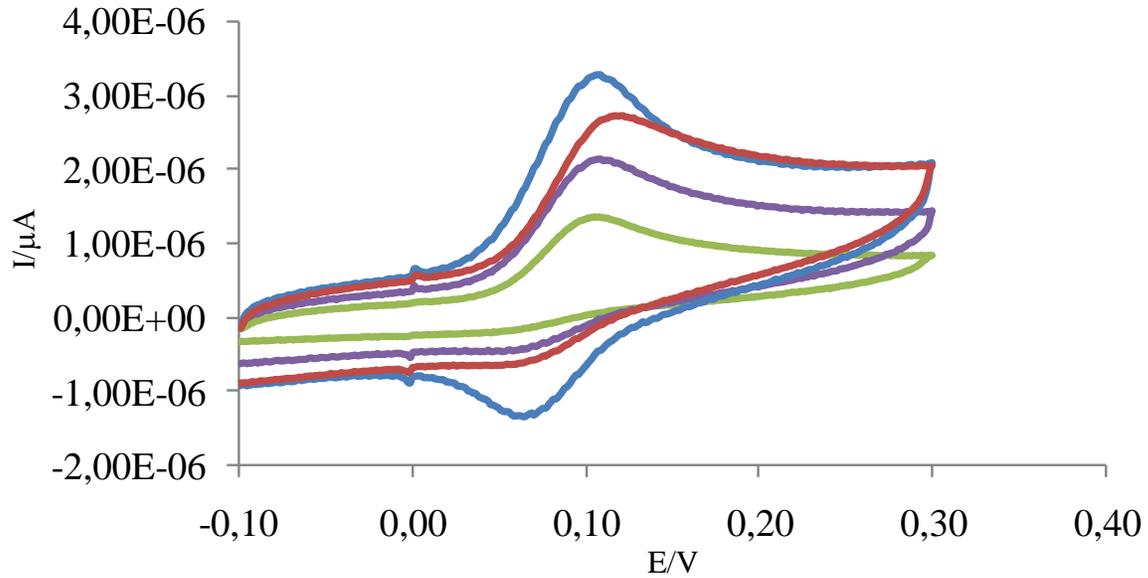


Figura 19. voltamperogramas cíclicos de floridzina a diferentes velocidades de barrido (—20, —50, —80 y —100 mV/s) a) pH 2, b) pH 5.

## Floridzina pH 7.5



## Floridzina pH 10

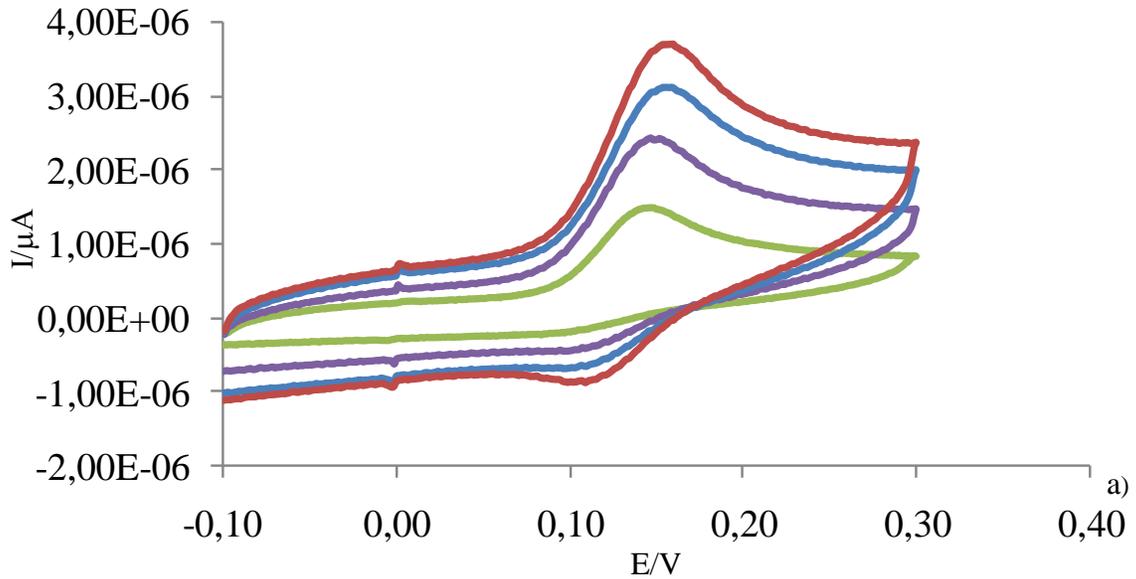


Figura 20. voltamperogramas cíclicos de floridzina a diferentes velocidades de barrido (— 20, — 50, — 80 y — 100 mV/s) a) pH7.5, b) pH 10

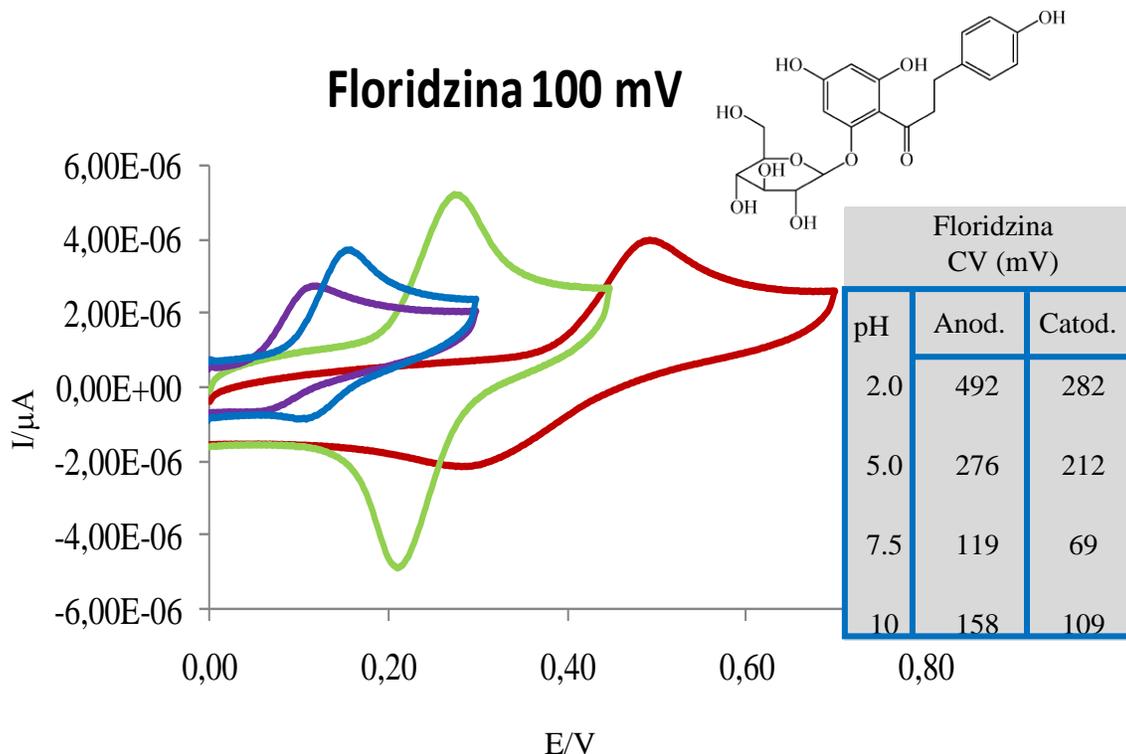


Figura 21. Variaciones del potencial de oxidación ( $E_{pa}$ ) y de reducción ( $E_{pc}$ ) en floridzina con respecto al cambio de pH. (—2, —5, —7.5, —10) a una velocidad de barrido de 100 mV/s

La diferencia entre el potencial del pico anódico y catódico ( $\Delta E_p$ ) y la relación entre corrientes son parámetros que reflejan la reversibilidad del sistema y éstos son dependientes del pH. La Figura 22, muestra un grafico representativo del comportamiento electroquímico de Floridzina, en ella se grafica el  $\Delta E_p$  y la relación de corrientes ( $i_{pa}/i_{pc}$ ) contra pH.

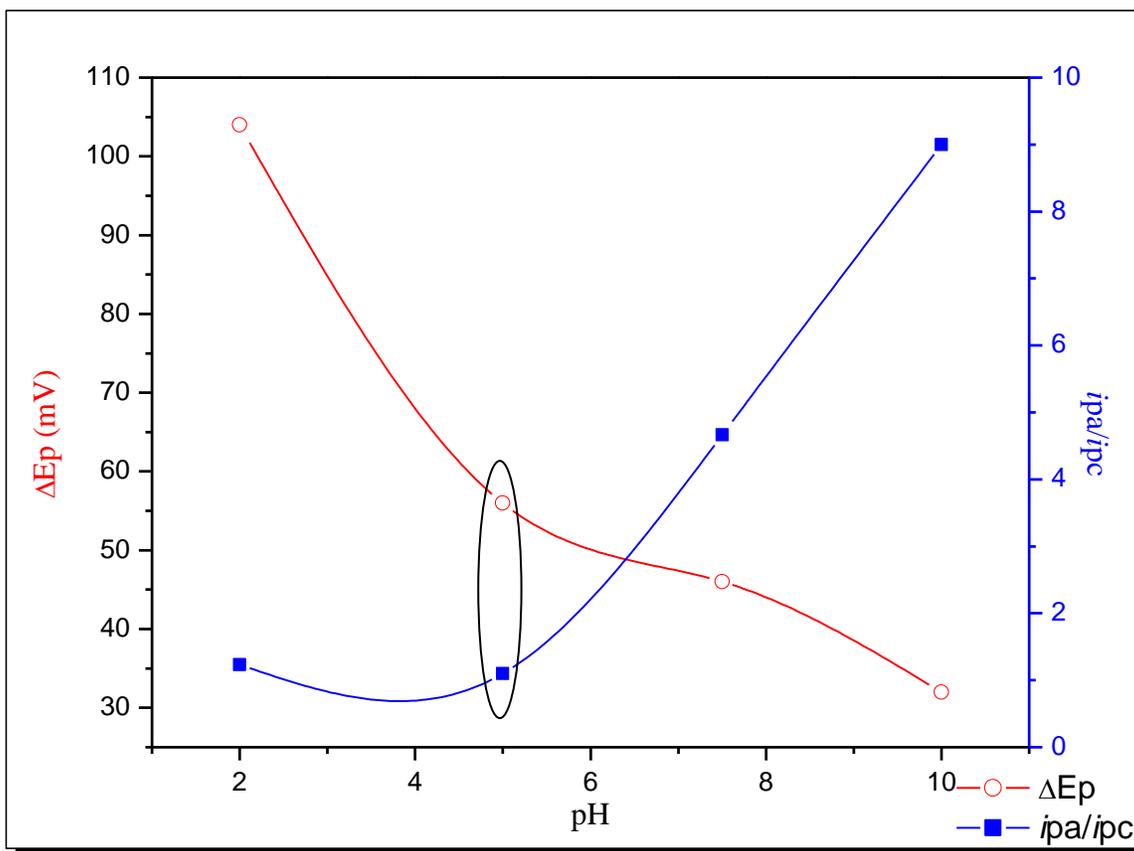


Figura 22. Gráfico representativo del sistema para floridzina (Dependencia del  $\Delta E_p$  y de la relación de corrientes con el pH).

En la Figura 22, se observa que conforme se incrementa el valor de pH el  $\Delta E_p$  disminuye y la relación de corrientes aumenta. Se sabe que para un sistema reversible el  $\Delta E_p$  se aproximará a 60 mV y que su relación de corriente será igual a 1, dicho criterio se manifiesta para floridzina a un pH de 5, con lo que se puede sugerir que floridzina presenta un proceso reversible. Por otro lado, cuando  $n$  (número electrones transferidos) = 1 los procesos reversibles se rigen por la ecuación de Randles-Sevcik (ec.1) donde  $i_p$  es la corriente de pico,  $n$  el número de electrones transferidos,  $A$  es el área del electrodo,  $D$  el coeficiente de difusión,  $C$  es la concentración y  $V$  es la velocidad de barrido y puede ser expresada como una ecuación de recta  $Y = mx+b$ .

$$\underbrace{i_p}_Y = \underbrace{(2.69 \times 10^5) n^{3/2} AD^{1/2}}_A \underbrace{Cv^{1/2}}_B \longrightarrow \text{Ec. 1}$$

$$\text{Ln } i_p = \text{LnA} + \text{LnB}$$

$$\text{Ln } i_p = \text{LnA} + 0.5 \text{LnV}$$

$$\begin{array}{cccc} \downarrow & \downarrow & \downarrow & \downarrow \\ Y = & b & + m & X \end{array}$$

Por lo que al graficar Ln  $i_{pc}$  contra Ln V, el factor de correlación  $r^2$  debe ser de 0.99, es decir deberá presentar una linealidad si se trata de un sistema reversible y éste es un criterio más para determinar la reversibilidad del sistema. Cabe recalcar que la reversibilidad en floridzina solo se presenta a pH 5, mientras que a los demás pH's la reversibilidad desaparece tal como se aprecia en la Figura 19 b. Otra información que nos permite llegar a esta conclusión es que cuando al realizar voltamperometría cíclica a diferentes velocidades de barrido, si el potencial de pico es desplazado y la corriente de pico anódico es de intensidad distinta a la de corriente de pico catódico, entonces se habla de un proceso no reversible y éste caso se observa a todos los pH's aplicados diferentes a pH 5, en estos casos el mecanismo de reacción cambia y la transferencia electrónica es acompañada de reacciones químicas. A pH 5 a pesar de incrementar la velocidad de barrido, los potenciales redox no son desplazados y las corrientes de pico anódico y catódico son similares característico de un sistema reversible (ver Figura 19b) (Brett 1994).

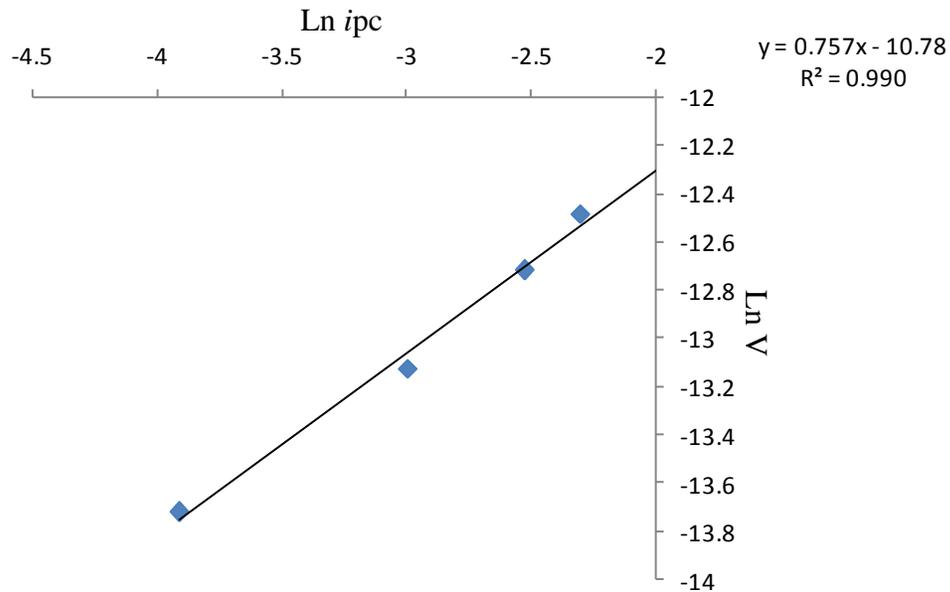


Figura 23. Determinación de la reversibilidad en flordizina a pH 5

Es importante mencionar que la reversibilidad de un sistema no necesariamente implica un mayor poder antioxidante, ya que esta propiedad solo refleja la rapidez con la cual una molécula cede su electrón, sin embargo, puede suceder que lo ceda con mucha rapidez pero que requiera de una energía mayor para hacerlo que una molécula que no es reversible pero que para ser oxidada no necesita mucha energía. Esto se puede observar en el voltamperograma de la Figura 19 (b realizado para flordizina a pH 5), el cual tiene un sistema reversible a diferencia de los demás pH's trabajados, podría entonces pensarse que es a este pH al cuál la molécula tiene una mayor capacidad antioxidante, sin embargo dicha propiedad se ve incrementada a valores de pH mayores ya que en éstos el potencial de oxidación es desplazado hacia menos positivos. Esto se debe a que el poder antioxidante no depende de la rapidez con la que el antioxidante cede sus electrones sino de la facilidad con que lo hace.

En la Figura 24 se muestran los voltamperogramas cíclicos de quercetina a diferentes pH's donde se aprecia la variación de los potenciales redox conforme se incrementa el pH.

## Quercetina 100 mV/s

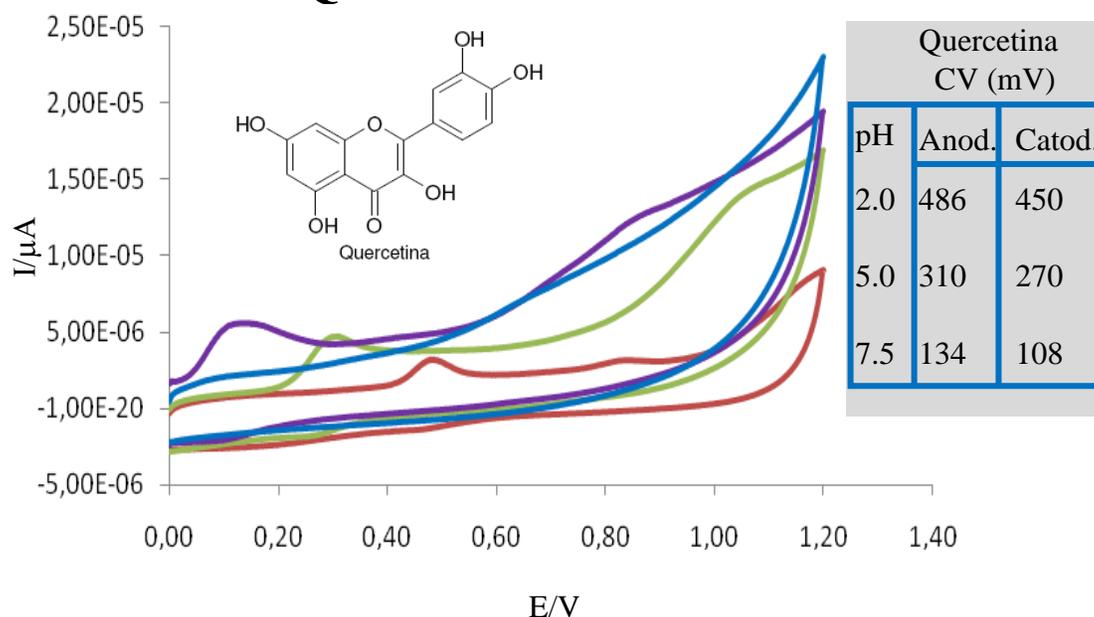


Figura 24. Traslapo de voltamperogramas cíclicos de quercetina a pH 2, 5, 7.5 y 10 a 100 mV/s como velocidad de barrido

La Figura 25, es un gráfico representativo del sistema para quercetina, donde se observa la dependencia del  $\Delta E_p$  y la relación de corrientes con el pH a 50 mV/s, de donde se puede deducir que no presenta un sistema reversible ya que a ningún valor de pH se tiene un  $\Delta E_p$  que se aproxime a 60 y tampoco una relación de corriente igual a 1. Cabe mencionar que la reversibilidad dependerá de las condiciones y parámetros en que se realice el análisis. Existen estudios donde a velocidades de barrido mayores a 200 mV/s la quercetina presenta un sistema reversible mientras que a velocidades menores una señal anódica y un pequeño pico catódico es observado (Zare *et al.*, 2005).

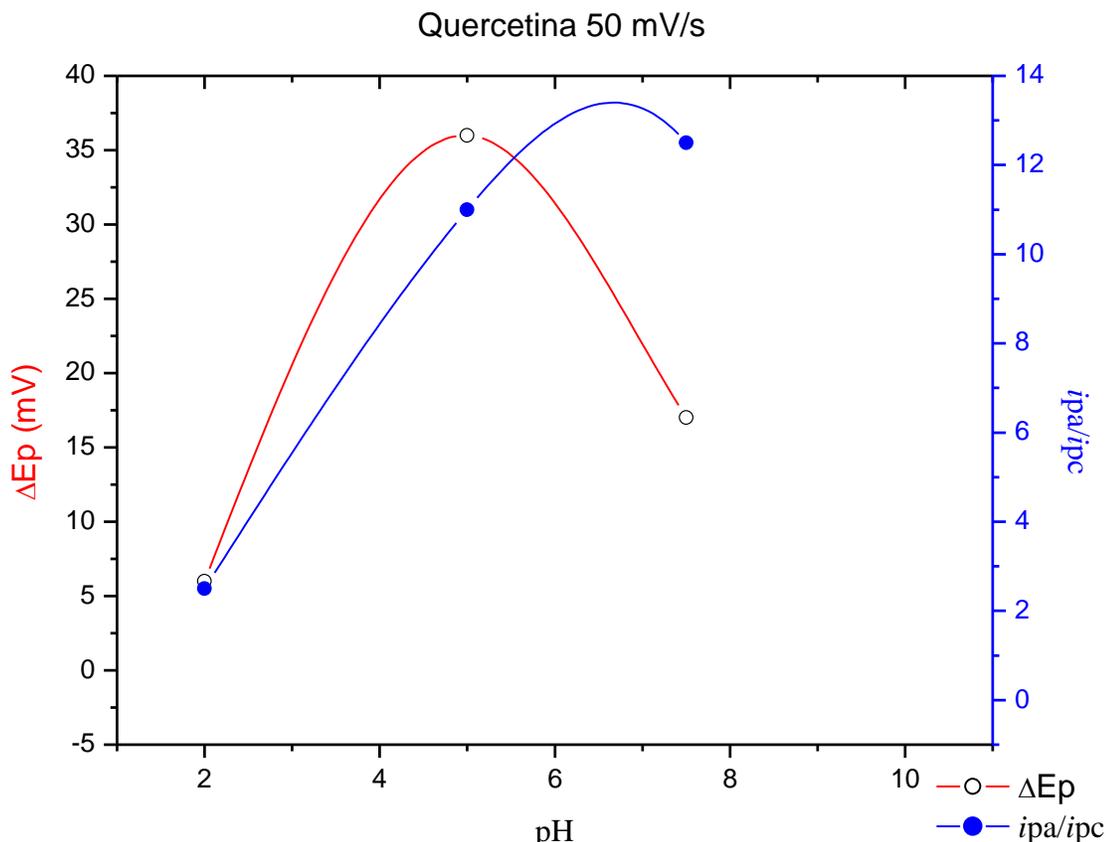


Figura 25. Grafico representativo del sistema para quercetina

La Figura 26, muestra los voltamperogramas de rutina a pH 2, 5 y 7.5, en la cual se observa la misma tendencia que para quercetina, es decir las señales de oxidación son desplazadas a potenciales menos positivos conforme el pH aumenta. En la Figura 27 se muestra un gráfico representativo de rutina donde se aprecia que rutina no presenta un sistema reversible para ningún valor de pH.

En la Figura 28 se muestran los voltamperogramas cíclicos de naringenina sobrepuestos a los diferentes pH trabajados.

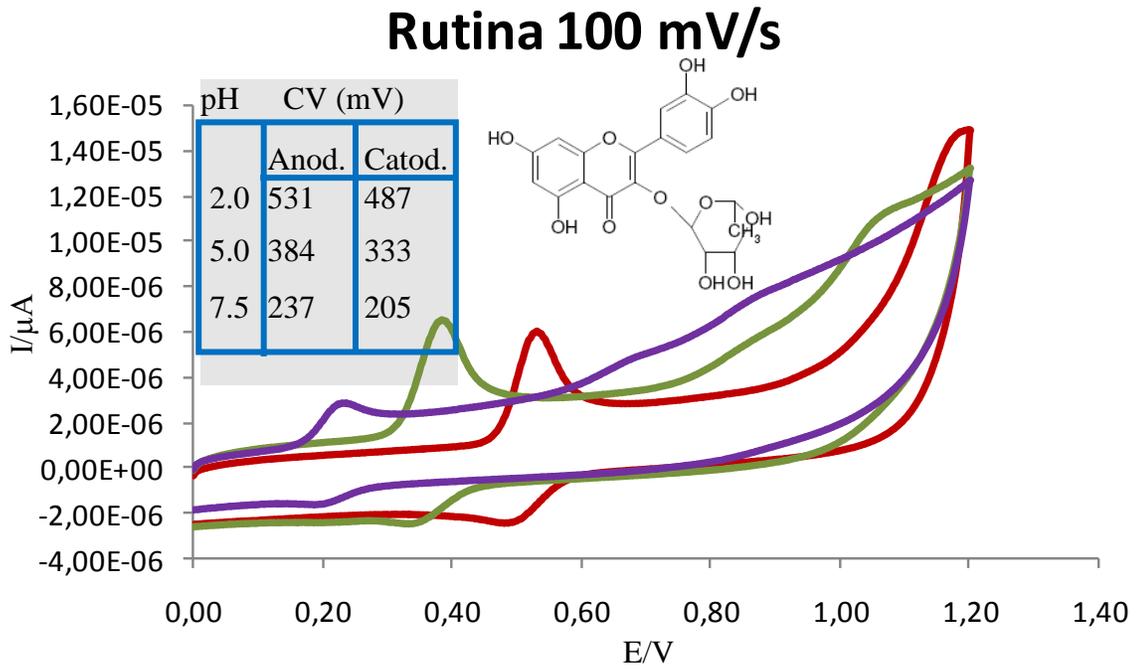


Figura 26. Voltamperogramas traslapados de rutina a 100 mV/s y pH — 2, — 5, — 7.5

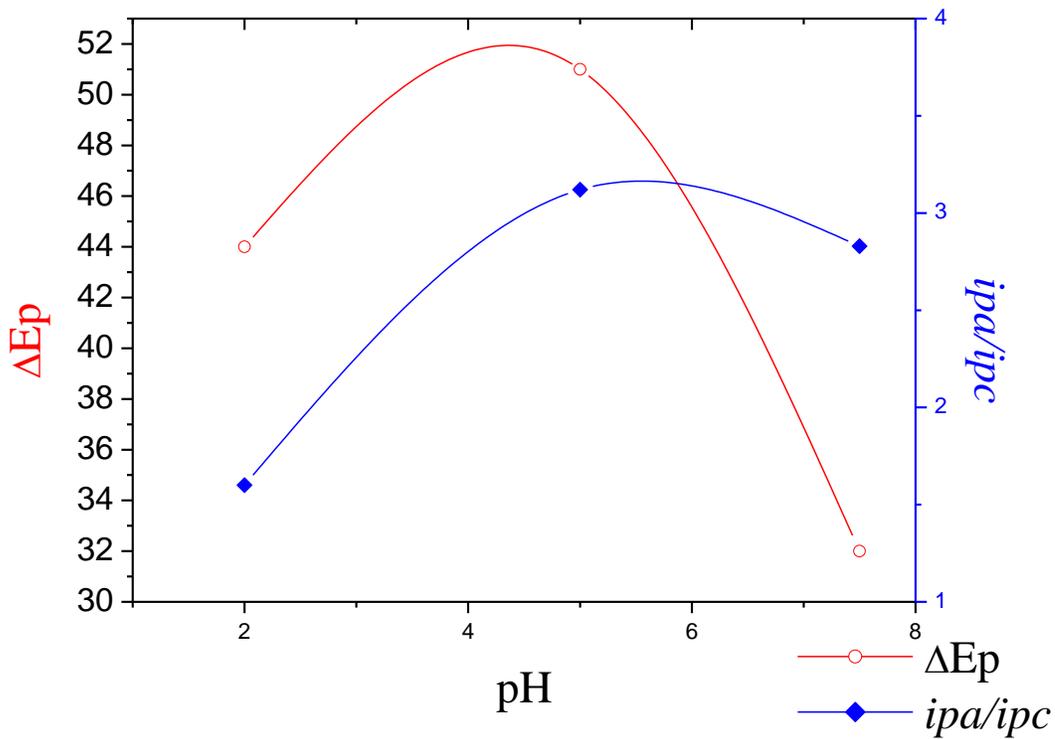


Figura 27. Grafico representativo del sistema para rutina

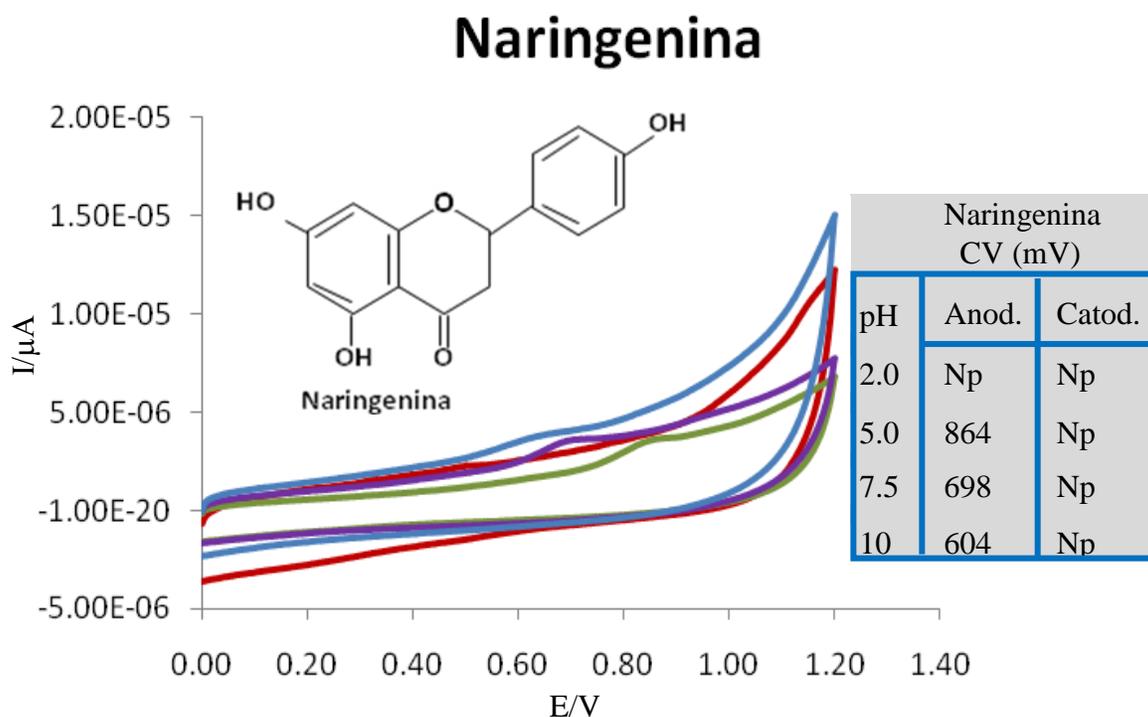


Figura 28. Voltamperograma cíclico de naringenina trasladado a los diferentes valores de pH — 2, — 5, — 7.5.

Naringenina, no presenta ni una señal de reducción, por lo que se puede concluir que tiene un sistema irreversible a todos los pH's trabajados o bien que es electroquímicamente inactiva en la ventana de potencial impuesta.

Luteolina al igual que floridzina presenta una señal anódica y otra catódica con lo que se sabe claramente que no se trata en definitiva de un sistema irreversible, debido a que puede ser cuasi-reversible o bien reversible. En la Figura 29 se presentan los voltamperogramas cíclicos de luteolina a pH 2 y 5 y en la Figura 30 a pH 7.5 y 10, trasladados a diferentes velocidades de barrido a fin de observar a que tipo de sistema pertenece. Se observa en los voltamperogramas que a pH 7.5 y 10 los potenciales no son desplazados significativamente y la corriente tanto del pico anódico como la del catódico

son muy similares, por lo que se puede deducir que se trata de sistemas reversibles para estos valores de pH, no así para el pH 2 y 5 ya que aun que la señal de oxidación y reducción no se ven desplazadas en cuanto a potencial a las diferentes velocidades de barrido, se aprecia una diferencia en cuanto a las corrientes de pico es decir la corriente de pico anódico es mayor que la del catódico lo cual es representativo de un sistema cuasireversible esto se puede observar en la Figura 31 donde se presenta un grafico representativo para el sistema de la luteolina.

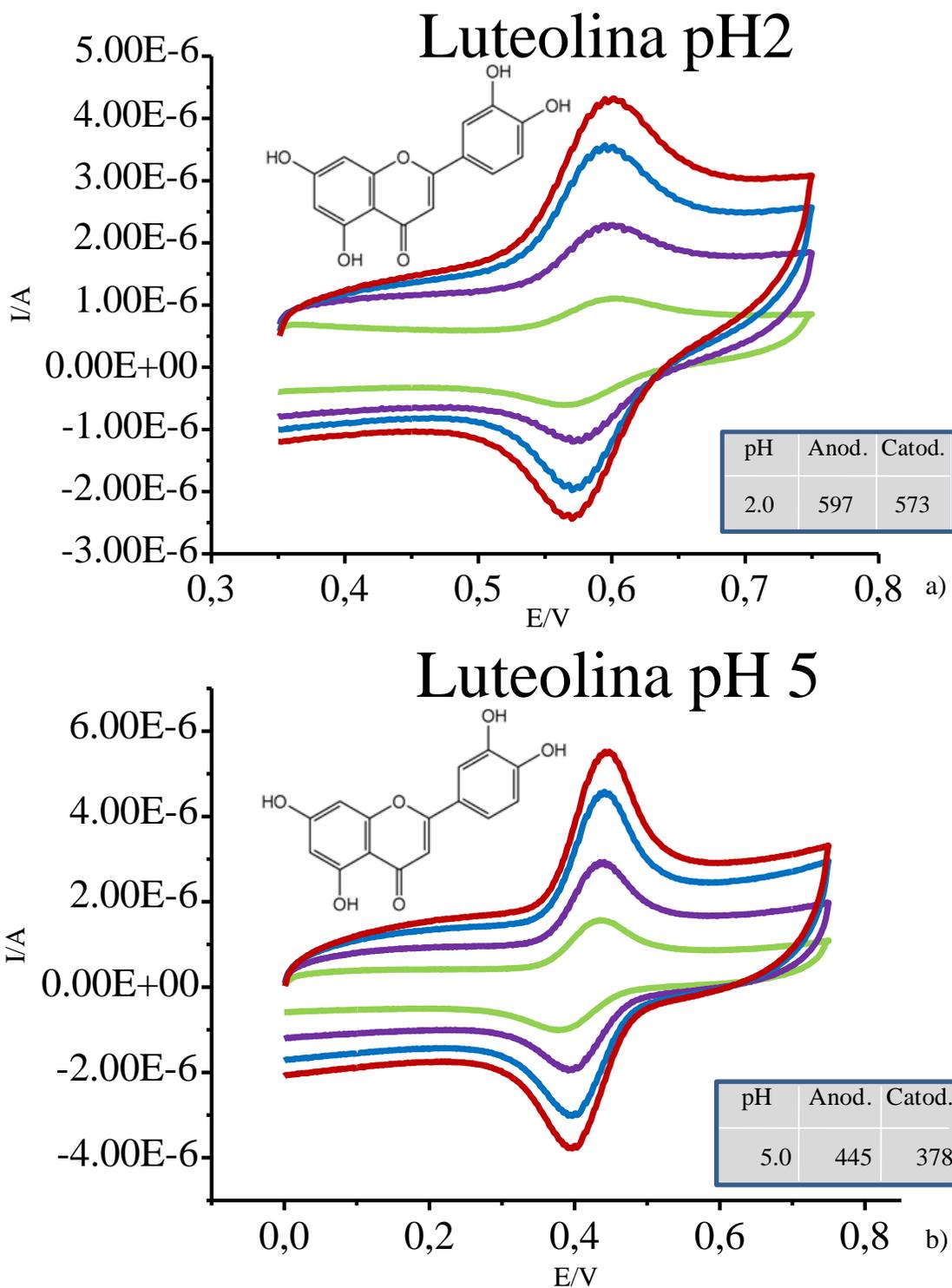


Figura 29. Voltamperogramas cíclicos para luteolina traslapados a diferentes velocidades de barrido (— 20, — 50, — 80 y — 100 mV/s) a) pH 2, b) pH 5

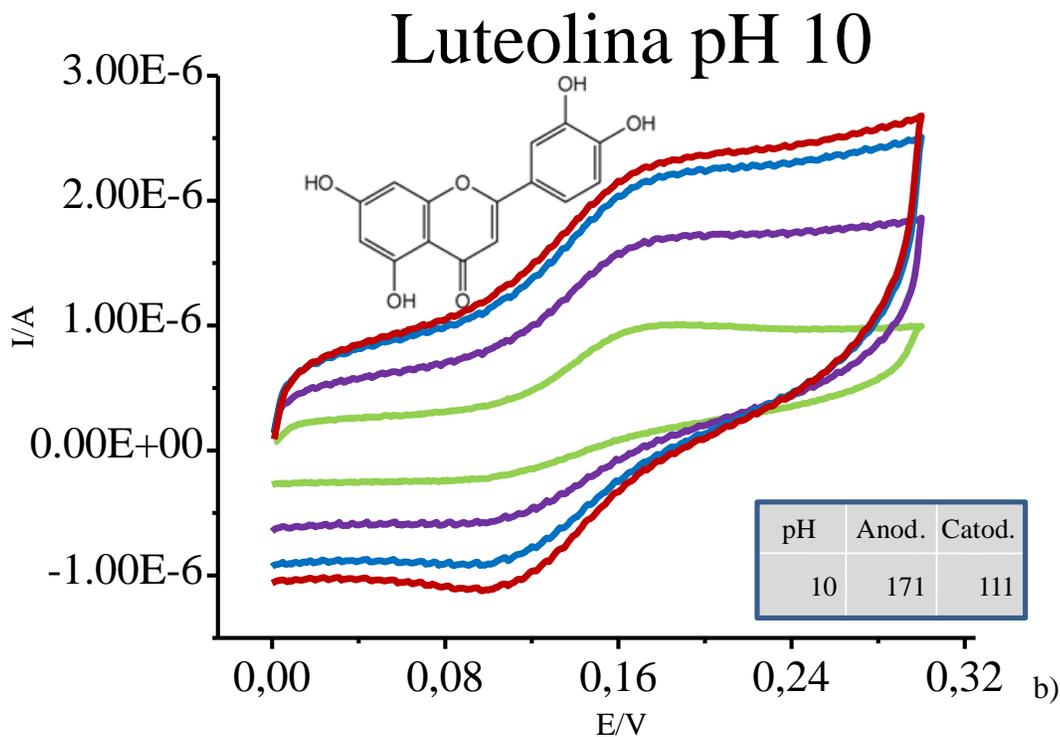
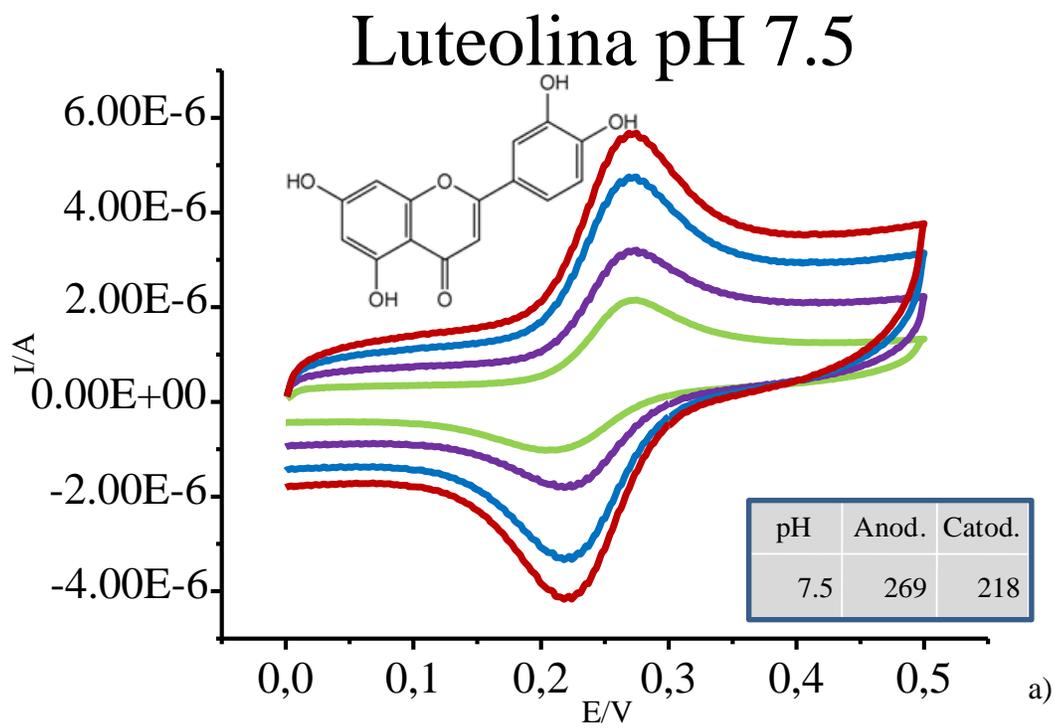


Figura 30. Voltamperogramas cíclicos para luteolina traslapados a diferentes velocidades de barrido ( — 20, — 50, — 80 y — 100 mV/s) a) pH 7.5 b) pH10

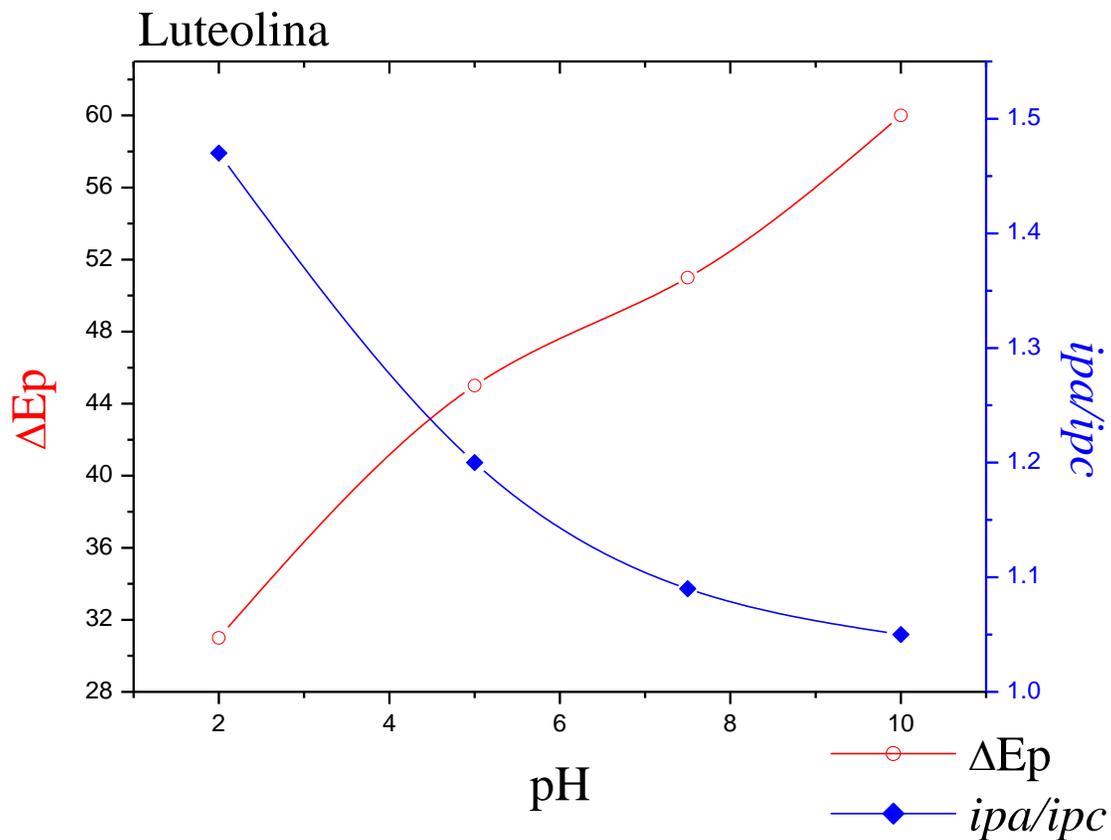


Figura 31. Grafico representativo del sistema para la luteolina

En la Figura 32, se muestran los voltamperogramas cíclicos de galangina y en la 33 los de apigenina éstos estándares presentan un sistema irreversible a todos los valores de pH estudiados.

# Galangina

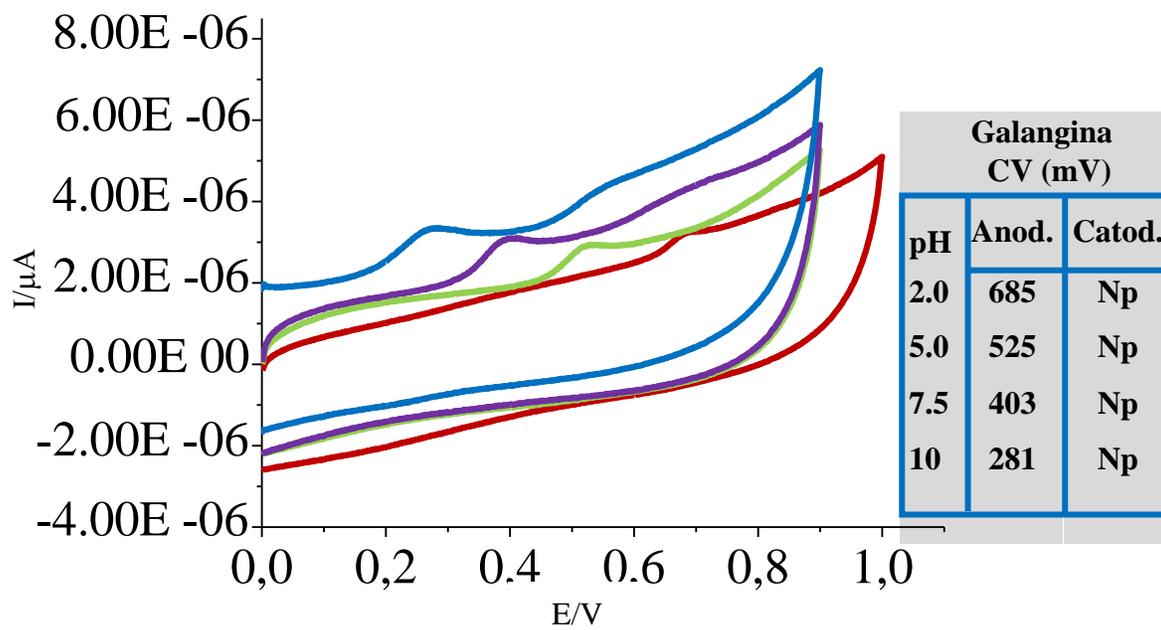


Figura 32. Voltamperogramas cíclicos de galangina a pH — 2, — 5, — 7.5 y — 10

# Apigenina

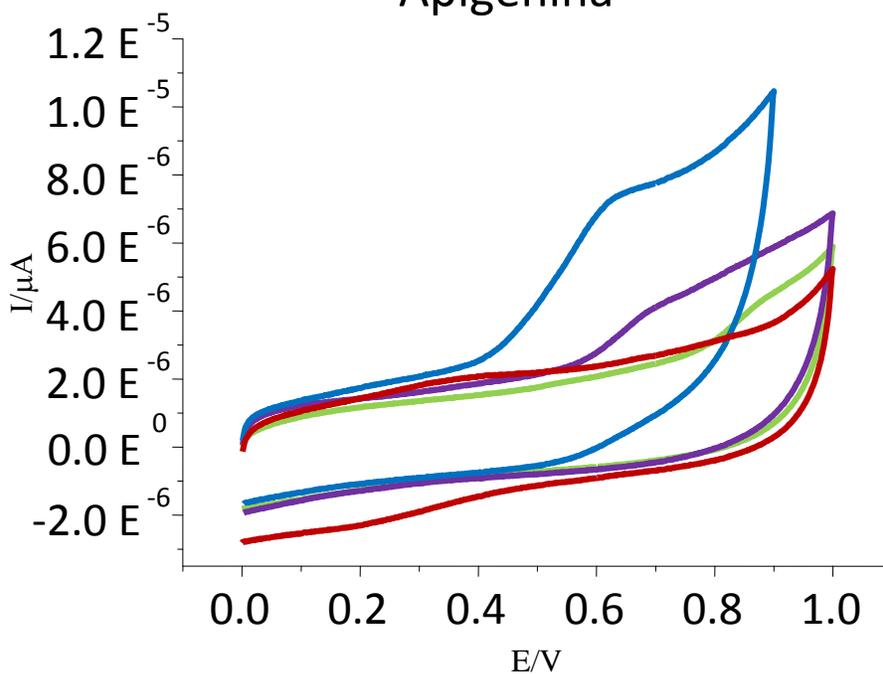


Figura 33. Voltamperograma cíclico de apigenina a pH — 2, — 5, — 7.5 y — 10

## 6.2 Voltamperometría diferencial de pulso

En las Figuras 34-40 y en el cuadro 7 se presentan los voltamperogramas diferenciales de pulso y los potenciales de oxidación de floridzina, quercetina, rutina, naringenina, luteolina, galangina y apigenina respectivamente, donde a excepción del voltamperograma de naringenina, se puede observar que conforme se incrementa el pH, los potenciales de oxidación son desplazados hacia potenciales menos positivos. Esto significa que a valores de pH básicos aumenta la capacidad antioxidante del analito. Esto se debe a que el potencial depende de la concentración de protones, cuando el pH cambia también el analito de estudio es transformado encontrándose en diferentes estados de protonación los cuales pueden ser también electroactivos pero a un potencial muy diferente. De esta manera una menor concentración de protones genera una disminución en el potencial de oxidación. En el voltamperograma diferencial de pulso de naringenina (Figura 37) se observa que a pH 2 presenta una señal de oxidación bien definida, sin embargo a pH 5, 7.5 y 10, prácticamente desaparece, esto probablemente se deba a que a estos valores de pH, la forma electroinactiva se convierte en la dominante, es decir que el analito se protone o deprotone, cuando esto sucede, el pico de oxidación se desvanece. Floridzina, quercetina y rutina (Figuras 34, 35 y 36), presentan una señal de oxidación con mayor intensidad de corriente a pH 2, lo cual indica que en este pH las formas mas electroactivas se encuentran predominando (Riley 1987).

Cuadro 7. Potenciales de pico detectados en VDP para los estándares de flavonoides que se encuentran en el orégano mexicano.

pH	Floridzina (mV)	Quercetina (mV)	Luteolina (mV)	Apigenina (mV)	Galangina (mV)	Naringenina (mV)	Rutina (mV)
2	390,1080	450	549	260, 1130	276, 628	450, 1100	512, 1163
5	240, 930	270, 980	400	894	366	300,1019	360, 1064
7.5	90, 385	90, 840	220, 900	858	358, 870	240, 660	210, 844
10	120, 320	-50, 90	98	676	214, 628	238, 510	110, 707

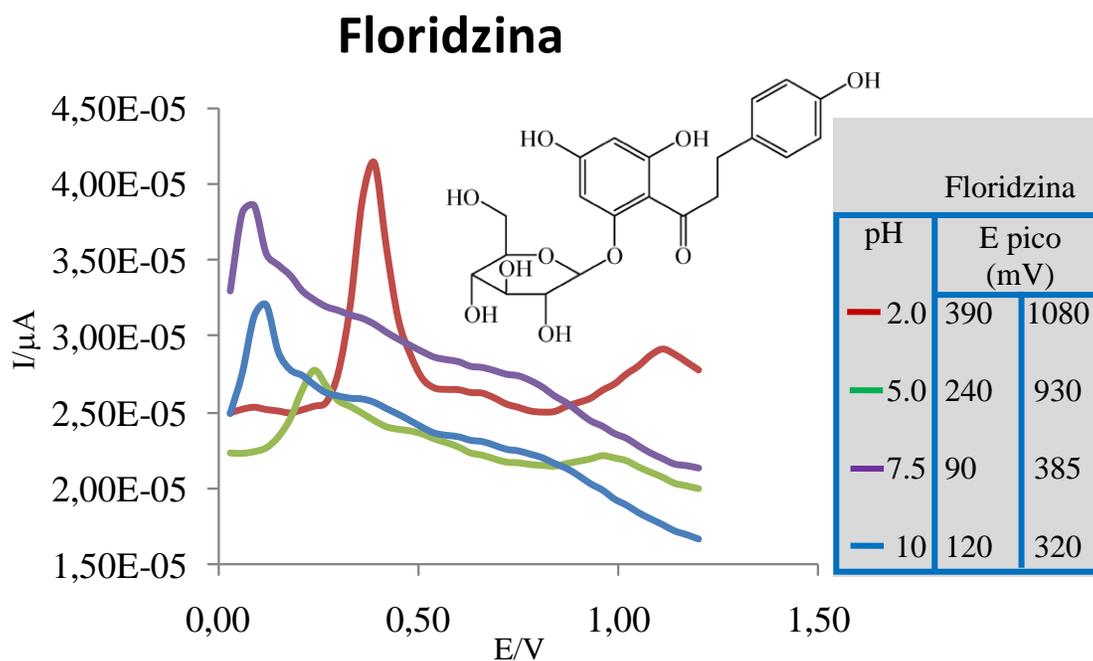


Figura 34. Voltamperograma diferencial de pulso de floridzina a pH 2, 5, 7.5 y 10.

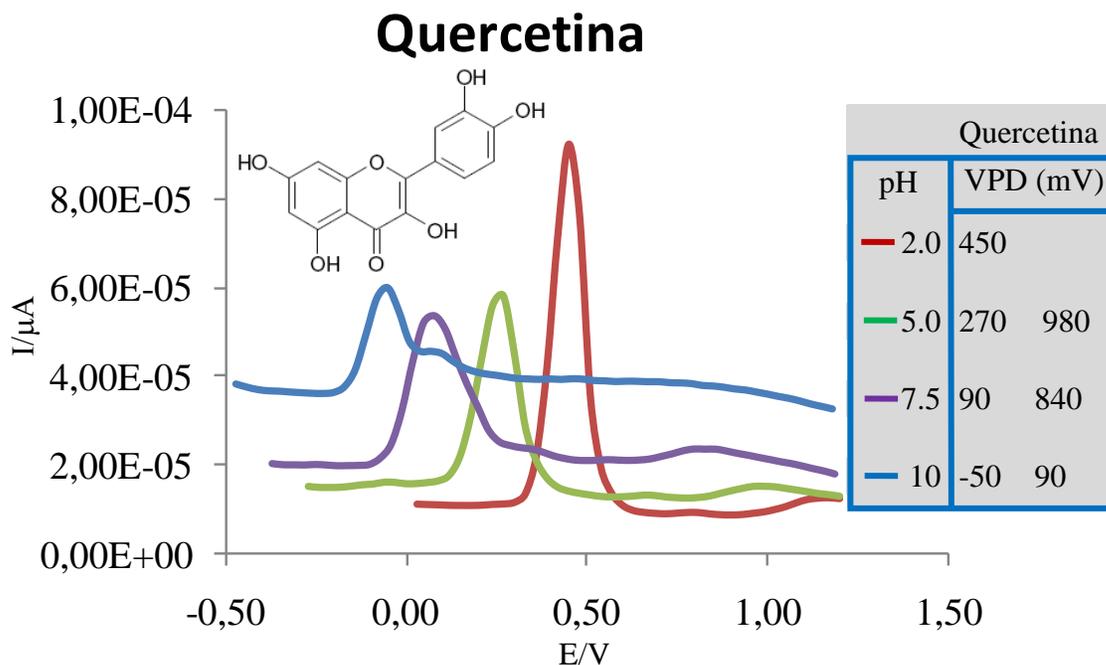


Figura 35. Voltamperograma diferencial de pulso de Quercetina a pH 2, 5, 7.5 y 10.

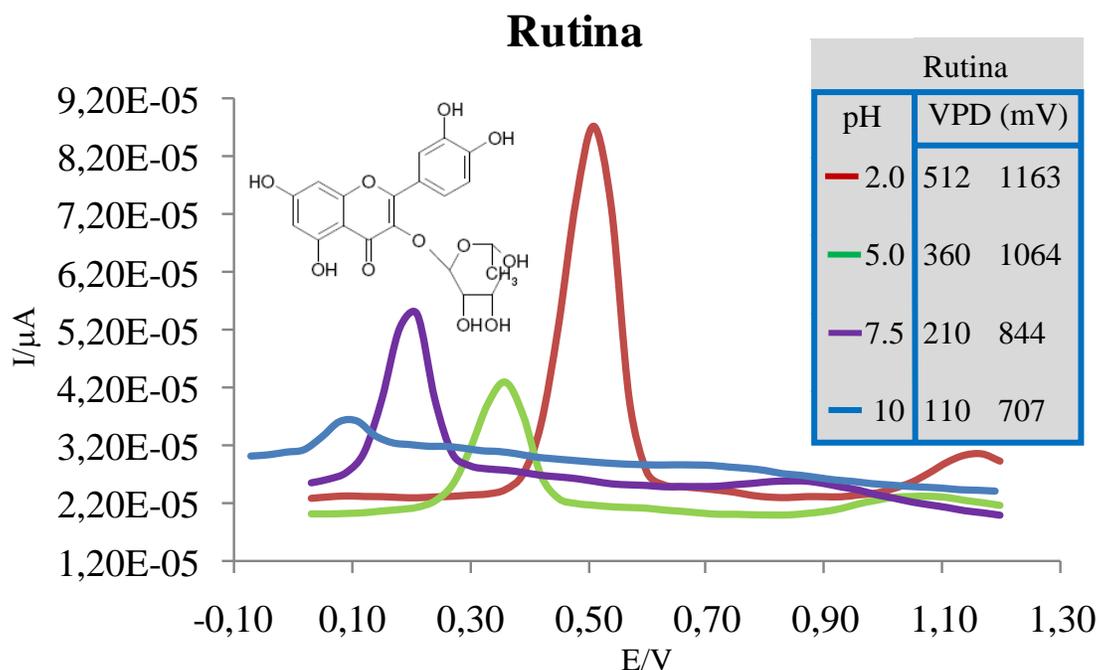


Figura 36. Voltamperograma diferencial de pulso de rutina a pH 2, 5, 7.5 y 10.

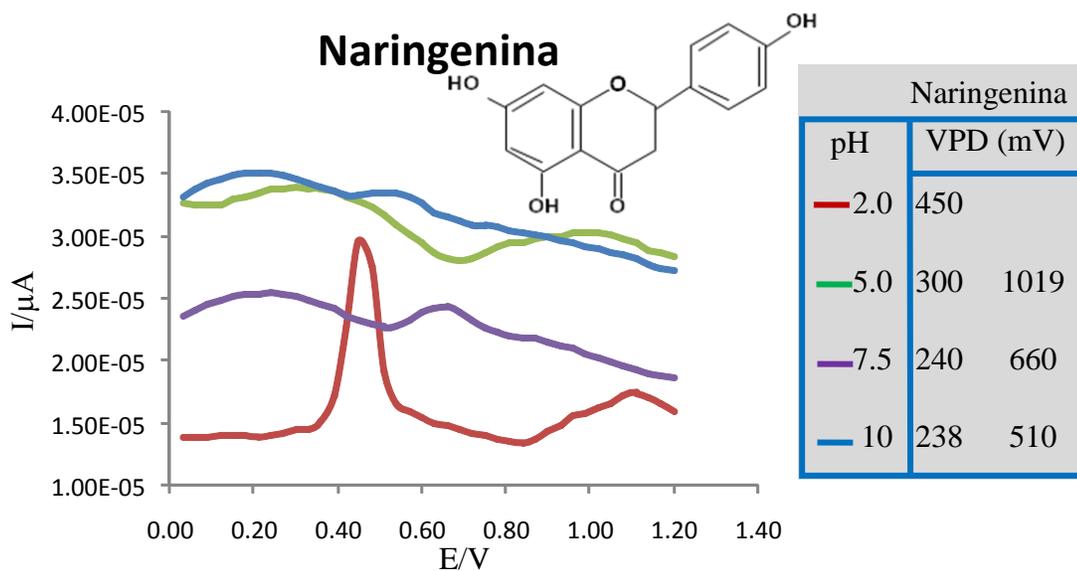


Figura 37. Voltamperograma diferencial de pulso de Naringenina a pH 2, 5, 7.5 y 10.

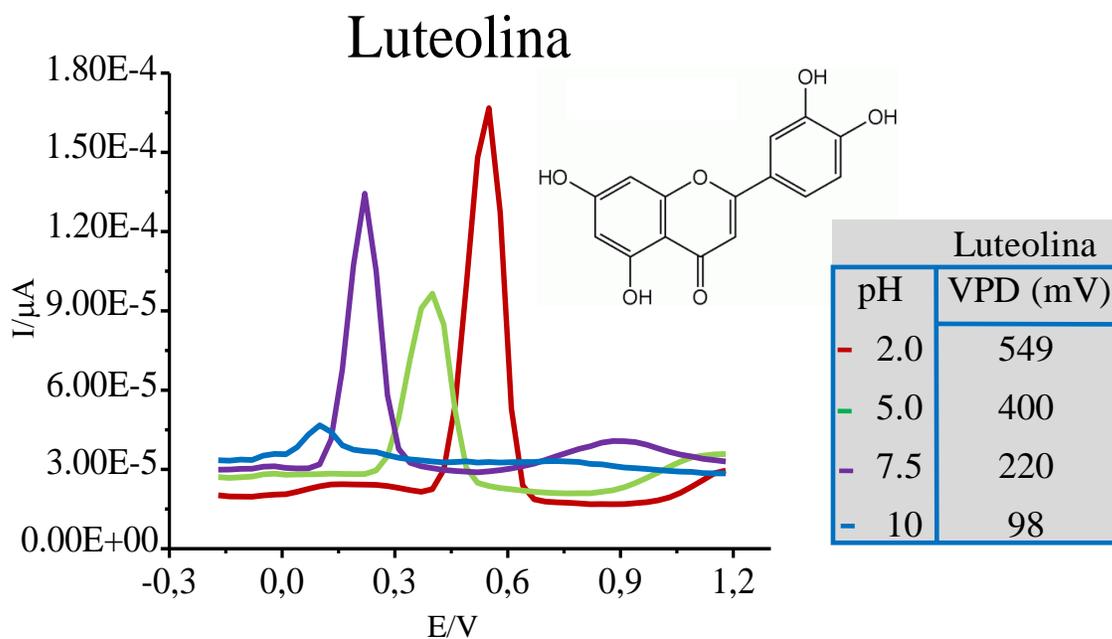


Figura 38. Voltamperograma diferencial de pulso de luteolina a pH 2, 5, 7.5 y 10.

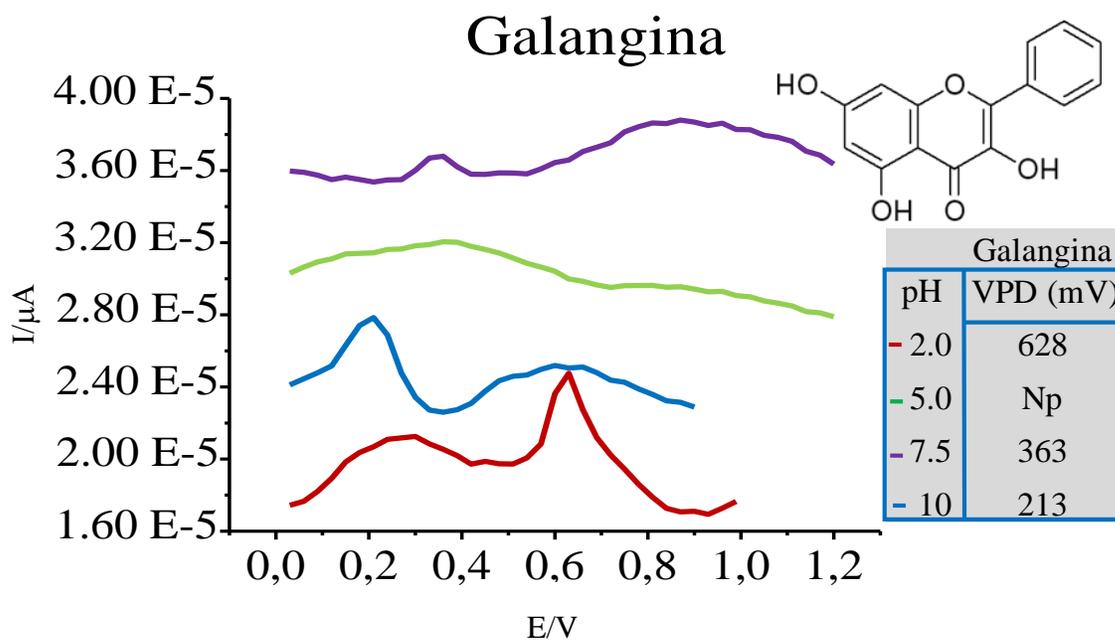


Figura 39. Voltamperograma diferencial de pulso de galangina a pH 2, 5, 7.5 y 10.

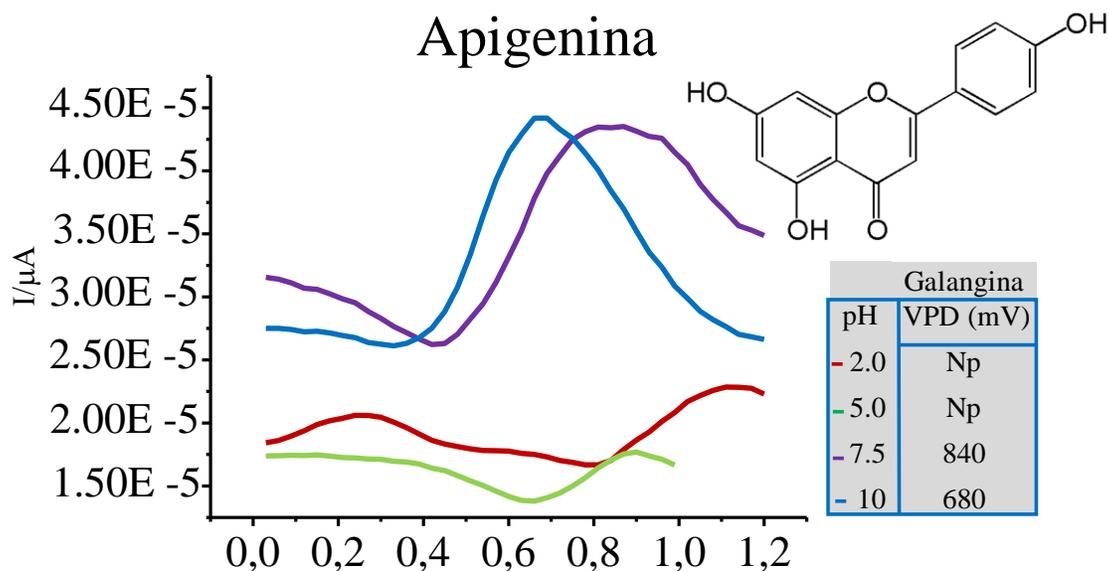


Figura 40. Voltamperograma diferencial de pulso de apigenina a pH 2, 5, 7.5 y 10.

Adicionalmente se realizó una mezcla equimolar de quercetina y rutina a fin de definir si la técnica de voltamperometría diferencial de pulso es capaz de diferenciar entre estos dos flavonoles, cuya única diferencia es un azúcar, en las Figura 41 y 42 se muestran los voltamperogramas resultantes a pH 2, 5, 7.5 y 10, en los cuales puede observarse que a pH 2 y 10 no es posible una diferenciación, sin embargo a pH 5 y 7.5 la diferenciación es clara. En la Figura 43, se muestran los voltamperogramas cíclicos a pH 5 y 7.5 donde también se ven dos señales de oxidación.

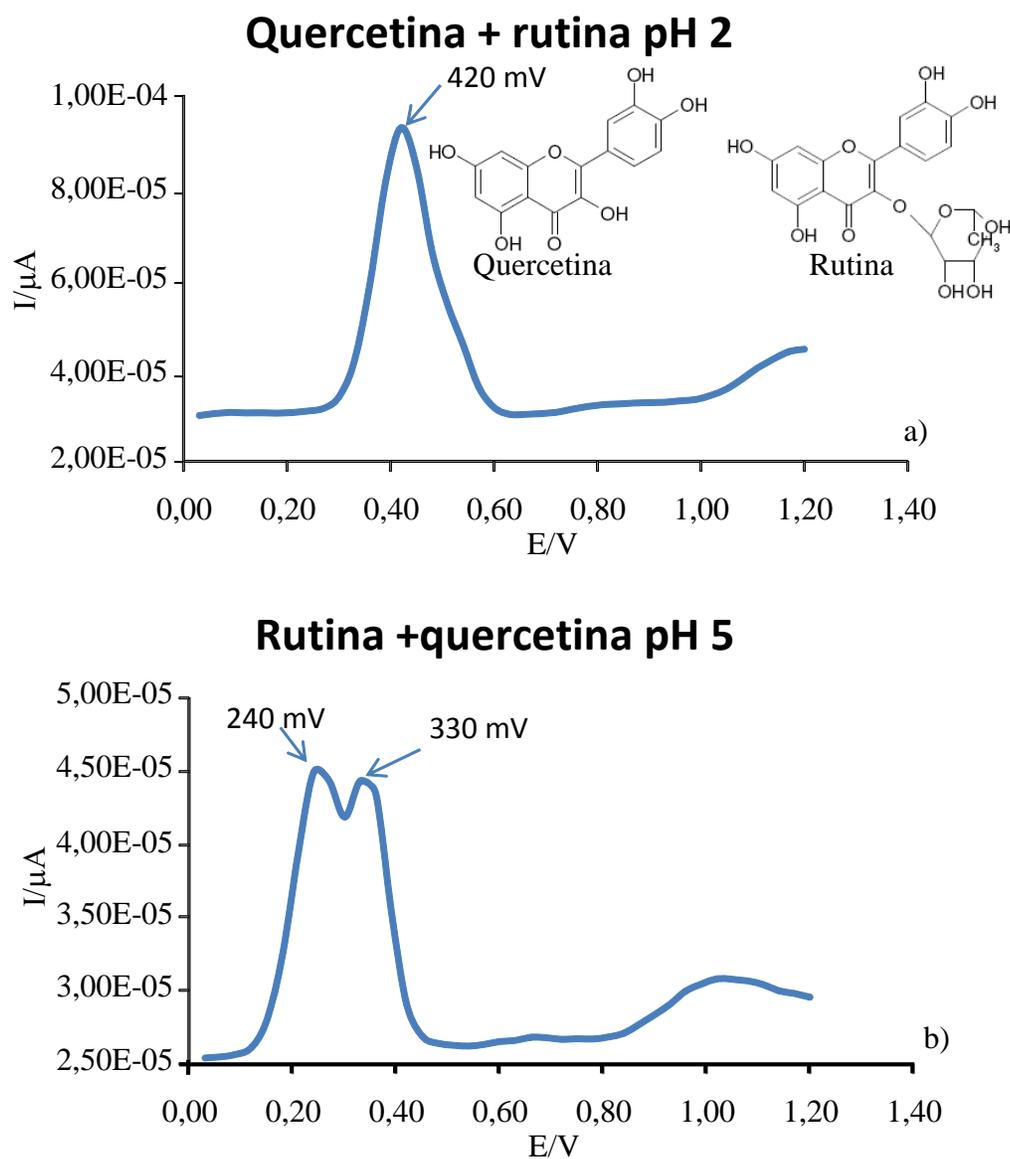


Figura 41. Voltamperogramas diferenciales de pulso de la mezcla quercetina y rutina a pH 2(a y 5(b)

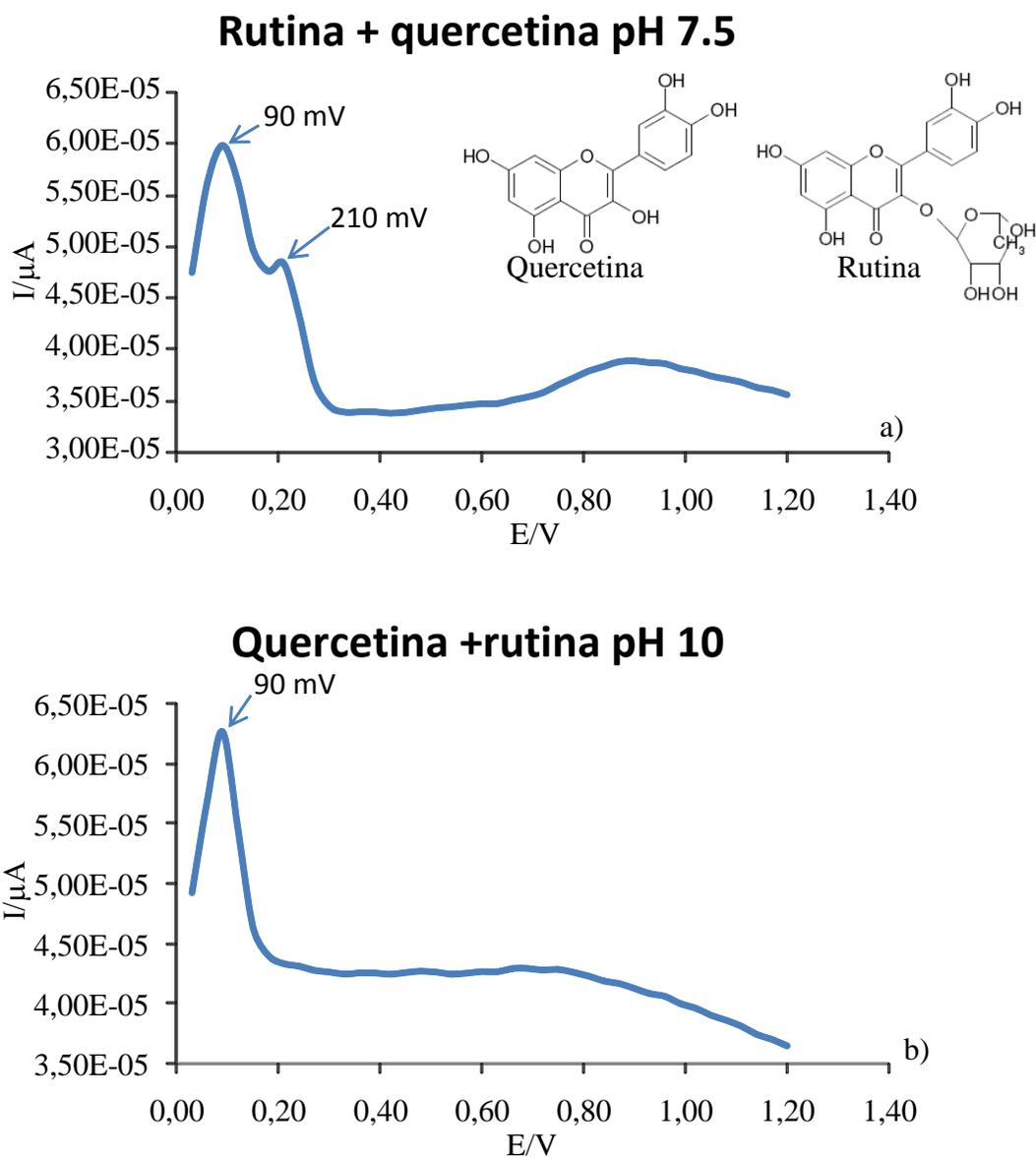


Figura 42. Voltamperogramas diferenciales de pulso de la mezcla quercetina y rutina a pH 7.5 (a) y 10 (b)

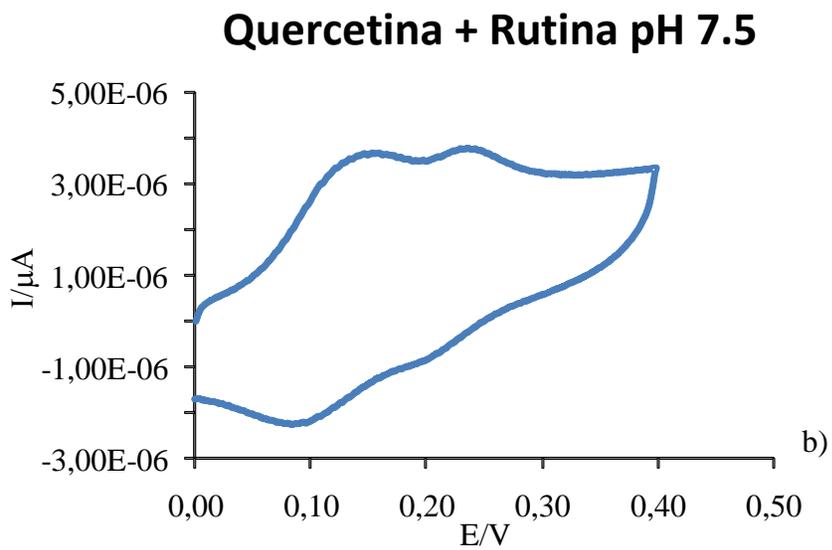
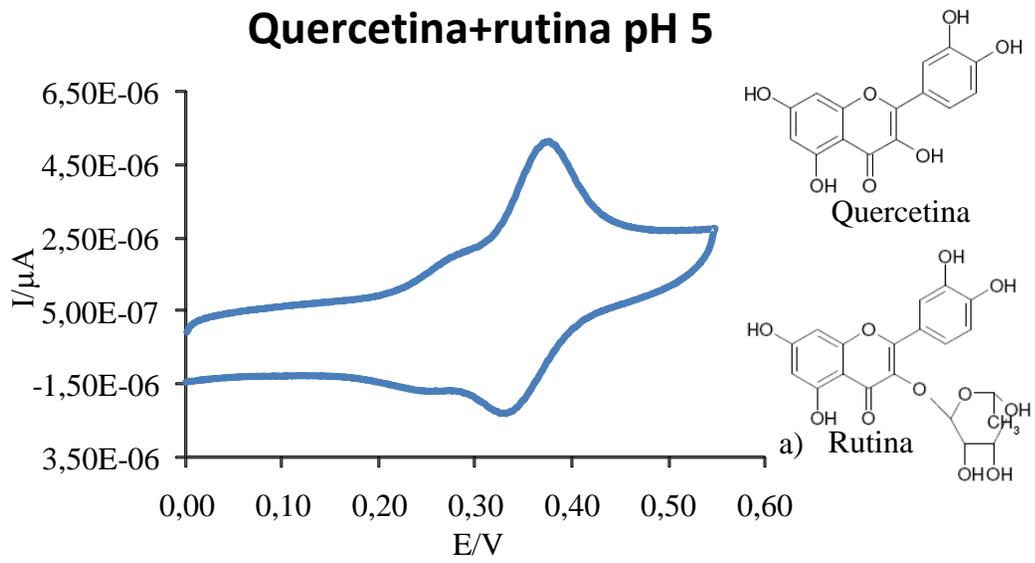


Figura 43. Voltamperogramas cíclicos de la mezcla quercetina y rutina a pH 5 (a) y 7.5 (b)

### 6.3 Correlación capacidad antioxidante-estructura

El número de electrones transferidos puede ser estudiado a través del cálculo de la pendiente resultante del gráfico potencial formal ( $E^0$ ) contra pH, de donde si la pendiente es cercana a -59 mV de acuerdo a la ecuación de Nernst para reacciones que involucran a protones, corresponderá a un proceso de transferencia del mismo número de electrones y protones (Zare *et al.*, 2005). En este trabajo se determinó el  $E^0$  mediante voltamperometría cíclica a través de la ecuación 2. Debido a que el valor del coeficiente de transferencia es con frecuencia aproximado a 0.5 (Mabbott, 1983) y a que el empleado por Zare y colaboradores en el 2005 fue de 0.65, fue éste el valor que se consideró para el análisis.

$$E^0 = E_{pa} - \alpha (E_{pa} - E_{pc}) \longrightarrow \text{Ec. 2}$$

La relación capacidad antioxidante-estructura, se analizó mediante el cálculo de la pendiente en el gráfico potencial formal ( $E^0$ ) contra pH de los estándares de estudio. En las Figuras 44-47 se observa una tendencia lineal y se obtiene una pendiente de -62.7, 51.9, 57.5 y -48.16 mV por unidad de pH al graficar el potencial formal contra pH para quercetina, rutina, luteolina y floridzina, respectivamente. Estos valores son cercanos al calculado en la ecuación de Nernst; lo cual indica que estos flavonoides presentan una oxidación mediante la transferencia de igual número de electrones y protones (Riley *et al.*, 1987). Para los estándares galangina, apigenina y naringenina, no fue posible desarrollar este método debido a que no presentan señal de reducción definida, el cual es necesario para realizar el cálculo de  $E^0$ . En las Figuras 48-50 se presenta la estructura generada de quercetina (Oliveira y Ghica, 2003; Zare *et al.*, 2005), rutina y luteolina respectivamente al ser oxidadas. Como se puede observar en la estructura química de éstos flavonoides, todos tienen un grupo catecol en el anillo B, es éste grupo dihidroxi en la molécula, el que se encarga de ceder sus electrones y protones llevándose a cabo su oxidación. Otra similitud en sus estructuras es el doble enlace entre el C2-C3 del anillo C, el cual ayuda a la oxidación del grupo catecol. Como puede observarse, los resultados obtenidos a pH 7.5 en voltamperometría diferencial de pulso para quercetina, rutina y luteolina presentan una

señal de oxidación a potenciales positivos bajos alrededor de 200 mV. Todo lo anterior nos lleva a sugerir que en estos flavonoides el proceso de transferencia es de dos electrones y dos protones, y que el sitio activo para llevar a cabo su oxidación es el grupo catecol. En la Figura 51, se sugiere la estructura de la floridzina al ser oxidada. En este caso floridzina a diferencia de los demás flavonoides estudiados presenta en el anillo B un grupo fenol en lugar de un catecol. Considerando el resultado de la pendiente en el gráfico potencial formal contra pH para floridzina se deduce que transfiere el mismo número de electrones y protones. Debido a que floridzina no presenta el grupo catecol se sugiere que su proceso de oxidación se lleva a cabo a través de la transferencia de un solo electrón y un protón y que el sitio donde se realiza es en el grupo OH del anillo C ya que éste es el más ácido y más cercano al grupo carbonilo.

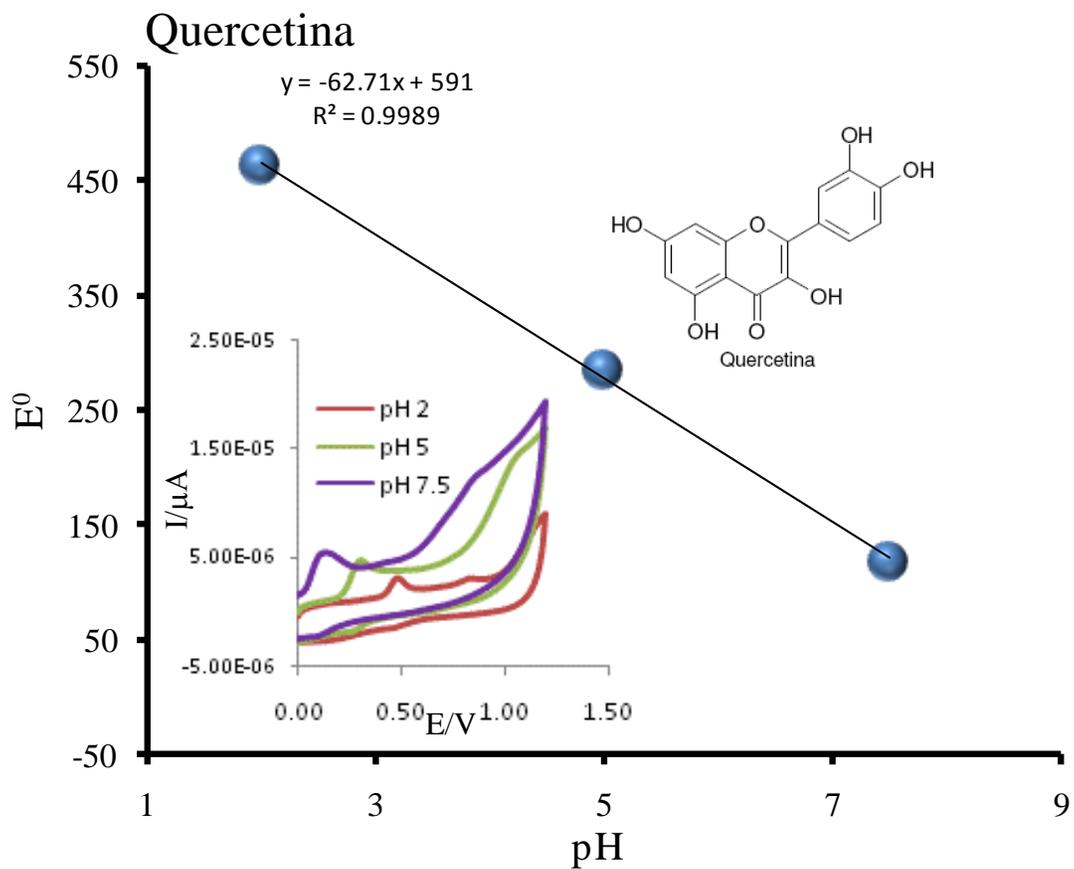


Figura 44. Grafico potencial formal ( $E^0$ ) contra pH de estudio para quercetina.

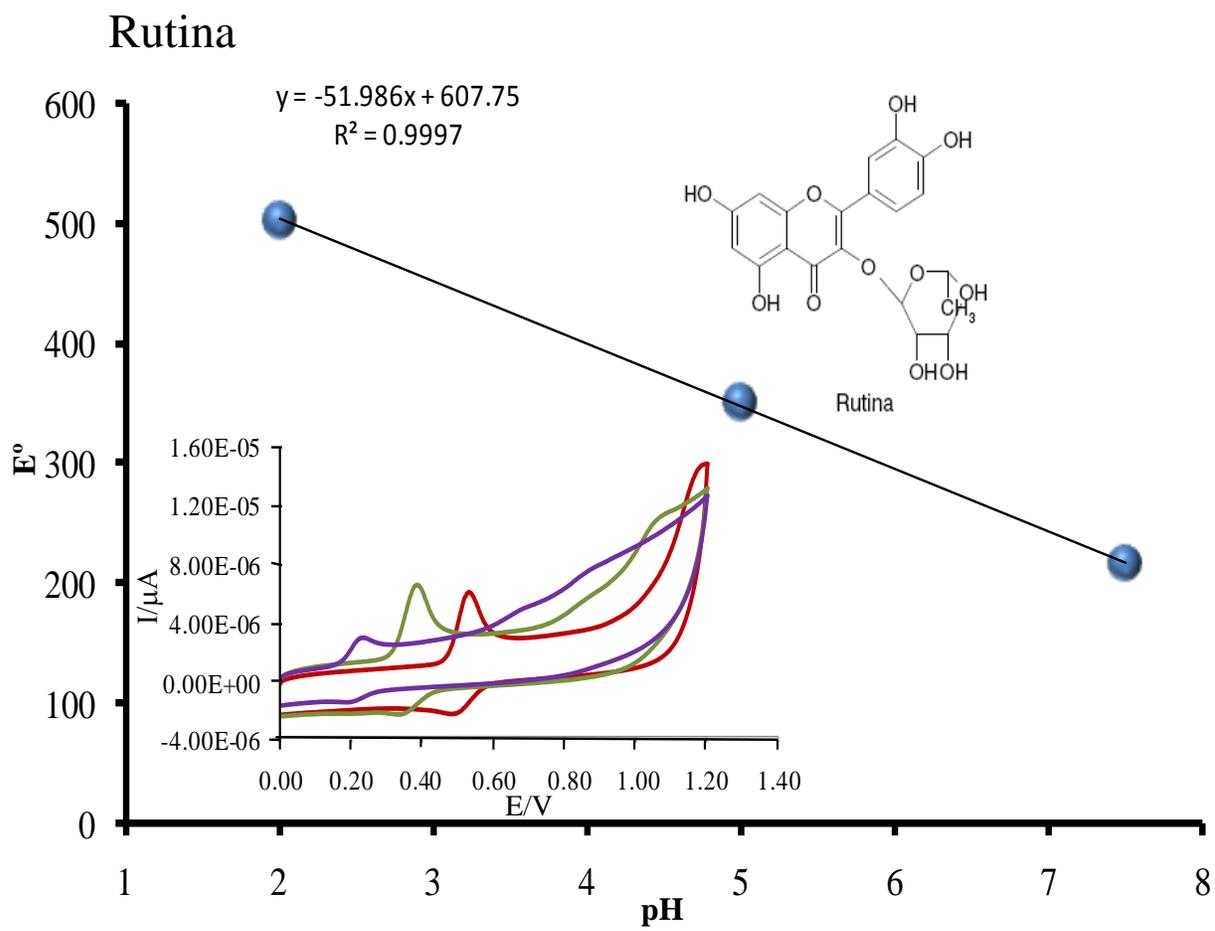


Figura 45. Grafico potencial formal ( $E^0$ ) contra pH de estudio para rutina.

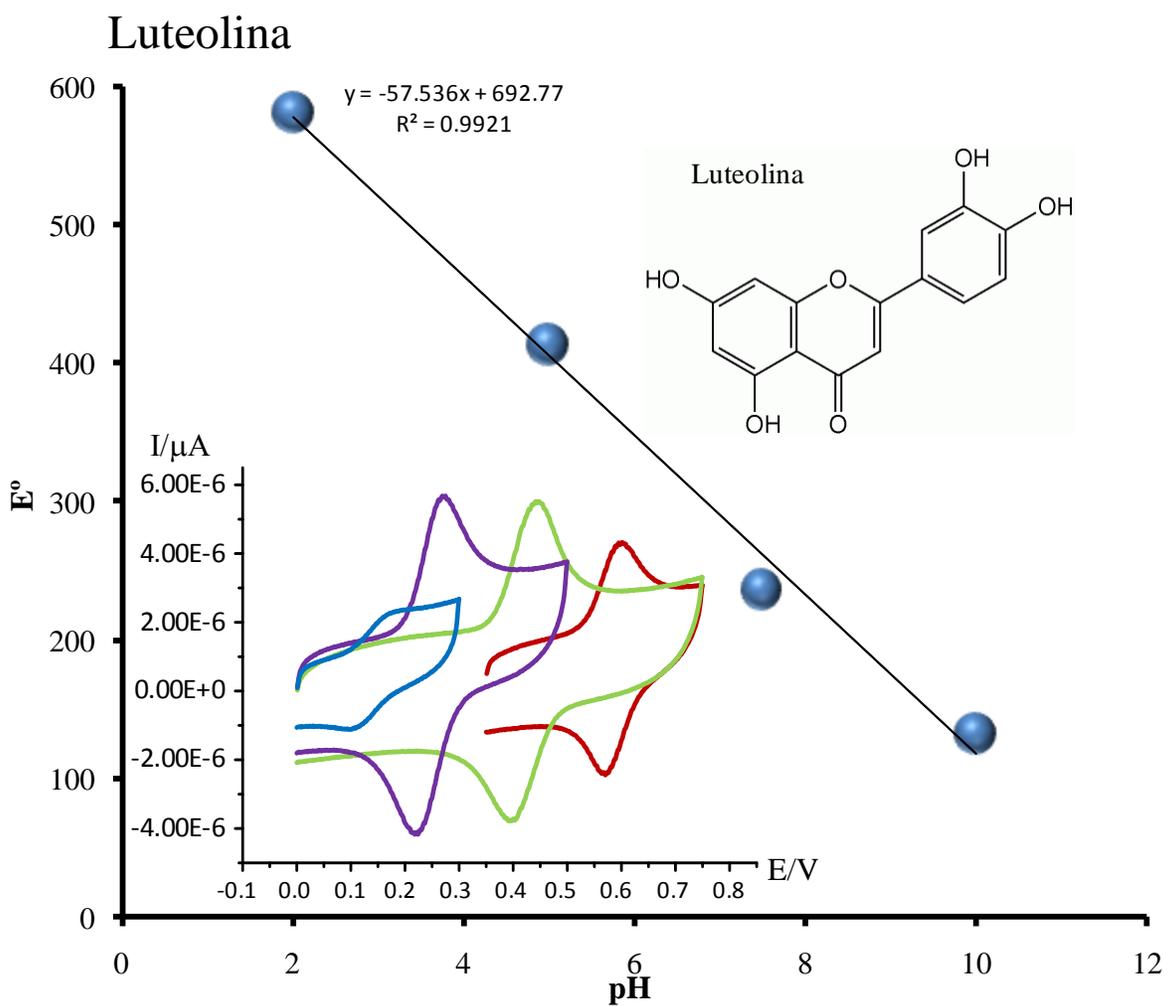


Figura 46. Grafico potencial formal ( $E^0$ ) contra pH de estudio para luteolina

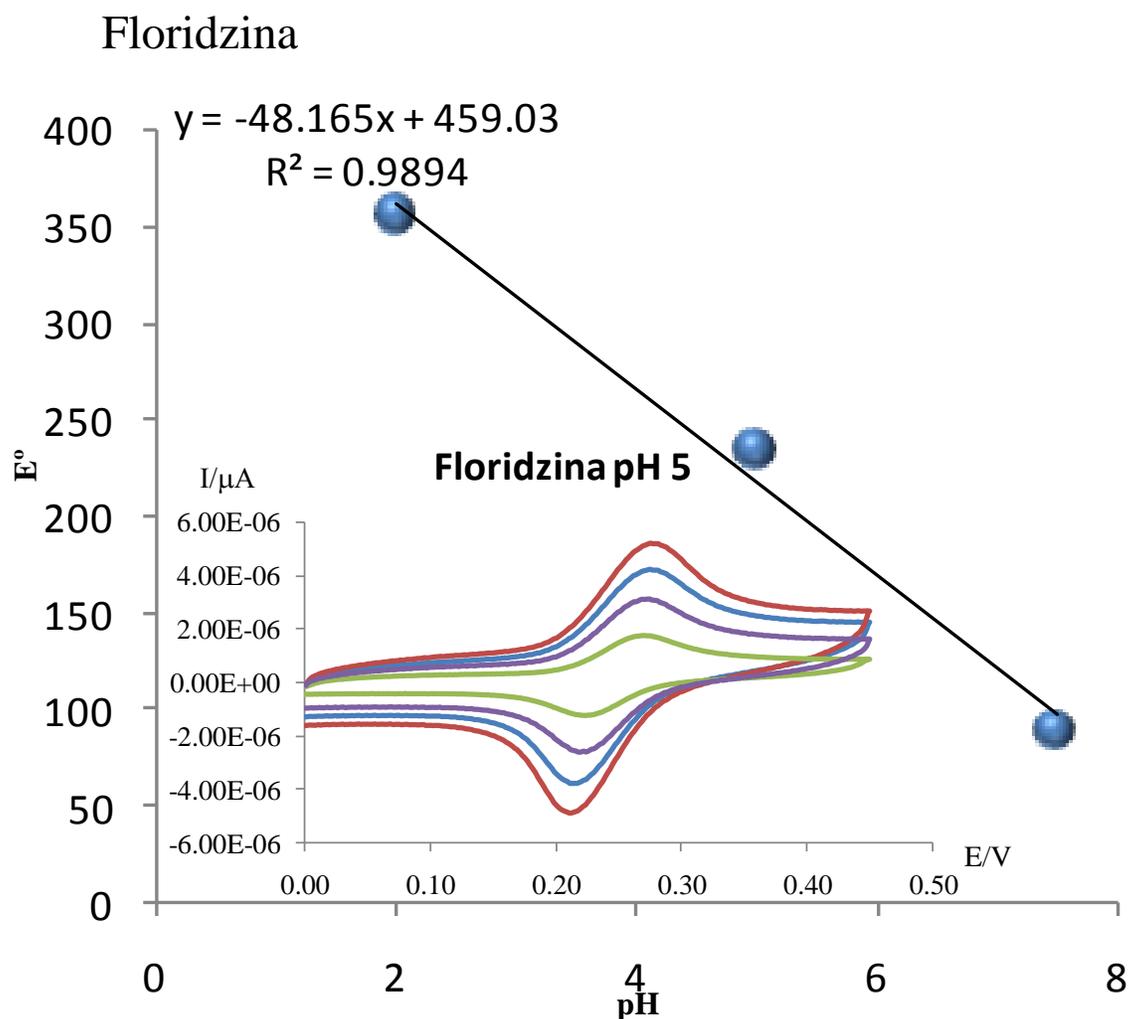


Figura 47. Grafico potencial formal ( $E^0$ ) contra pH de estudio para Floridzina

En la estructura molecular de rutina, puede observarse que al igual que la quercetina, se presenta un grupo catecol en el anillo B así como un doble enlace en C2-C3 en el anillo C y debido a esto, podría pensarse que la señal de oxidación para la rutina sería igual que la de la quercetina. Sin embargo, la rutina es el glucósido de quercetina, así el carbohidrato ubicado en la posición 3 del anillo C impide la formación de la estructura quinoide, cambiando de esta manera la señal de oxidación hacia potenciales más positivos, comparados con los de quercetina.

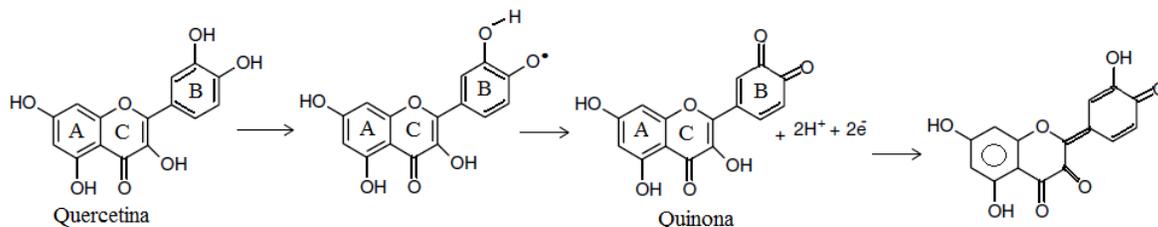


Figura 48. Modificación estructural en quercetina al ser oxidada (Oliveira y Ghica, 2003; Zare *et al.*, 2005)

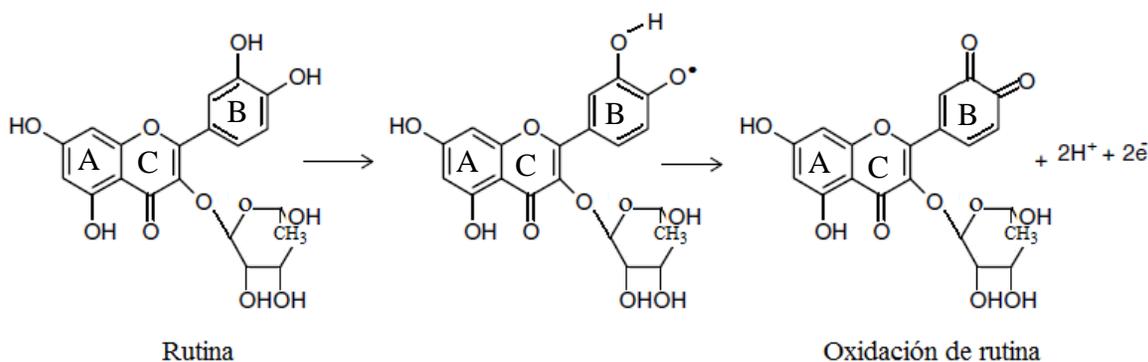


Figura 49. Cambio estructural en rutina al ser oxidada

La diferencia estructural entre la luteolina y la quercetina es la ausencia del grupo OH en la posición 3 del anillo C de luteolina. Cabe recordar que la presencia de un grupo hidroxilo en dicha posición concede una mayor actividad antioxidante a los flavonoides, debido a la formación de la estructura metil quinona por lo que es de esperarse que luteolina presente una menor actividad antioxidante que quercetina. La actividad antioxidante de la luteolina y la rutina es similar a todos los pH de estudio

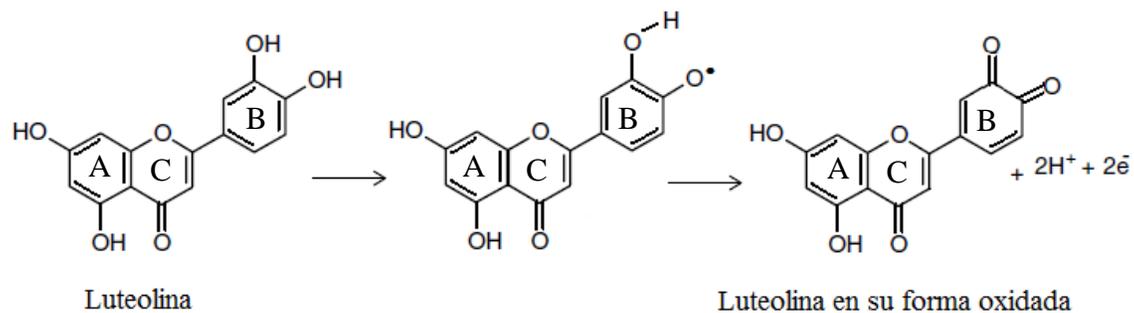


Figura 50. Cambio estructural en luteolina a su forma oxidada

Por otro lado la floridzina presenta en su estructura una molécula de azúcar reduciendo la actividad antioxidante en sus grupos OH, pues resulta ser un obstáculo estérico (Martínez-Valverde *et. al.*, 2000), aun así floridzina es uno de los flavonoides de estudio con gran capacidad antioxidante. Floridzina presenta en su anillo C un grupo OH el cual es el más ácido en la molécula y como se ha venido mencionando esta propiedad genera una mayor electroactividad por lo que se puede sugerir que es éste el sitio donde se lleva a cabo la reacción redox, que involucra el mismo número de electrones y protones (tal como señala la pendiente obtenida en el gráfico de  $E^0$  contra pH en la Figura 47) y un proceso de transferencia de un electrón y un protón, En la Figura 51 se sugiere la estructura generada para la floridzina al ser oxidada.

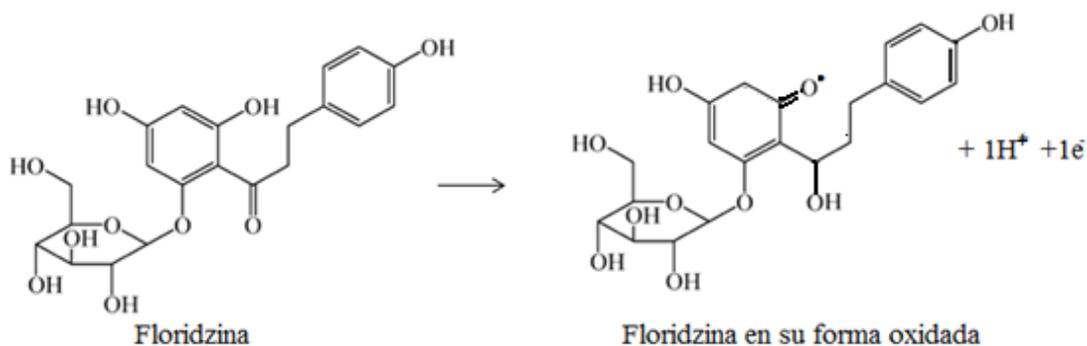


Figura 51. Cambio estructural en floridzina a su forma oxidada

Como puede observarse, para los flavonoides que presentan un grupo catecol en su estructura (quercetina, Luteolina y rutina) tienen un proceso de transferencia de dos

protones y dos electrones, realizada precisamente en la posición 3',4' dihidroxi, esto se debe principalmente a que el grupo catecol es el que tiene mayor electroactividad en la molécula mientras que las posiciones 5 y 7 son menos importantes para la actividad antioxidante pues este grupo se oxida a potenciales altos (600 mV aproximadamente en pH 7) (Oliveira y Ghica, 2003).

Para la floridzina el proceso de transferencia electrónica se propone ser de un protón y un electrón, en este flavonoide no se encuentra presente el grupo 3'4' dihidroxi en el anillo B, sino un grupo OH en el anillo C, el cual tiene una mayor electroactividad que los otros grupos.

#### 6.4 Extracto acuoso de orégano

En las Figuras 52-54, se muestran los voltamperogramas diferenciales de pulso a) y cíclicos b) del concentrado de aguas madres de orégano *L. graveolens* colectado en Querétaro, Puebla y Guanajuato respectivamente, traslapados a pH 2, 5 y 7.5.

Como puede observarse, los voltamperogramas cíclicos de las tres colectas (Figuras 52b, 53b y 54b), no presentan señales bien definidas en comparación con las detectadas en los estándares, esto se debe a que en las muestras la señal de oxidación está generada por una serie de los compuestos electroactivos y esto da lugar a picos anchos. Ninguna de las tres colectas presenta señal de reducción. En los voltamperogramas diferenciales de pulso de los concentrados de orégano de Querétaro, Puebla y Guanajuato (Figuras 52a, 53a y 54a), se observa un desplazamiento de la señal de oxidación a valores mas negativos conforme se incrementa el valor de pH. Es importante mencionar que a pH 10 se observó una separación de fases.

En las Figuras 55, 56 y 57 se muestra una comparación a pH 2, 5 y 7.5 respectivamente entre a) los voltamperogramas diferenciales de pulso y b) cíclicos de los concentrados de aguas madres de *L. graveolens* colectado en Querétaro, Puebla y Guanajuato. Se puede observar que las tres colectas presentan señales de oxidación muy similares en cuanto al potencial de oxidación pero distintas en corriente, por lo que se

puede deducir que dicha señal corresponde a los mismos compuestos para cada uno de ellos, pero en diferentes concentraciones.

Por otra parte, se encontró que el potencial de oxidación en los extractos polares fue muy similar al detectado en el estándar floridzina, por lo que se realizó una mezcla del extracto polar del orégano colectado en Querétaro, con floridzina a pH 2, 5 y 7.5. Los voltamperogramas resultantes se muestran traslapados en la Figura 58, donde se puede observar que hay un incremento en la corriente del extracto cuando es adicionado el estándar, sin embargo el potencial de oxidación no es desplazado significativamente, lo cual sugiere que es floridzina uno de los compuestos presentes en el extracto polar y muy probablemente sea el mayoritario. Por otro lado, esto indica que floridzina tiene también interacción electroquímica con los demás compuestos presentes en la mezcla.

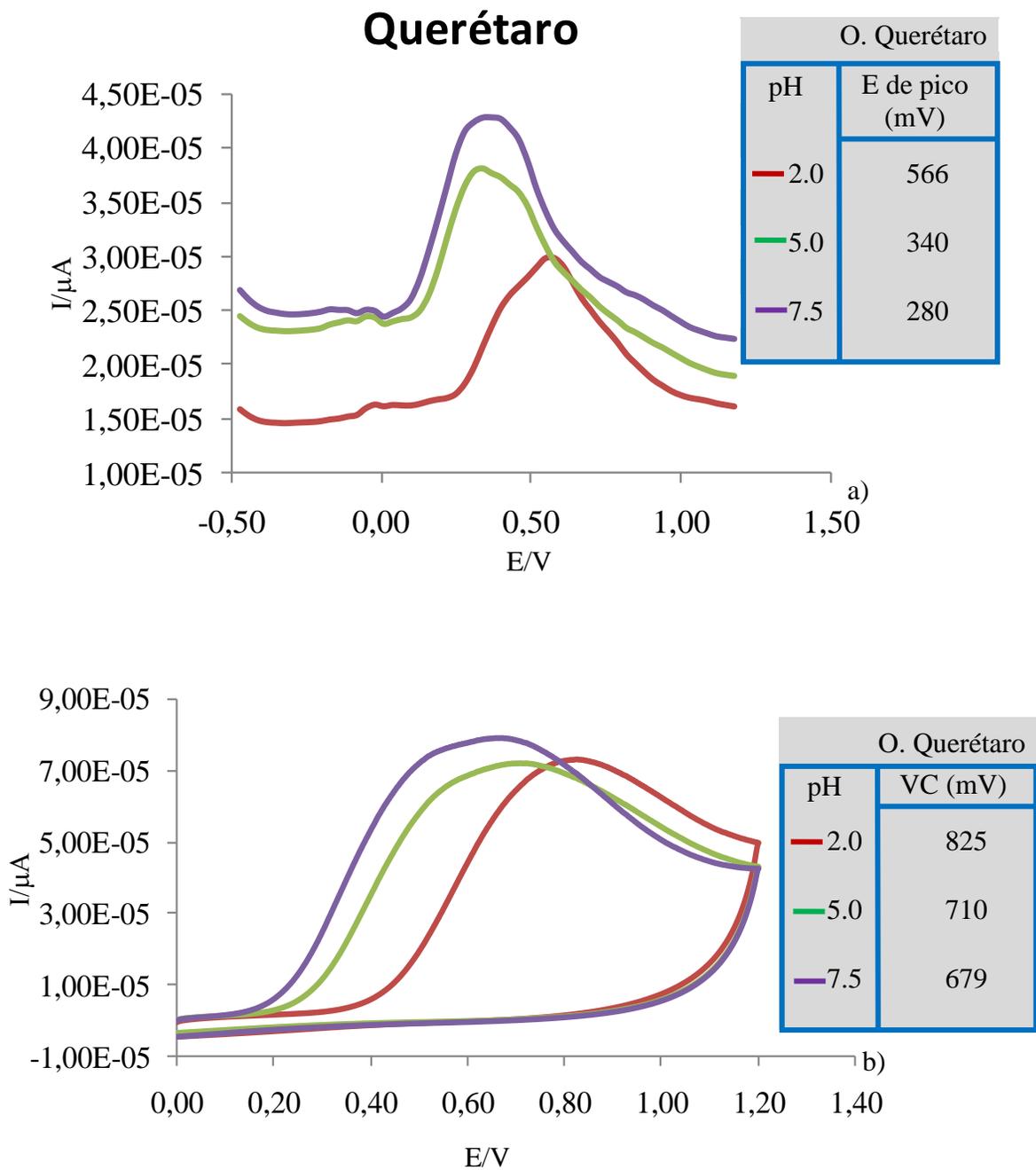


Figura 52. Voltamperograma diferencial de pulso a) y cíclico b) del concentrado de aguas madres del Orégano colectado en Querétaro a diferentes valores de pH.

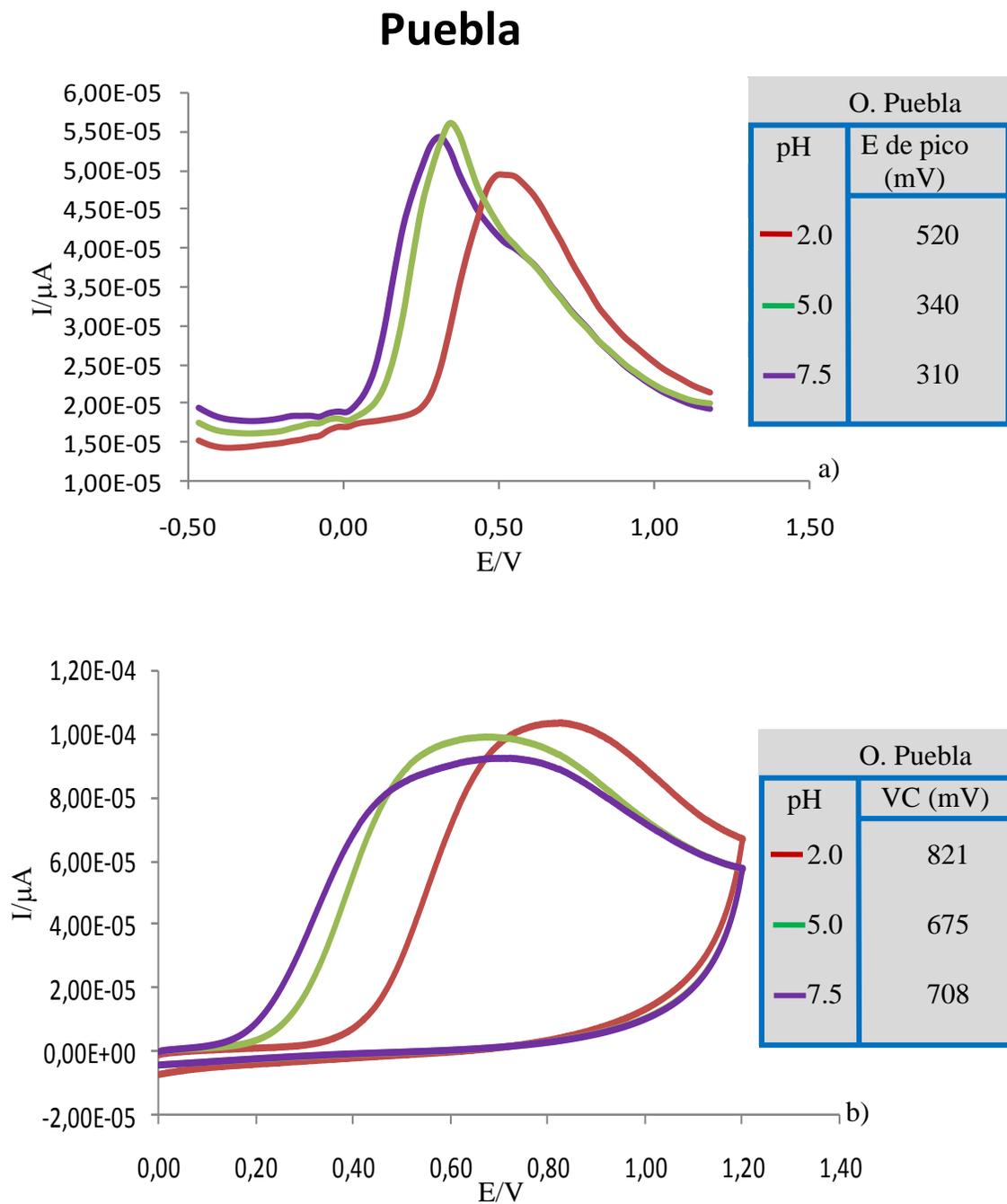


Figura 53. Voltamperograma diferencial de pulso a) y cíclico b) del concentrado de aguas madres del Orégano colectado en Puebla a diferentes valores de pH.

## Guanajuato

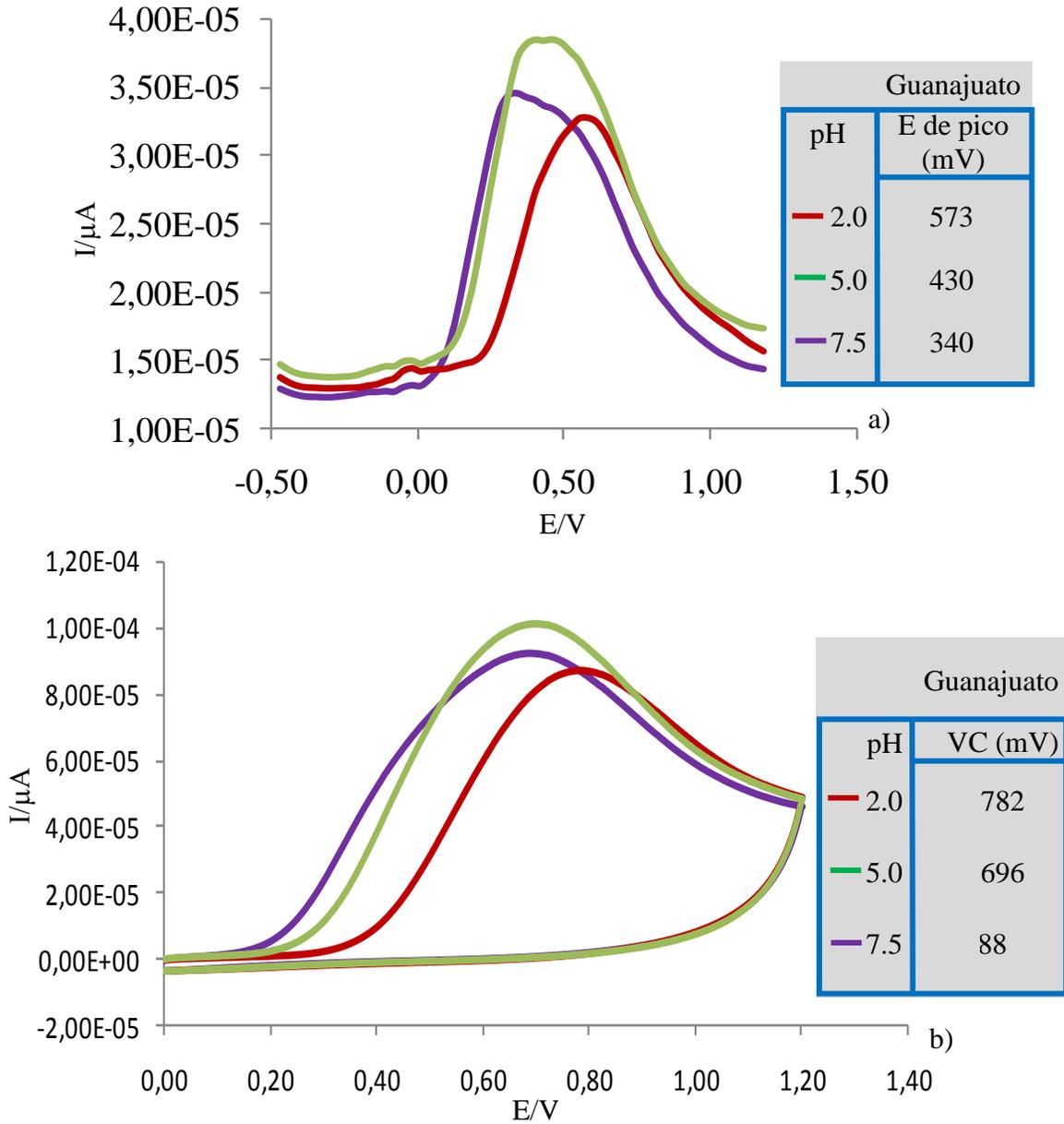


Figura 54. Voltamperograma diferencial de pulso a) y cíclico b) del concentrado de aguas madres del Orégano colectado en Guanajuato a diferentes valores de pH.

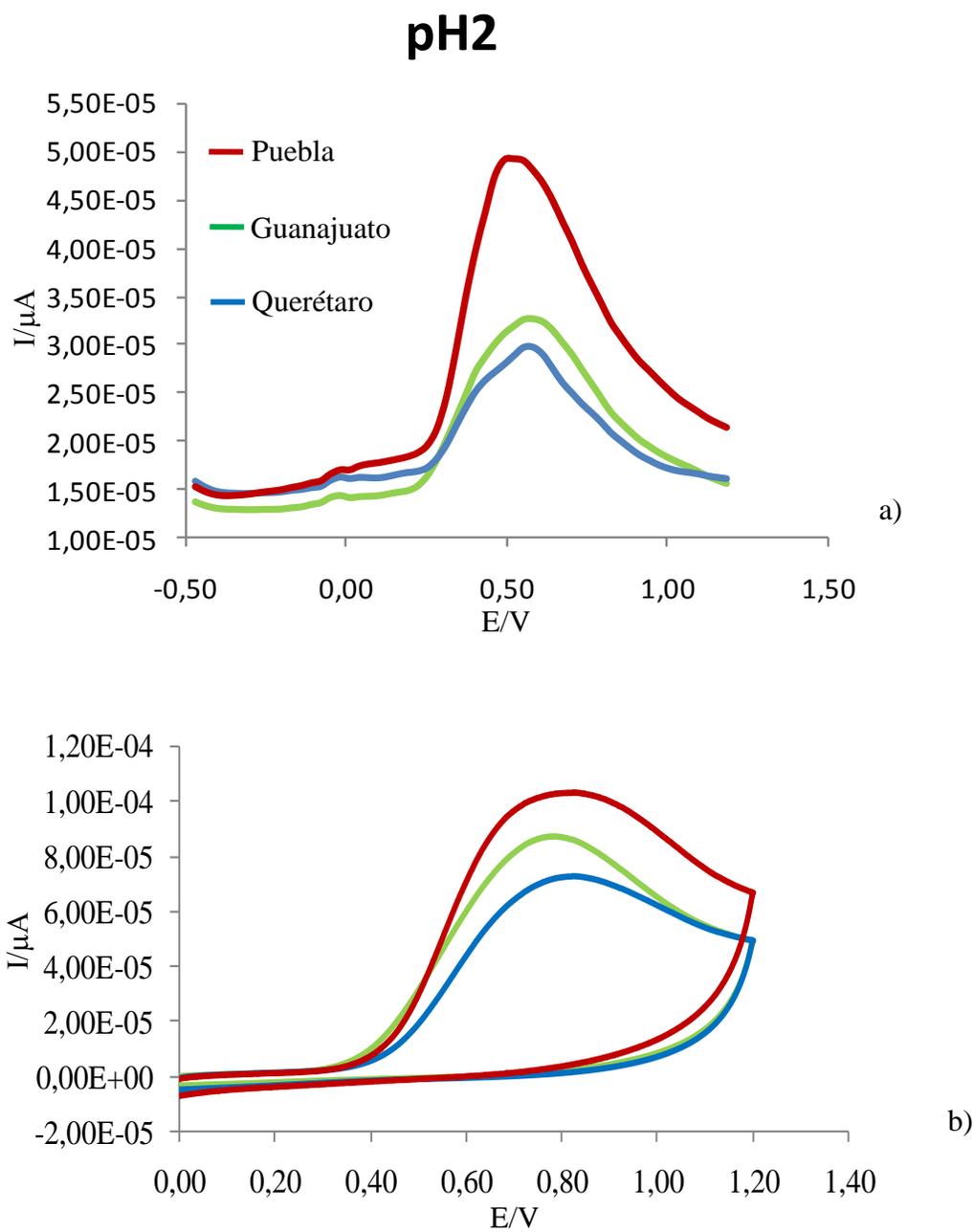


Figura 55. Voltamperograma diferencial de pulso a) y cíclico b) del concentrado de aguas madres de las tres colectas de orégano traslapados a pH 2.

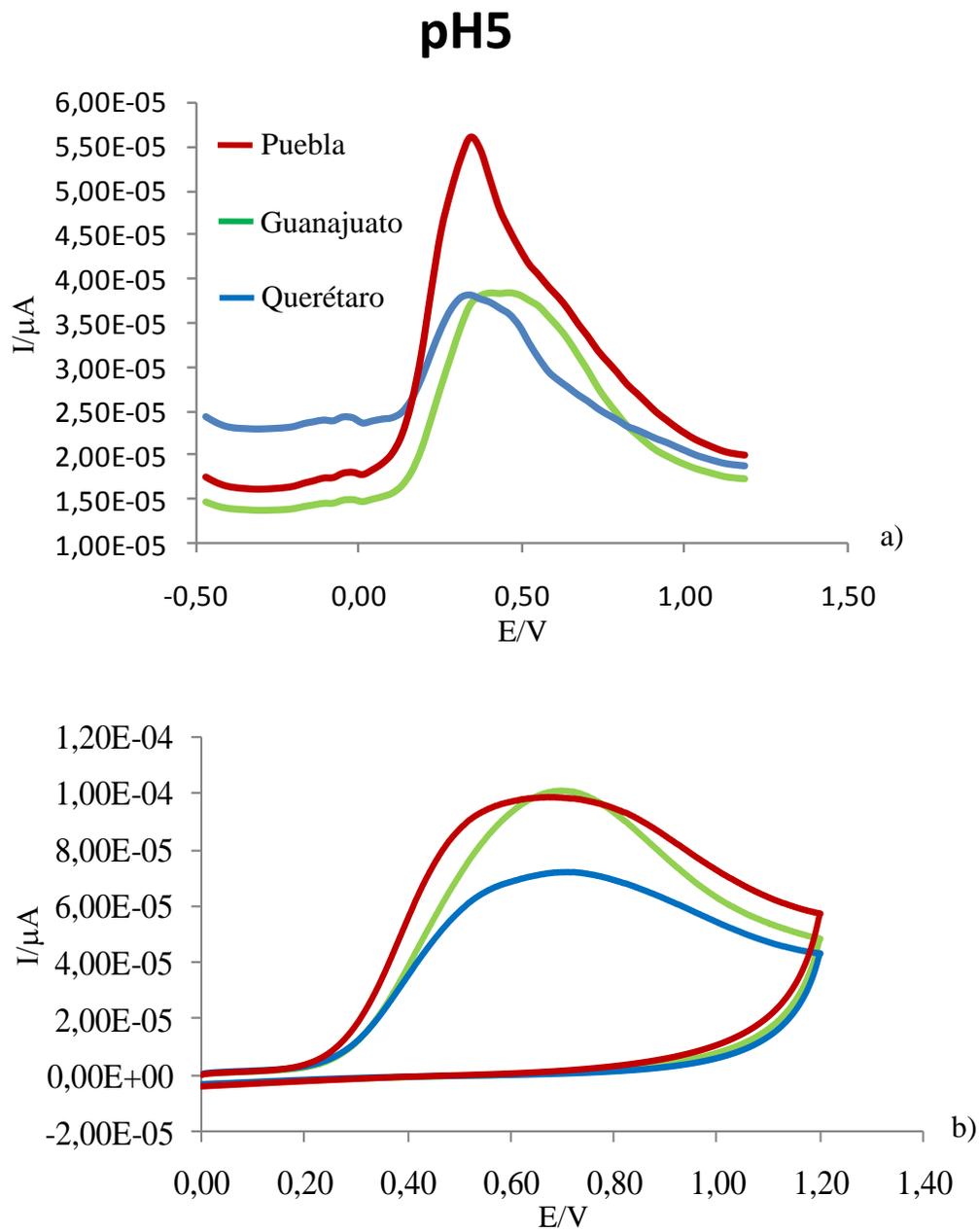


Figura 56. Voltamperograma diferencial de pulso a) y cíclico b) del concentrado de aguas madres de las tres colectas de orégano traslapados a pH 5.

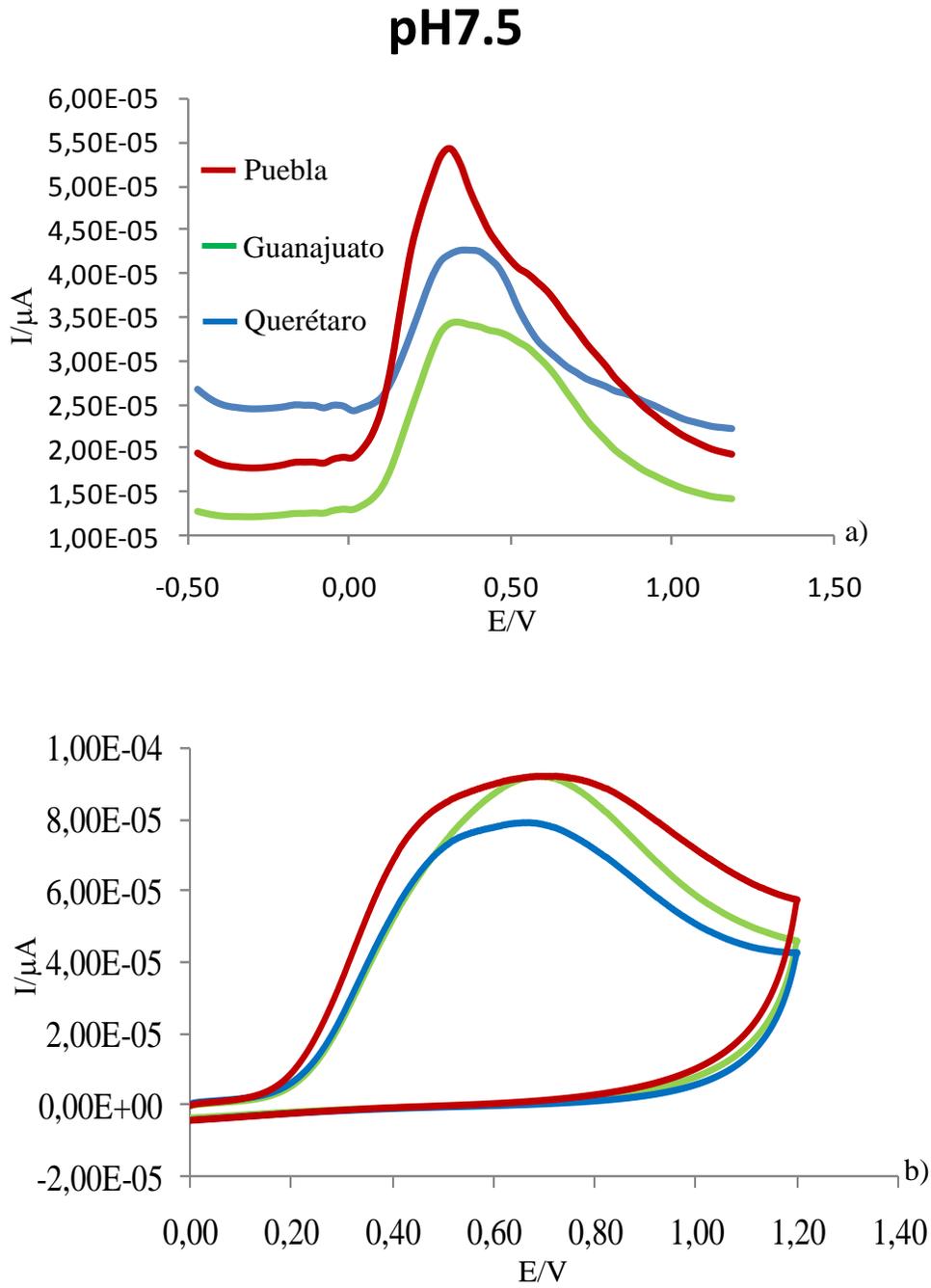


Figura 57. Voltamperograma diferencial de pulso a) y cíclico b) del concentrado de aguas madres de las tres colectas de orégano traslapados a pH 7.5.

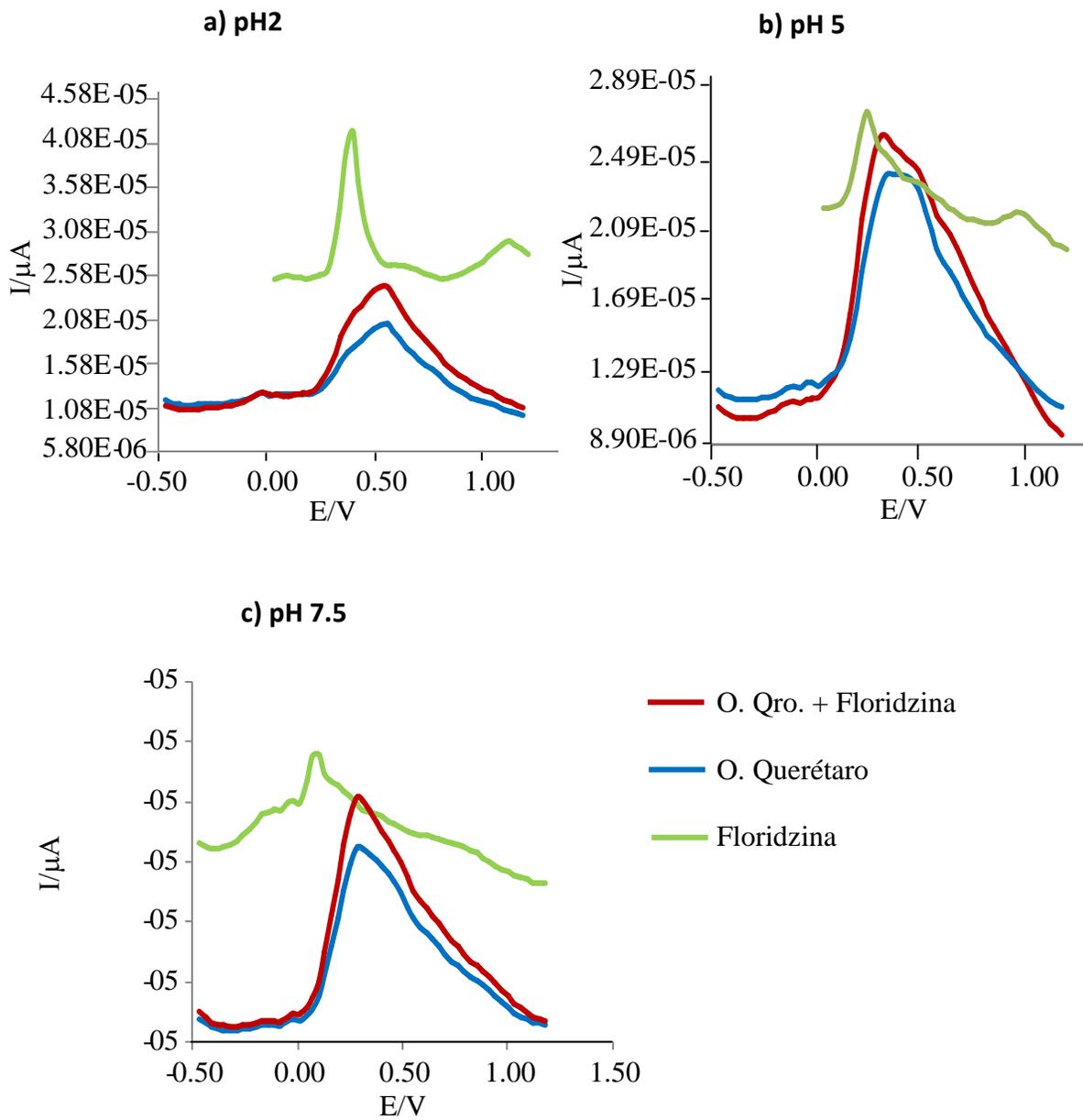


Figura 58. Voltamperogramas diferenciales de pulso de la mezcla del estándar Floridazina y Orégano colectado en Querétaro a pH 2 a), pH 5 b) y pH 7.5 c)

## 6.5 Aceite esencial de orégano.

En la Figura 59 se presentan los voltamperogramas diferenciales de pulso a) y cíclicos b), de los aceites esenciales obtenidos del orégano colectado en Querétaro, Puebla y Guanajuato y en la Figura 60 se muestran los voltamperogramas traslapados de los aceites con los estándares timol y carvacrol que son los monoterpenos característicos del aceite de orégano.

Como puede verse los voltamperogramas tanto cíclico como los diferenciales de pulso de la Figura 59 del aceite obtenido de las tres colectas son muy similares en cuanto a la señal del potencial de oxidación, sin embargo dicha señal se percibe con corrientes de pico distintas (Puebla > Guanajuato > Querétaro) lo cual se debe a la diferencia en concentración de los compuestos electroactivos presentes en las diferentes colectas. Por otra parte en la Figura 60 se observa que las señales de oxidación son cercanas a la de la mezcla timol-carvacrol.

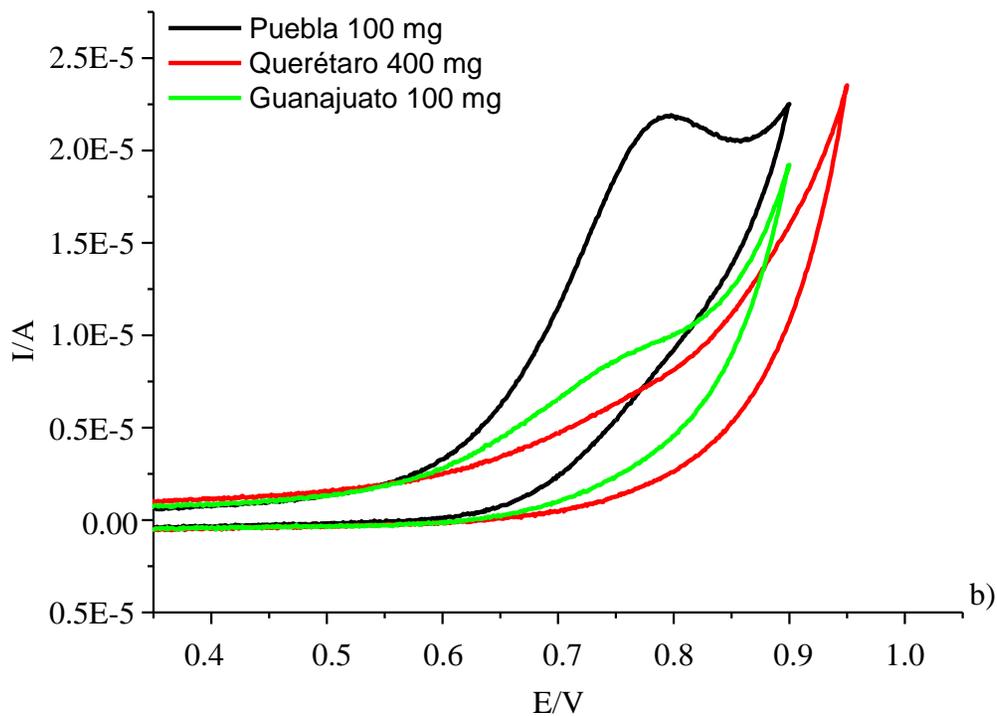
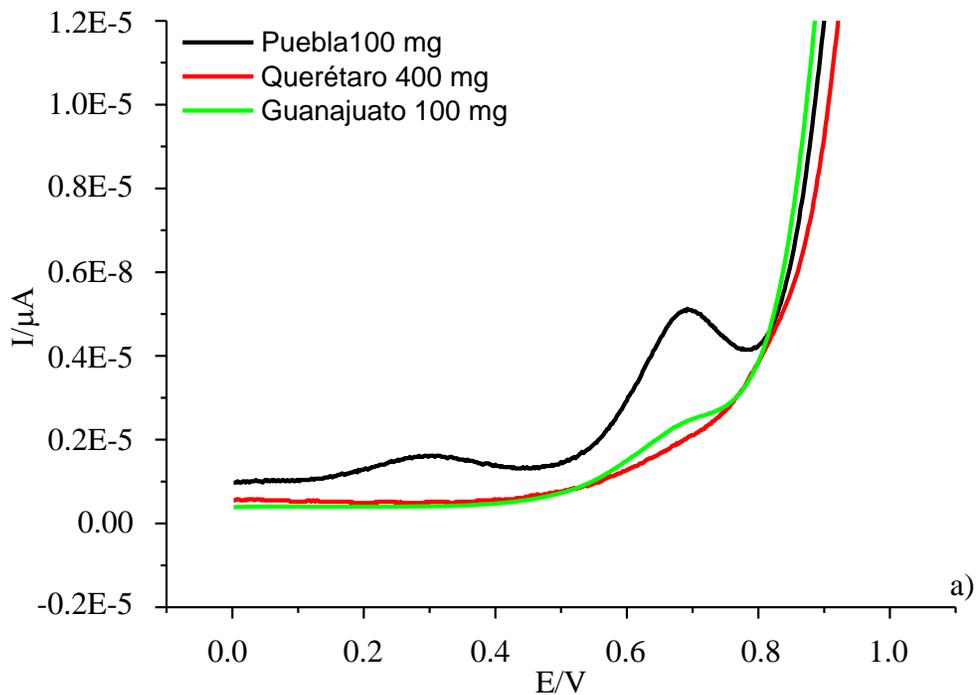


Figura 59. Voltamperogramas diferenciales de pulso a) y cíclicos b) de los aceites esenciales de las tres colectas traslapados.

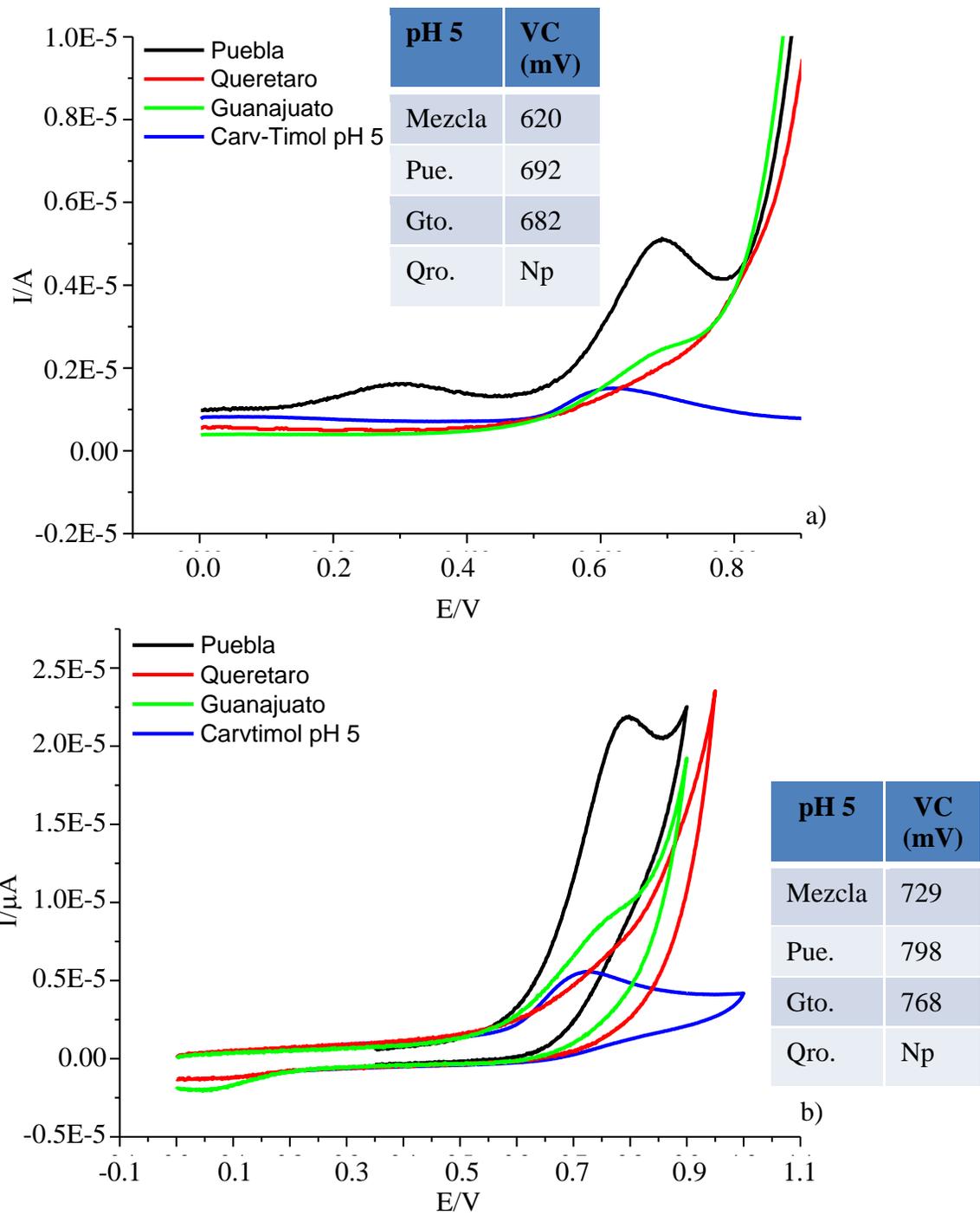
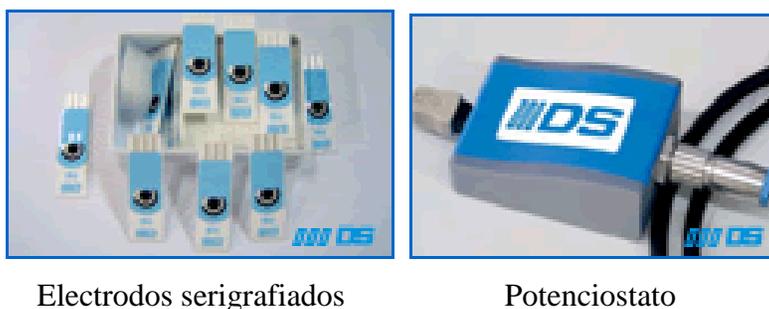


Figura 60. Voltamperogramas diferenciales de pulso a) y cíclicos b) traslapados del aceite de las colectas y la mezcla timol y carvacrol.

## 6.6 Uso de electrodos modificados para análisis del aceite esencial de orégano mexicano

Las técnicas electroquímicas son muy sensibles y en efecto capaces de analizar la actividad antioxidante tanto de estándares como de muestras complejas de manera rápida y eficaz. Sin embargo, estas técnicas pueden ser desarrolladas mediante el uso de diversos tipos de electrodos, los resultados en cuanto a capacidad antioxidante deberán presentar las mismas tendencias, es por esto que de manera adicional se desarrolló el análisis del aceite esencial de orégano mexicano colectado en Puebla y en Querétaro mediante voltamperometría diferencial de pulso con electrodos serigrafiados y una celda de tres electrodos integrados en un compacto soporte de cerámica con dimensiones de 3.4 x 1.0 x 0.05 cm (largo x ancho x alto) de la marca DropSens y un minipotenciostato portátil con dimensiones de 6.0 x 4.2 x 2.8 cm (largo x ancho x alto), Figura 61.



Electrodos serigrafiados

Potenciostato

Figura 61. Electrodos serigrafiados y potenciostato empleados

Para el análisis se utilizaron cuatro tipos de electrodos a fin de elegir el de mejor desempeño en cuanto a detección de los compuestos mayoritarios con actividad antioxidante en el aceite esencial del orégano, éstos se diferenciaban en la constitución del electrodo de trabajo: de carbono (normal), de carbono modificado con nanopartículas de oro, modificado con multicapas de nanotubos de carbono, y modificado con una capa de nanotubos de carbono.

Los análisis se realizaron primeramente con los estándares carvacrol y timol (monoterpenos mayoritarios en el aceite esencial de orégano) a una concentración de 10

$\mu\text{M}$ , en una solución amortiguadora Sörensen a pH 5. Los electrodos inicialmente fueron usados sin tratamiento previo, observándose entre cada gota distinta una falta de reproducibilidad en los voltamperogramas diferenciales de pulso los cuales se muestran en la Figura 62a). Posteriormente se procedió a realizar una activación electroquímica la cuál mejoró significativamente la reproducibilidad del sistema, los resultados se ilustran en la Figura 62b). La misma tendencia fue observada con los demás electrodos.

La Figura 63, muestra los voltamperogramas diferenciales de pulso traslapados con los diferentes tipos de electrodos para carvacrol y timol.

De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió hacer los análisis del aceite esencial con el electrodo de una capa de nanotubos de carbono, debido a la obtención de una mayor corriente y definición para el carvacrol, el compuesto mayoritario del aceite de orégano mexicano. La Figura 64 muestra los resultados traslapados del aceite de la coleta de Querétaro y del mismo aceite con una adición del estándar timol y carvacrol, donde puede verse un claro incremento en la corriente cuando el estándar es adicionado a la muestra, también se observa que el potencial de oxidación no se desplaza significativamente, en la Figura 65 se presentan los resultados sobrepuestos del aceite de la colecta de Puebla y de éste mismo con la adición de los estándares timol y carvacrol.

En la Figura 66 se muestran los voltamperogramas traslapados del aceite del orégano de Querétaro con el de Puebla, para éste estudio se preparo la muestra diluyendo 100 mg del aceite en 5ml de DMSO, de esta solución se tomaron 20  $\mu\text{L}$  y se diluyó en 20 ml con la solución amortiguadora Sörensen.

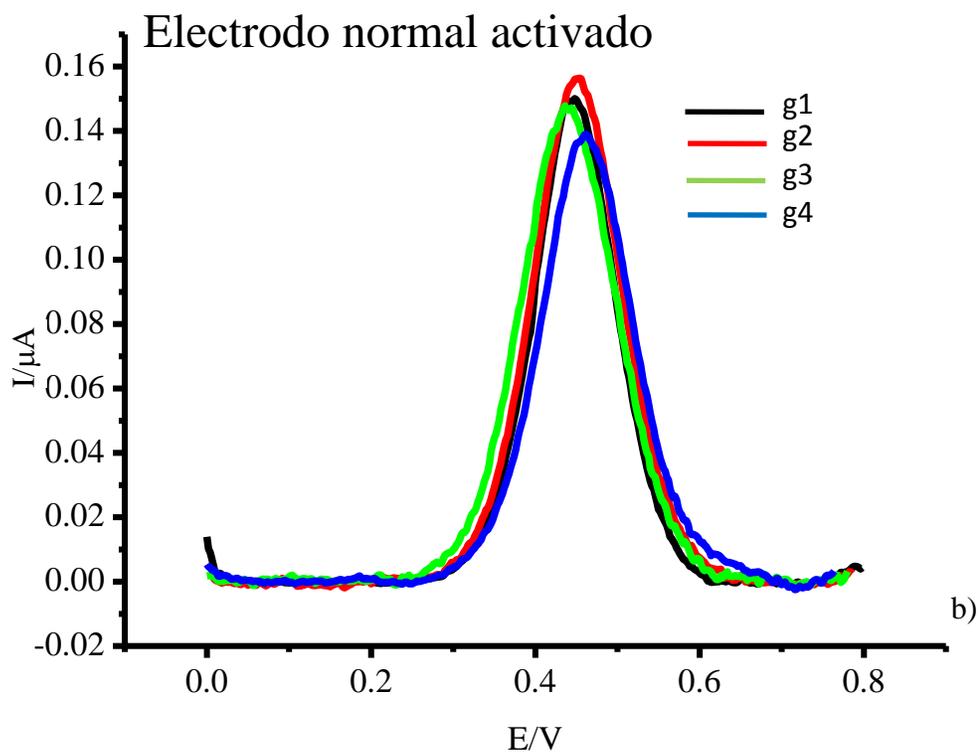
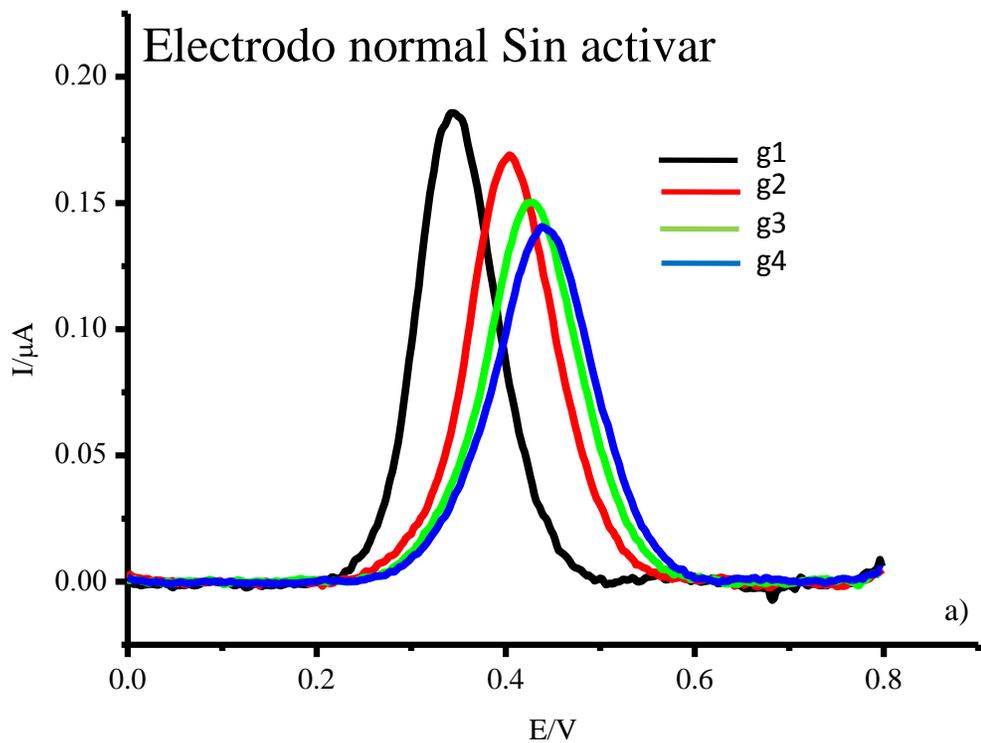


Figura 62. Voltamperogramas diferenciales de pulso de carvacrol a  $10 \mu\text{M}$ , en solución amortiguadora Sörensen a pH 5 con electrodo normal sin activar a), activado b).  
g = numero de gota

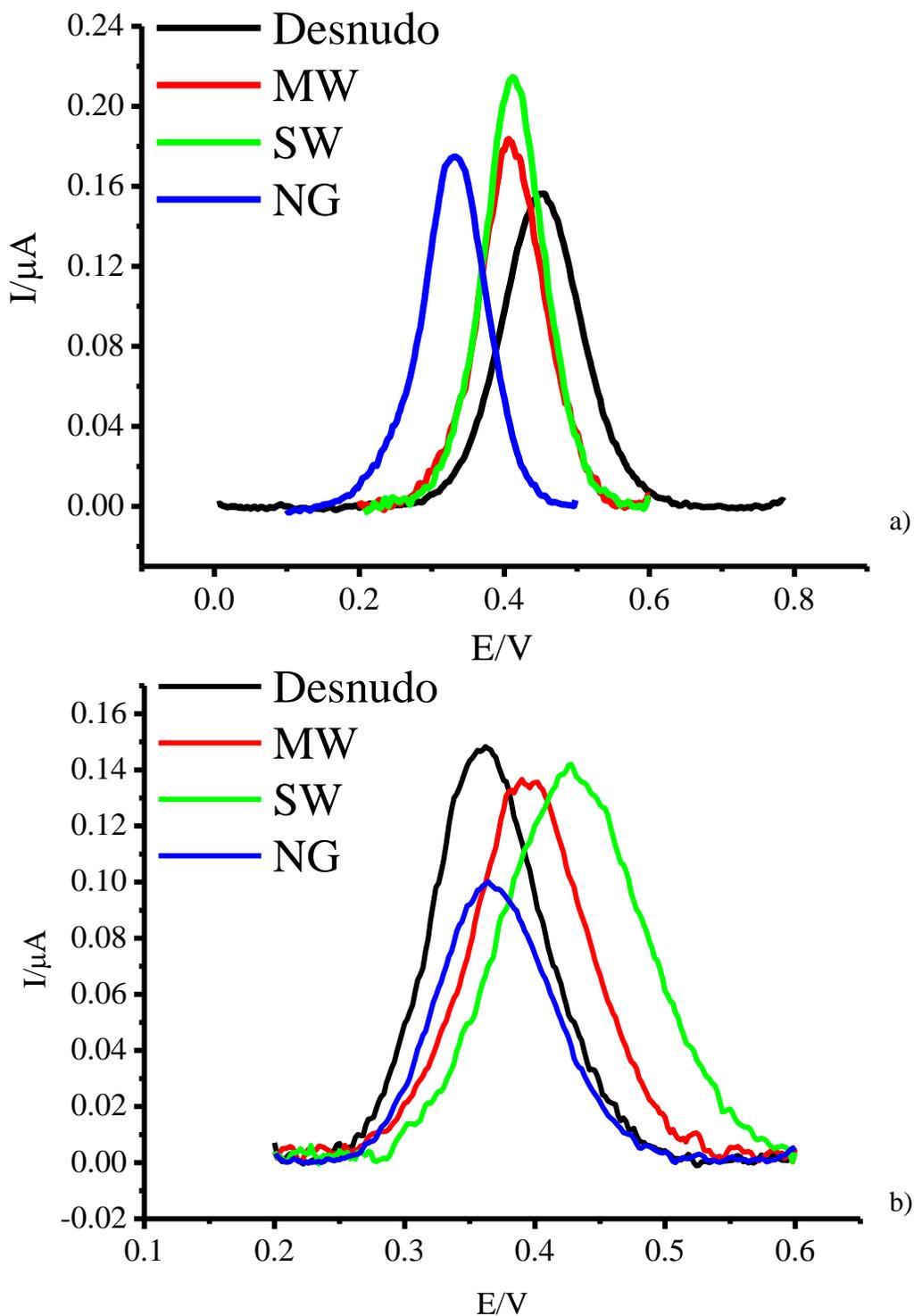


Figura 63. Voltamperogramas diferenciales de pulso traslapados con los electrodos usados para carvacrol a) y timol b). MC=Multi-capas de nanotubos de carbono, UC=una capa de nanotubos de carbono, NG=Nanopartículas de oro

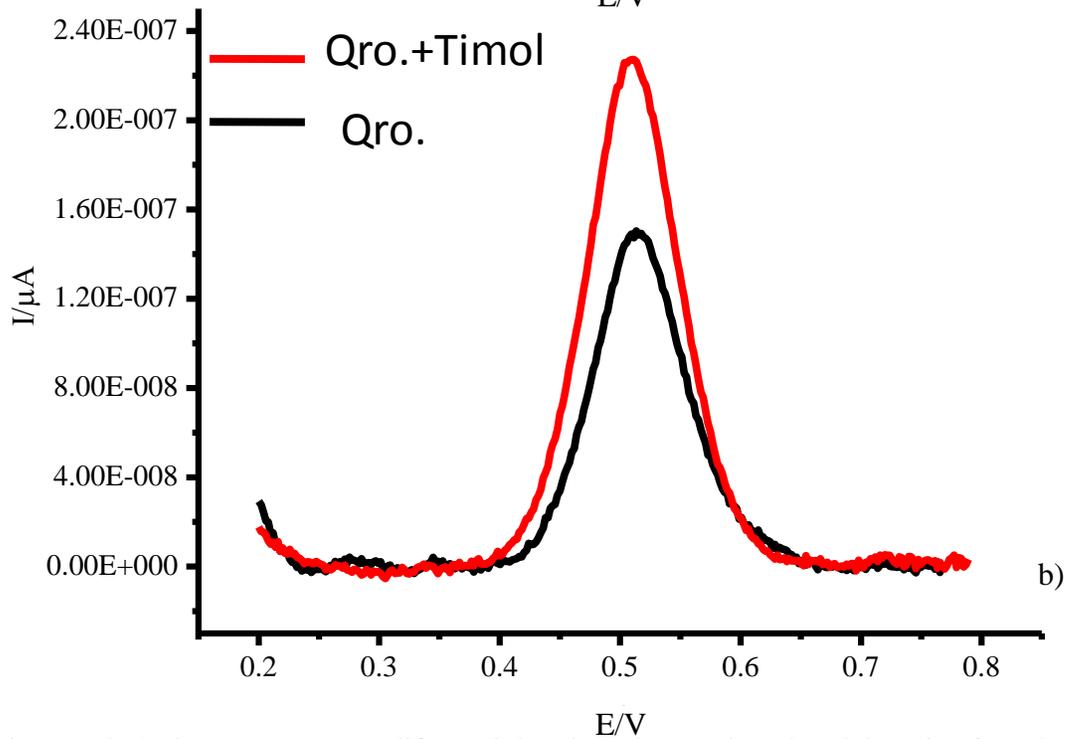
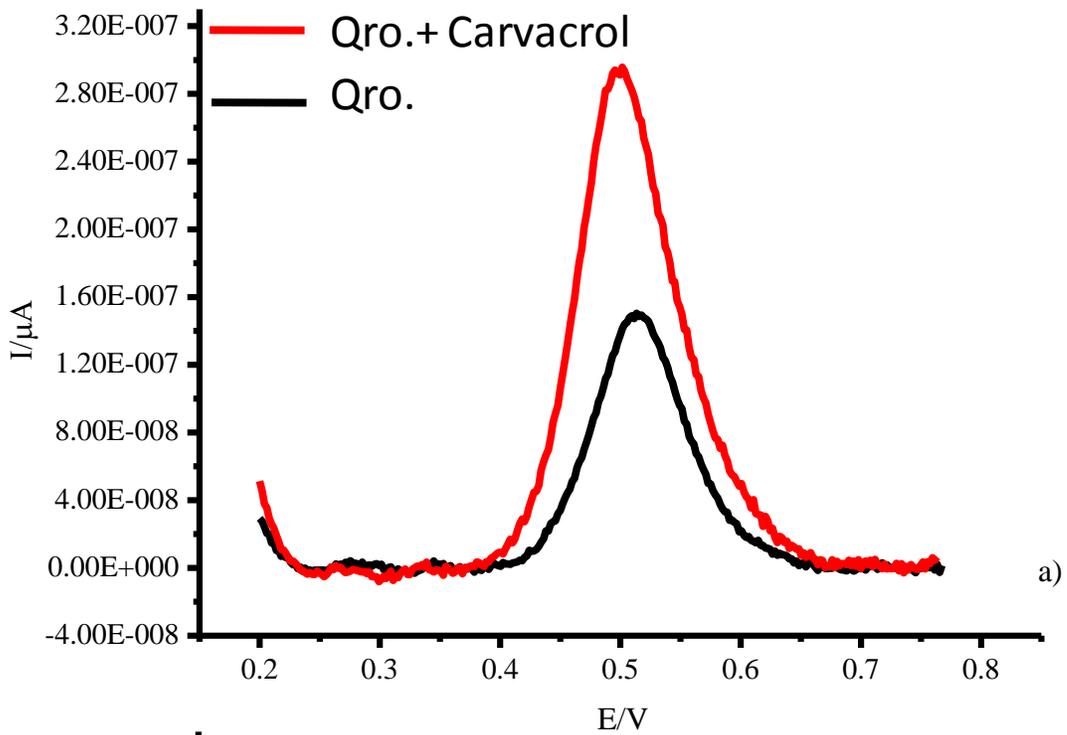


Figura 64. Voltamperogramas diferenciales de pulso traslapados del aceite Querétaro y el aceite con adición de carvacrol a) y timol b)

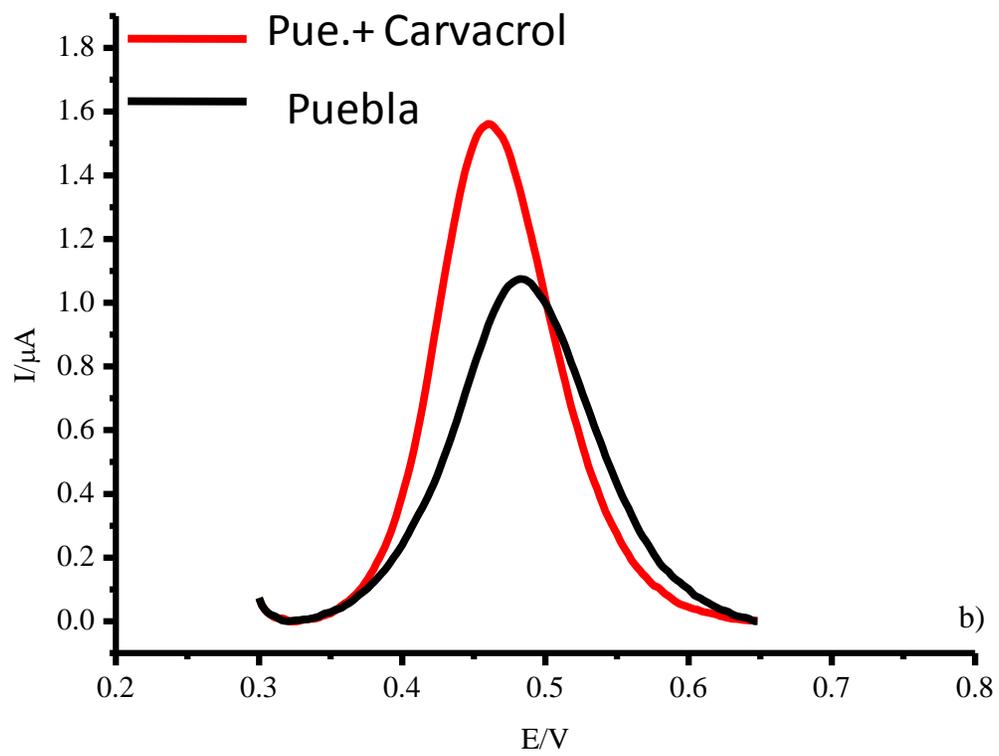
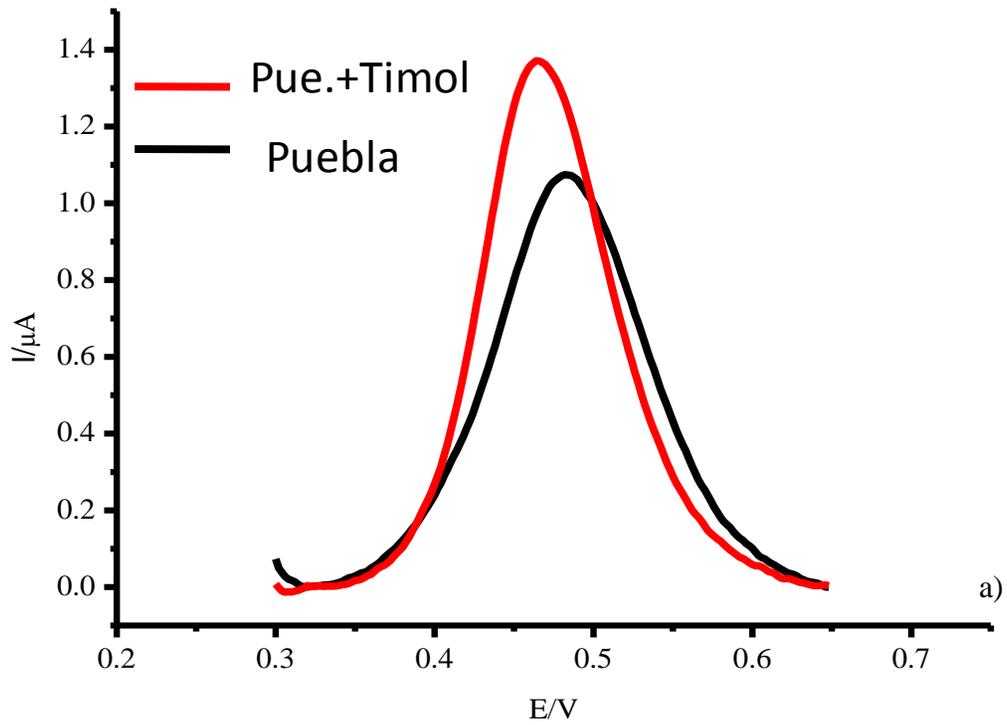


Figura 65. Voltamperogramas diferenciales de pulso traslapados del aceite Puebla y el aceite con adición de timol a) y carvacrol b)

En la Figura 66 se presentan los resultados traslapados de la colecta de Puebla y Querétaro (a) y se anexa el voltamperograma que se obtuvo con la celda convencional (b). Se puede observar que el aceite de Puebla presenta una mayor corriente que el de Querétaro lo que significa un mayor contenido de los compuestos mayoritarios y por consiguiente una mayor capacidad antioxidante. En la Figura 66b se observa una menor resolución en la señal y se aprecia una corriente ligeramente mayor (1.9  $\mu\text{A}$ ) es decir una diferencia en cuanto a corriente de 0.72  $\mu\text{A}$  comparada con la obtenida cuando se usó el electrodo de una capa de nanotubos de carbono, Aun así se puede decir que el uso de este electrodo serigrafado incrementa la sensibilidad de la técnica ya que hay que recordar que con la celda convencional la concentración del aceite era mucho mayor (100 mg en 5 ml de DMSO).

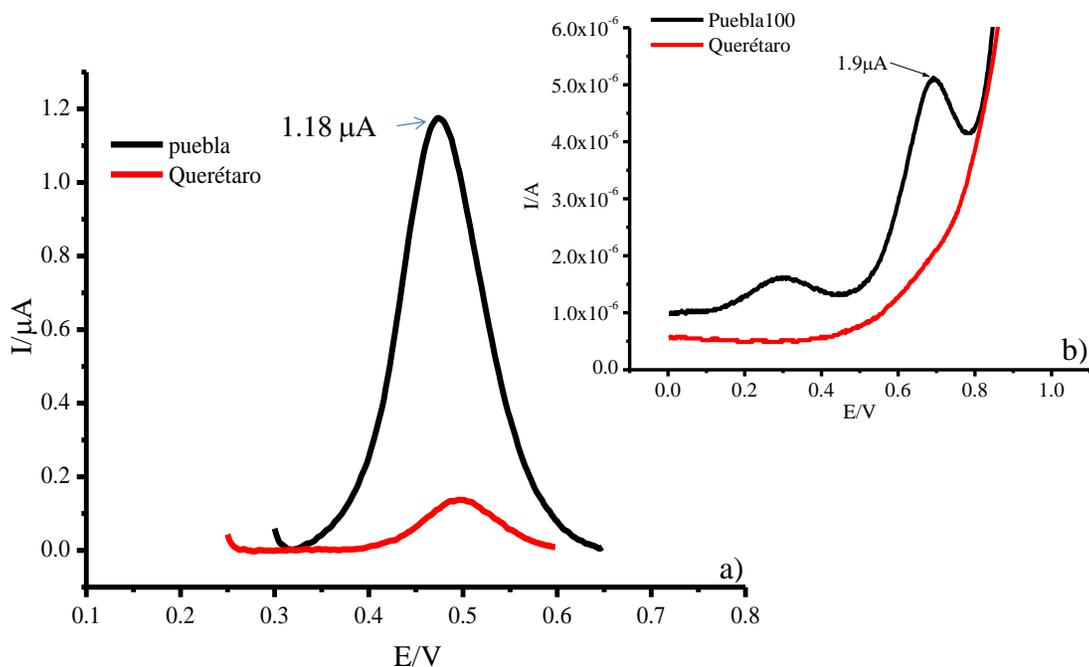


Figura 66. Voltamperogramas diferenciales de pulso traslapados resultantes en el aceite de orégano colectado en Querétaro y Puebla, obtenidos usando el electrodo serigrafado de una capa de nanotubos de carbono a) y con la celda convencional de tres electros separados b)

El análisis del aceite esencial se realizó también mediante cromatografía de gases-masas. La Figura 67 muestra el cromatograma a) y el voltamperograma diferencial de pulso b) del aceite esencial de las tres colectas, los cuales como puede observarse están bien correlacionados pues las señales de los compuestos mayoritarios (timol y carvacrol) correspondientes a la colecta de Puebla, obtenidas en ambas técnicas son las de mayor intensidad, significando con ello que es en éste aceite donde una mayor concentración de los compuestos mayoritarios están presentes comparados con el de Guanajuato y Querétaro.

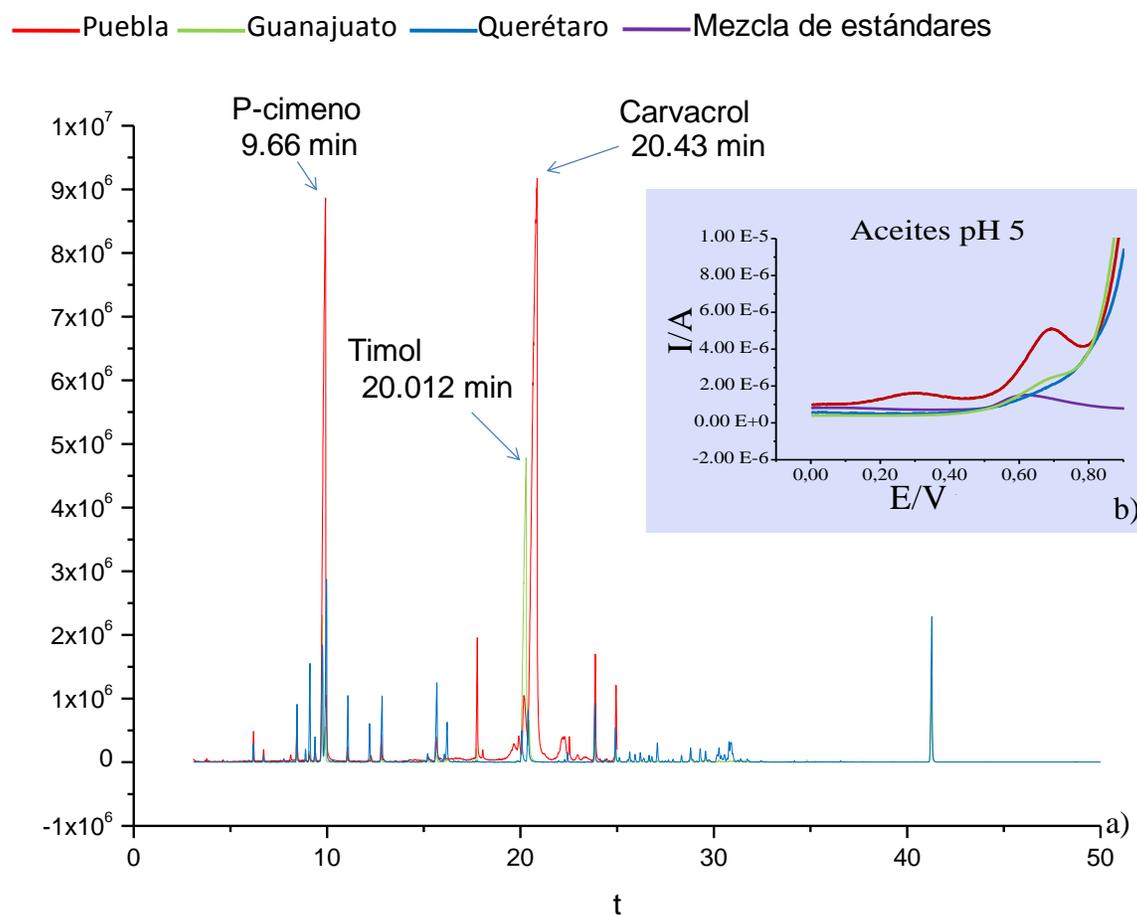


Figura 67. Comparación entre Cromatograma a) y voltamperograma diferencial de pulso obtenido mediante celda de tres electrodos convencional b) del aceite de orégano colectado en Puebla, Guanajuato y Querétaro.

## 7. Conclusiones

La técnica electroquímica de voltamperometría diferencial de pulso es una técnica sensible, rápida, de bajo costo y capaz de analizar adecuadamente la capacidad antioxidante tanto de estándares como de muestras complejas tal como el extracto polar y no polar del orégano mexicano *L. graveolens*. Los resultados muestran que la capacidad antioxidante en el orégano mexicano varía según el lugar de colecta, y el orégano colectado en Puebla fue el que presentó mayor capacidad antioxidante, seguido por el de Guanajuato y el de menor fue el colectado en Querétaro (esto tanto en el extracto polar como en el aceite esencial). Resultados que sugieren que esto se debe a una mayor cantidad de metabolitos secundarios electroactivos generados en la planta a consecuencia de un estrés ambiental distinto para cada una de las colectas. De esta manera, la colecta silvestre de Puebla con un mayor estrés en la planta, generó mayor cantidad de metabolitos secundarios y por lo tanto una actividad antioxidante elevada en comparación con la colecta de Guanajuato (con un estrés ambiental menor) y la de Querétaro, ésta última al ser cultivada tendría mayor cuidado ambiental y por lo tanto una menor generación de metabolitos secundarios.

Todos los estándares de estudio presentaron capacidad antioxidante elevada, la cual varía dependiendo del pH del medio en que se encuentren. Así, una mayor capacidad antioxidante se observó conforme el pH se incrementaba. La reversibilidad del sistema, es decir la velocidad para ceder electrones en los estándares, también varía con el pH. Así, bajo las condiciones de estudio ya mencionadas, la floridzina presenta reversibilidad a pH 5; la luteolina a pH 2, 5 y 7.5; la rutina es cuasi-reversible en todos los pH's.

La estructura molecular de los flavonoides es determinante para su actividad antioxidante. Un rasgo estructural importante en la molécula de los flavonoides para tener una buena actividad antioxidante, es la presencia de un grupo catecol en el anillo B ya que éste es capaz de ceder fácilmente sus electrones y con ello sus protones con lo cual la molécula se estabiliza. El método electroquímico con el cual se determinó el número de

electrones transferidos en los flavonoides, dio como resultado igual número de electrones y protones para quercetina, rutina, luteolina y floridzina respectivamente

La misma técnica no pudo ser empleada para el análisis de número de electrones y protones transferidos para los flavonoides naringenina, galangina y apigenina ya que estos no presentan una señal de reducción en voltamperometría cíclica.

Los resultados obtenidos en el aceite esencial de orégano mediante la técnica electroquímica de voltamperometría diferencial de pulso, se compararon con los obtenidos por cromatografía de gases-espectrometría de masas y fueron bien correlacionados en lo que respecta a la concentración cualitativa de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite de *L. graveolens*.

Finalmente, si bien es cierto que las técnicas electroquímicas son altamente sensibles, simples de usar y que no requieren grandes cantidades de muestras para su análisis, también lo es el hecho de que pueden ser aun más simplificadas; y una forma es mediante el empleo de electrodos serigrafiados ya que con éstos es posible utilizar cantidades de muestras mucho más pequeñas en cuanto a volumen y concentración, con la ventaja de detectar capacidad antioxidante mediante una sola gota de 50µL de muestra de manera rápida, fácil y confiable. En este caso y para dicho fin, se emplearon electrodos serigrafiados, los cuales fueron capaces de detectar concentraciones de hasta 5µM en los estándares timol y carvacrol. De éste modo fue posible mejorar la sensibilidad en el análisis del aceite esencial, consiguiendo apreciar señales de oxidación del orden de nA cuando el aceite se encontraba mucho más diluido que en el análisis que se realizó en la celda convencional.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Arcila-Lozano C. C., Loarca-Piña G., Lecona-Uribe S., González de Mejía E., 2004, Oregano: Properties, composition and biological activity of its components, *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 54:100-111.
- Asotra, Kamlesh; Rehan, Virender K., 2007, Ethnic diversity and oxidative stress in health and disease, *Oxidative Stress*, 1-22.
- Barros L., Falcão S., Baptista P., Freire C., Vilas-Boas M., Ferreira Isabel C.F.R., 2008, Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays, *Food Chemistry* 111:61-66
- Blasco A. J., González M. C., Escarpa A., 2004, Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolics acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants, *Analytica Chimica Acta* 511:71-81.
- Block Gladys, 1999, Antioxidant Food Supplements in Human Health, Academic Press, Japan, p. 45.
- Botsoglou NA, Christaki E, Fletouris DJ, Florou-Paneri P, Spais AB., 2002, The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage, *Meat Science*, 62:259-265.
- Botsoglou NA, Govaris A, Botsoglou EN, Grigoropoulou SH, Papageorgiou G., 2003a, Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and alpha-tocopheryl acetate supplementation in long-term frozen stored turkey meat, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51:2930-2936
- Botsoglou NA, Grigoropoulou SH, Botsoglou E. Govaris A, Papageorgiou G., 2003b, The effects of dietary oregano essential oil and  $\alpha$ -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage, *Meat Science*, 63:1193-1200.
- Bravo L., 1998, Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nutritional Review*, 56: 317-333

- Brett christopher m. A., brett ana maria oliveira, 1994, electrochemistry Principles, methods, and applications, oxford university press, new york
- Buratti S., Benedetti S., Cosio M.S., 2006, Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis, *Talanta*, 71:1387–1392
- Choi J. S., Jung H. Y., Jung H. A., Kim J. E., 2004, Flavonoids and extracts of *Nelumbo nucifera* stamen for the treatment of oxidative stress-caused disorders, patent No. KR2004072146
- Corredor C., Teslova T., Vega C. M., Zhanguo C., Jie Z., Lombardi J. R., Leona M., 2009,
- Cosio M.S., Buratti S., Mannino S., Benedetti S., 2005, Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family, *food chemistry* 97:725-731
- Domínguez X. A., Sánchez H., Suárez M., Baldas J. H., González M. R., 1989, Chemical constituents of *Lippia graveolens*, *Planta Medica*, 55:208-209.
- Dugas Alton J., Castañeda-Acosta José, Bonin Gloria C., Price Kimberly L., Fischer Nikolaus H., Winston Gary W., 2000, *Journal of Natural Products*, 63: 327-331
- Dwyer J., 2006, Starting down the right path: nutrition connections with chronic diseases of later life, *American Journal of Clinical Nutrition*, 83(2S): 415S-420S
- Ghica M. E, Oliveira B. A. M., 2004, Electrochemical Oxidation of Rutin, *electroanalysis*, 17:313-318
- Gomes A., Fernandes E., Garcia M. B., Silva A., Pinto Diana C., Santos C., Cavaleiro J., Lima J., 2008, Cyclic voltammetric analysis of 2-styrylchromones: Relationship with the antioxidant activity, *bioorganic and medicinal chemistry*, 16:7939-7943
- Halliwell B, 1991, Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease, *American Journal of Medicine* 91:14S-22S

- Hilt Petra, Schieber Andreas, Yildirim Caner, Arnold Gabi, Klaiber Iris, Conrad Jrgen, Beifuss Uwe, and Carle Reinhold, 2003, Detection of Phloridzin in Strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC–PDA–MS/MS and NMR Spectroscopy, *Journal of agricultural and food chemistry*, 51:2896-2899
- Janeiro P., Corduneanu O., Oliveira B. A. M., 2004, Chrysin and (±)-Taxifolin Electrochemical Oxidation Mechanisms, *electroanalysis*, 17:1059-1064
- Jurasekova Z., Torreggiani A., Tamba M., Sanchez-Cortes S., Garcia-Ramos J. V., 2009, Raman and Surface-enhanced Raman Scattering (SERS) investigation of the quercetina interaction with metals: Evidence of structural Changing processes in aqueous solution and on metal nanoparticles, *Journal of molecular structure*, 918:129-137
- Korotkova E.I., Karbainov Y.A., Shevchuk A.V., 2002, Study of antioxidant properties by voltammetry, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 518:56–60
- Kreft S., Knapp M., Kreft I., 1999, Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds and determination by capillary electrophoresis, *Journal of Agricultural and Fodd Chemistry*, 47: 4649-4652
- Kreft S., Strukejl B., Gaberscik A., Kreft I., 2002, Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method, *Journal of Experimental Botany*, 53:1801-1804
- Kris-Etherton P.M., Hecker K.O., Bonanome A., Coval S.M., Binkoski A.E., Hilpert K.F., Griel A. E., Etherton T.D., 2002, Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer, *American Journal of Medicine*. 113:71-88
- Lin Long-Ze, Mukhopadhyay S., Robbins R. J., Harnly J. M., 2007, Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20:361–369.

- Lin Xiang-Qin, He Jian-Bo, Zha Zheng-Gen, 2006, Simultaneous determination of quercetin and rutin at a multi-wall carbon-nanotube paste electrodes by reversing differential pulse voltammetry, *Sensors and Actuators B* 119:608–614
- Li-Ping F., Ling Zhang, Ling Zhong, Dong-ju Z., Ling L., 2007, The effect of vitamin E supplementation on oxidative stress and microinflammation state in patients with MHD, *Zhongguo Shiyong Neike Zazhi*, 27:215-217.
- Liu A., Zhang S., Huang L., Cao Y., Yao H., Chen W., and Lin X., 2008, Electrochemical Oxidation of Luteolin at a Glassy Carbon Electrode and Its Application in Pharmaceutical Analysis, *chemical and pharmaceutical bulletin*, 56:745—748
- Liu Xiao-Li, Zhang Hong-Fang, Qiao Guang-Jun, Cao Wei, Zheng Jian-Bin, 2008, Determination of Apigenin by LC with Electrochemical Detection, *chromatographia*, 68:147-150
- Mabbott Gary A., 1983, An introduction to cyclic voltammetry, *Journal of Chemical Education*, 60:697-706
- Martínez-Rocha A., Puga R., Hernández Sandoval L., Loarca Piña G., Mendoza S., 2008, Antioxidant and antimutagenic activities of Mexican oregano (*Lippia graveolens Kunth*), *Plant Foods for Human Nutrition* 63:1-5
- Martinez-Valverde I., periago M. J. y ROS G., 2000, Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50:5-18
- McCullough M. L., Feskanich D., Stampfer M. J., Giovannucci E., Rimm E. B., Hu F. B., Spiegelman D., Hunter D. J., Colditz G. A., Willett W. C., 2002, Diet quality and major chronic disease risk in men and women: moving toward improved dietary guidance, *American Journal of Clinical Nutrition*, 76:1261-1271
- Morello M. J., Shahidi F., Ho C., 2002, Free radicals in foods: chemistry, nutrition, and health effects, ACS Symposium Series 807:1-9

- Morikawa Keiko, Nonaka Mitsuko, Mochizuki Hiromi, Handa Kie, Hanada Haruka, and Hirota Kaori, 2008, Naringenin and Hesperetin Induce Growth Arrest, Apoptosis, and Cytoplasmic Fat Deposit in Human Preadipocytes, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 56:11030-11037
- Mukhopadhyay M., 2000, Natural extracts using supercritical carbon dioxide, p.177, CRC Press., USA
- Nakamura K., Nagata C., Oba S., Takatsuka N., Shimizu H., 2008, Fruit and vegetable intake and mortality from cardiovascular disease are inversely associated in Japanese women but not in men, *Journal of Nutrition*, 138:1129-1134
- Oliveira B. A. M. Ghica M. E., 2003, Electrochemical Oxidation of Quercetin, *electroanalysis*, 15:1745-1750
- Prior R. L., Wu X., Schaich K., 2005, Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53:4290-4302.
- Proestos C., Sereli D., Komaitis M., 2006, Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS, *Food Chemistry* 95:44–52.
- Puel C., Quintin A., Mathey J., Obléd C., Davicco M. J., Lebecque P., Kati-Coulibaly S., Raman and surface-enhanced Raman spectra of chrysin, apigenin and luteolina, *Vibrational spectroscopy*, 49:190-195
- Rastrelli L., Caceres A., Morales C., De Simone F., Aquino R., 1998, Iridoids From *Lippia graveolens*, *Phytochemistry* 49:1829-1832.
- Rice-Evans C., 1999, Antioxidant Food Supplements in Human Health, p. 240, Academic Press, Japan.
- Riley Tom, Watson Arthur, 1987, Polarography and other Voltammetric Methods (Analytical Chemistry by Open Learning), John Wiley & Sons
- Rodrigo R., Prat H., Passalacqua W., Araya J., Baechler J. P., 2008, Decrease in oxidative stress through supplementation of vitamins C and E is associated with a reduction in blood pressure in patients with essential hypertension, *Clinical Science*, 114:625-634

- Romani A., Minunni M., Mulinacci N., Pinelli P., and Vincieri F. F., 2000, Comparison among Differential Pulse Voltammetry, Amperometric Biosensor, and HPLC/DAD Analysis for Polyphenol Determination, *Journal of agricultural and food chemistry* 48:1197-1203
- Salgueiro R. L., Cavaleiro C., Goncalves M. J., Proenca da Cunha A., 2003 Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia Graveolens* from Guatemala, *Planta Médica*, 69:80-83
- Seydim A. C., Sarikus G., 2006, Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils, *Food Research international*, 39:639-644.
- Shao Xi, Bai Naisheng, He Kan, Ho Chi-Tang, Yang Chung S., and Sang Shengmin, 2008, Apple Polyphenols, Phloretin and Phloridzin: New Trapping Agents of Reactive Dicarbonyl Species, *chemical research in toxicology* 21:2042-2050
- Silva V. R., Dunford N. T., 2005, Bioactive Components of Mexican Oregano Oil as Affected by Moisture and Plant Maturity, *Journal of Essential Oil Research*, 17:668-671.
- Soobrattee M.A., Neergheen V.S., Luximon-Ramma A., Aruoma O.I., Bahorun T., 2005, Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions, *Mutation Research*, 579:200–213
- Srinivasan K., Kaul C., Ramarao P., 2005, Partial protective effect of rutin on multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice, *Indian Journal of Pharmacologic*
- Teixeira Susana, Siquet Christophe, Alves Carla, Boal Isabel, Marques M. Paula, Borges Fernanda,, Lima Jose´ L.F.C., Reis Salette, 2005, Structure–property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet, *Free Radical Biology & Medicine*, 39:1099–1108

- Van den Berg R., Haenen G. R. M. M., Van den Berg H., Bast A., 1999, Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for valuation of antioxidant capacity measurements of mixtures, *Food Chemistry*, 66:511-517.
- Wang J., 2000, Analytical electrochemistry, Jhon Wiley and Sons, New York. p. 66
- WEBB Michael R. and Ebeler Susan E., 2004, Comparative analysis of topoisomerase IB inhibition and DNA intercalation by flavonoids and similar compounds: structural determinates of activity, *Biochemical Journal*, 384:527–541
- Wildman R. E. C., 2001, Nutraceuticals and functional foods, CRC Press., USA.
- Willcox J. K., Ash Sarah L., Catignani G. L., 2004, Antioxidants and prevention of chronic disease, *Food Science and Nutrition*, 44:275-295
- Won L. B., Lee J. H., Gal S. W., Moon Y. H., and Park K. H., 2006, Selective ABTS radical-scavenging activity of prenylated flavonoids from *Cudrania tricuspidata*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70:427-432,
- Xing T. L., Wanga F., Maob Y. Y., Wangb L.P. and Yeb B. X., 2009, Electrochemical Behavior of Apigenin at a Glassy Carbon Electrode and its Analytical Application, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 56:303-309
- Yang B., Kotani A., Arai K. and Kusu F., 2001, Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials, *analytical sciences*, 17:599-604
- Zafrilla P., Morillas J., Martínez-Cacha A., Mulero J., Cayuela J. M., Lopez Nicolas J. M., 2002, Free radicals and antioxidants, p. 109, Alcion Ingenieria Quimica, S.A, España.
- Zare Hamid R., Namazian Mansoor, Nasirizadeh Navid, 2005, Electrochemical behavior of quercetin: Experimental and theoretical studies, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 584:77–83
- Zare Hamid R., Sobhani Zahra, Mazloun-Ardakani Mohammad, 2007, Electrocatalytic oxidation of hydroxylamine at a rutin multi-wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode: Improvement of the catalytic activity, *Sensors and Actuators B*, 126:641–647

Zhao Hong, Yakar Shoshana, Gavrilova Oksana, Sun Hui, Zhang Yang, Kim Hyunsook, 2004, Phloridzin Improves Hyperglycemia But Not Hepatic Insulin Resistance in a Transgenic Mouse Model of Type 2 Diabetes, *American diabetes association*, 53:2901-2909