

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE  
EXTRACTOS DE ESPECIES DE *Bursera*, *Matricaria* Y  
*Cymbopogon* MEDIANTE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS.”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

PRESENTA

WENDY ELIZABETH ARRIAGA PÉREZ

DIRIGIDA POR

Dra. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE  
EXTRACTOS DE ESPECIES DE *Bursera*, *Matricaria* Y  
*Cymbopogon* MEDIANTE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS.”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**WENDY ELIZABETH ARRIAGA PÉREZ**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ**

**SINODALES**

**Dra. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DIAZ**  
DIRECTOR

---

**Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ**  
SINODAL

---

**Dra. DORA M. GUTIÉRREZ AVELLA**  
SINODAL

---

**M. en C. FANNY J. GONZÁLEZ FUENTES**  
SINODAL

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por la salud brindada durante mi vida y por haberme permitido crecer en una familia tan bonita.

Agradezco a mi papá José Luis Fco. Arriaga Ortíz que siempre fue un ejemplo a seguir, ¡TE QUIERO PAPA BONITO!, gracias por tu apoyo incondicional y por todo lo que me has ayudado a lo largo de mi vida.

A mi mamá María de la Luz Pérez Licea gracias por todo el apoyo que me has dado siempre, gracias por haberme cuidado y educado, por tus consejos y por todo tu amor... eres la mejor, MIL GRACIAS!!

A mis abuelitos Josefina Pérez Licea y Juan Pérez González por haberme cuidado cuando era peque y por todo su cariño y amor que me han dado siempre.

A mis amiguitos de la generación cuando cursábamos el tronco común uff!! eramos tremendos y todos fuimos a caer en el grupo 2 jajaja.... pero lo importante es que hicieron que mi estancia en la universidad fuera inolvidable....los quiero chicos!! (Edith, Flak, Pau, Zai, Yuli, Alí, Audi, Eder, Paquito, Marco, Charlie, Emma)..... y también gracias Clarita, Pris y Marina. Edith gracias por darme asilo en tu casa los jueves en 3er. Semestre (jajaja) T.Q.M. amigocha!

A mis compañeritos de alimentos... chicas, Anayenci (jajajaa) y Clau me encariñe mucho con ustedes y las voy a extrañar mucho. A Pablo y Yos. Gracias porque aunque eramos poquitos nos la pasamos muy bien.

A Josué Espinoza Cabrera gracias por toda la ayuda, apoyo y por soportarme cuando andaba toda apurada por la tesis, Te Amo!

Gracias a la Dra. Sandra O. Mendoza por ser mi directora de tesis y por permitirme formar parte de su laboratorio.

M.en C. Fanny J. González, por la ayuda proporcionada para la realización de esta tesis, por tu tiempo y por la paciencia, mil gracias!!

A mis sinodales Dra. Minerva Ramos y Dra. Dora M. Gutiérrez por todas sus observaciones y comentarios hechos a mi trabajo, que me ayudaron a mejorar el mismo.

Gracias!!

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1. Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y sus efectos nocivos	3
II.2. Compuestos nutracéuticos	3
II.3. Antioxidantes	4
II.3.1. Clasificación de antioxidantes	4
II.3.2. Antioxidantes naturales vs antioxidantes sintéticos	5
II.3.3. Relación estructura - actividad antioxidante	8
II.4. Antioxidantes en plantas	10
II.4.1. Familia Burseraceae	12
II.4.2. Antioxidantes en té	15
II.4.2.1. Manzanilla ( <i>Matricaria chamomilla</i> )	16
II.4.2.2. Hierba de limón ( <i>Cymbopogon citratus</i> )	18
II.5. Técnicas para la determinación de capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	23
II.5.1. Técnicas convencionales	23
II.5.2. Técnicas electroquímicas	27
II.5.2.1. Voltamperometría cíclica (VC)	28
II.5.2.2. Técnicas voltamperométricas de pulso (VDP)	31
II.5.2.2.1. Voltamperometría diferencial de pulso (VDP)	31

II.5.3. Comparación entre técnicas convencionales y técnicas electroquímicas	32
III. HIPÓTESIS	33
IV. OBJETIVOS	34
IV.1. Objetivo General	34
IV.2. Objetivos específicos	34
V. METODOLOGÍA	35
V.1. Materiales	35
V.2. Métodos	35
V.2.1. Preparación de las muestras	35
V.2.2. Análisis electroquímico	36
V.2.2.1. Preparación de solución amortiguadora Sørensen	36
V.2.2.2. Voltamperometría cíclica (VC)	36
V.2.2.3. Voltamperometría diferencial de pulso (VDP)	37
VI. RESULTADOS	38
VI.1. Voltamperometría cíclica (VC)	38
VI.1.1. <i>Bursera bipinnata</i>	38
VI.1.2. <i>Bursera copallifera</i>	40
VI.1.3. <i>Bursera simaruba</i>	43
VI.1.4. <i>Cymbopogon citratus</i>	45
VI.1.5. <i>Matricaria chamomilla</i>	46
VI.2. Voltamperometría diferencial de pulsos (VDP)	47
VI.2.1. <i>Bursera bipinnata</i>	47
VI.2.2. <i>Busera copallifera</i>	48
VI.2.3. <i>Bursera simaruba</i>	49
VI.2.4. <i>Cymbopogon citratus</i>	51
VI.2.5. <i>Matricaria chamomilla</i>	51
VII. DISCUSIÓN	53

VIII. CONCLUSIONES	58
IX. BIBLIOGRAFÍA	59

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Comparación entre los antioxidantes naturales y sintéticos	6
2	Extractos de plantas con actividad antioxidante	11
3	Estructuras químicas de compuestos aislados en especies del género <i>Bursera</i>	13
4	Concentración de ácidos fenólicos y flavonoides y sus productos de oxidación en té verde y té negro	17
5	Contenido de flavonoides, ácido cafeico y clorogénico en extractos de <i>C. citratus</i> en % peso/peso, rendimientos en términos de materia seca inicial	21
6	Resumen de capacidad antioxidante de aceites de tomillo, romero, mejorana, hierba de limón, orégano y artemisia, medida por cinco métodos	22
7	Ventajas y desventajas de métodos para la determinación de capacidad antioxidante y fenólicos	25
8	Características de las técnicas potencioestáticas	28
9	Potenciales de reducción de radicales flavonoides	29
10	Determinación de la concentración de polifenoles en extractos naturales por HPLC/DAD y VDP	32
11	Listado de muestras	35
12	Señales obtenidas por voltamperometría cíclica en extractos de <i>Bursera bipinnata</i>	39
13	Señales obtenidas por voltamperometría cíclica en extractos de <i>Bursera copallifera</i>	42
14	Señales obtenidas por voltamperometría cíclica en extractos de <i>Bursera simaruba</i>	45

15	Señales obtenidas por voltamperometría cíclica en extracto metanólico de <i>Cymbopogon citratus</i>	46
16	Señales obtenidas por voltamperometría cíclica en extracto acuoso de <i>Matricaria chamomilla</i>	47
17	Señales obtenidas por voltamperometría diferencial de pulsos en extractos de <i>Bursera bipinnata</i>	48
18	Señales obtenidas por voltamperometría diferencial de pulsos en extractos de <i>Bursera copallifera</i>	48
19	Señales obtenidas por voltamperometría diferencial de pulsos en extractos de <i>Bursera simaruba</i>	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Clasificación de los compuestos fenólicos de acuerdo a su estructura química	7
2	Estructura genérica de los flavonoides	8
3	Relación actividad antioxidante-estructura de flavonoides	9
4	Estructura química de quercetina, morina y baicaleína	10
5	Estructuras de compuestos detectados en aceite esencial de <i>C.citratu</i> s	19
6	Compuestos aislados del extracto polar de <i>C. citratu</i> s	20
7	Voltamperograma cíclico del té verdé, té oolong, té negro y respuesta del blanco.	30
8	Esquema del equipo electroquímico	37
9	Voltamperograma cíclico del extracto metanólico de <i>Bursera bipinnata</i>	38
10	Voltamperograma cíclico del extracto MeOH-H <sub>2</sub> O (7:3) de <i>Bursera bipinnata</i>	39
11	Voltamperograma cíclico del extracto hexánico de <i>Bursera bipinnata</i>	40
12	Voltamperograma cíclico del extracto MeOH-H <sub>2</sub> O (7:3) y MeOH de <i>Bursera copallifera</i>	41
13	Voltamperograma cíclico del extracto hexánico de <i>Bursera copallifera</i>	42
14	Voltamperograma cíclico del extracto metanólico de <i>Bursera simaruba</i>	43
15	Voltamperograma cíclico del extracto acuoso de <i>Bursera simaruba</i>	44

16	Voltamperograma cíclico del extracto metanólico de <i>Cymbopogon citratus</i>	45
17	Voltamperograma cíclico del extracto acuoso de <i>Matricaria chamomilla</i>	46
18	Voltamperograma diferencial de pulsos del extracto MeOH y MeOH-H <sub>2</sub> O (7:3) de <i>Bursera bipinnata</i>	47
19	Voltamperograma diferencial de pulsos del extracto MeOH y MeOH-H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O (7:3) de <i>Bursera copallifera</i>	49
20	Voltamperograma diferencial de pulsos de los extractos metanólico y acuoso de <i>Bursera simaruba</i>	50
21	Voltamperograma diferencial de pulsos del extracto metanólico de <i>Cymbopogon citratus</i>	51
22	Voltamperograma diferencial de pulsos del extracto acuoso de <i>Matricaria chamomilla</i>	52
23	Estructura química del 5,6, 3',4'-tetrahidroxi-flavanol	54
24	Principales flavonoides presentes en el extracto acuoso de <i>Matricaria chamomilla</i> .	56

## RESUMEN

La generación descontrolada de radicales libres, como las especies reactivas de oxígeno (ERO) en el organismo provoca el estrés oxidativo el cual genera enfermedades crónico-degenerativas como diabetes, enfermedad de Parkinson, cáncer, arterosclerosis. Los antioxidantes consumidos en la dieta pueden actuar contra las ROS y otros radicales. La capacidad antioxidante en extractos de plantas, ha sido analizada por medio de técnicas convencionales como las espectrofotométricas, sin embargo las técnicas electroquímicas también pueden ser útiles para el desarrollo de dicho análisis a un bajo costo, mayor simplicidad y rapidez. Extractos de *Bursera simaruba*, *Bursera bipinnata*, *Bursera copallifera*, *Cymbopogon citratus* y *Matricaria chamomilla* fueron analizados por medio de Voltamperometría Cíclica (VC), y Voltamperometría Diferencial de pulso (VDP) a fin de conocer su capacidad antioxidante. Se utilizó un sistema de celda electroquímica con tres electrodos empleando carbón vítreo como electrodo de trabajo, Ag/AgCl como electrodo de referencia y platino como electrodo auxiliar. La solución electrolítica empleada para las muestras fue una solución amortiguadora Sørensen a pH 7. En la VC la velocidad de barrido fue de 100 mV/s y para VDP se aplicó una amplitud de pulso de 70 mV y una velocidad de barrido de 5 mV/s. Los voltamperogramas cíclicos mostraron un comportamiento irreversible para todos los extractos analizados. Mientras que por VDP, los extractos metanólicos y acuosos de las especies analizadas presentaron señales a bajos potenciales lo cual se traduce en una elevada capacidad antioxidante.

## **I. INTRODUCCIÓN.**

En el organismo normalmente se generan radicales libres, los cuales a bajos niveles no producen efectos nocivos a la salud debido a que son neutralizados por los antioxidantes endógenos (enzimas) o a los provenientes de los alimentos. Sin embargo, cuando hay un desequilibrio por la producción de radicales libres de manera descontrolada, se generan enfermedades crónico-degenerativas. A dicho desequilibrio se le conoce como estrés oxidativo el cual está asociado a la presencia de especies reactivas al oxígeno (ERO) y otros radicales libres. Diversas enfermedades crónico-degenerativas, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, etc., están asociadas a la presencia del estrés oxidativo. Una mala alimentación, humo, radiaciones, entre otros factores pueden contribuir a una elevada generación de radicales libres.

Los antioxidantes naturales han cobrado importancia debido a que se ha observado que los sintéticos generan efectos nocivos a la salud ya que muchos de éstos son cancerígenos o mutagénicos. Los antioxidantes naturales son de amplia ubicuidad ya que están presentes en plantas, hongos y microorganismos. Los compuestos fenólicos son los principales antioxidantes naturales y se caracterizan por tener un anillo aromático y uno bencénico, con uno o más sustituyentes hidroxilo y pueden clasificarse de acuerdo a su estructura química básica. El grupo más importante de los compuestos fenólicos son los flavonoides, los cuales, son considerados antioxidantes ya que tienen la capacidad de actuar como donadores de electrones.

La estructura química del compuesto fenólico determinará si tendrá mayor o menor capacidad antioxidante. La presencia en la estructura de un anillo aromático que contenga sustituyentes capaces de donar electrones determinará su capacidad antioxidante. Así, los flavonoides como la quercetina deben su elevada capacidad antioxidante a su estructura química.

Se han realizado estudios espectrofotométricos y cromatográficos en diferentes extractos de plantas a fin de conocer los compuestos y la capacidad antioxidante que éstas presentan.

La familia Burseraceae comprende 16 géneros y 500 especies que incluyen arbustos y árboles tropicales. El género *Bursera* es de los más representativos ya que es de gran importancia en la medicina tradicional, debido a que contienen triterpenos, bilignanos y flavonoides, los cuales pueden conferirle capacidad antioxidante.

En el marco de un proyecto de redes se determinó la contribución de la evaluación del comportamiento electroquímico de los extractos de especies de *Bursera*.

Por otro lado, infusiones tanto de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) como de hierba de limón (*Cymbopogon citratus*), son utilizadas ampliamente en la medicina tradicional debido a sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, entre otras.

Algunas de las técnicas convencionales para la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* incluyen: capacidad para absorber el radical oxígeno (ORAC), poder antioxidante reductor de fierro (FRAP), Folin-Ciocalteu (F-C), 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DDPH), quimioluminiscencia (CL); sin embargo, la introducción de nuevas técnicas, como las electroquímicas, pueden representar una alternativa interesante, debido a que son rápidas, sencillas y de bajo costo.

Algunas técnicas electroquímicas de potencial controlado como lo son la voltamperometría cíclica (VC) y la voltamperometría diferencial de pulso (VDP), son empleadas para la evaluación de la capacidad antioxidante, donde una señal de oxidación a un potencial bajo significa un alto poder antioxidante. Mediante VC es posible conocer el comportamiento redox de la especie en estudio. Se ha realizado el análisis de compuestos fenólicos por medio de VC, sin embargo, es importante el uso de VDP debido a su mayor sensibilidad.

## **II. ANTECEDENTES.**

### **II.1. Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y sus efectos nocivos**

Un radical libre es definido como átomos o compuestos que tienen al menos un electrón desapareado.

El oxígeno es muy importante cuando se habla de reacciones de radicales libres y genera las sustancias conocidas como "especies reactivas de oxígeno" (ERO) (Morello y col., 2002). Bajos niveles de antioxidantes en el cuerpo pueden resultar en altos niveles de ERO, las cuales causan estrés oxidativo, resultando en la muerte celular, e induciendo muchas enfermedades entre las que se incluyen, enfermedades del corazón, cataratas, trastornos congestivos y cáncer (Liu y Nair, 2010). En el caso de este último, el estrés oxidativo puede ser el factor más importante que causa daño al ADN que eventualmente puede conducir a mutaciones. El cáncer es una enfermedad en la cual hay una anormal y alta proliferación de células mutadas (Wolfe y Hai, 2008).

La mayoría de los organismos vivos poseen sistemas de defensa enzimáticos y no enzimáticos, contra la excesiva producción de ERO. Sin embargo, factores externos (humo, dieta, alcohol, drogas) y el envejecimiento disminuye la capacidad de tales sistemas protectores (Pietta y col., 1998). Esto se comprueba en personas fumadoras, las cuales inhalan grandes cantidades de radicales libres, debido a que el alquitrán de los cigarrillos contiene más de 1017 radicales estables que se generan durante el proceso de combustión (Duthie, 1999).

### **II.2. Compuestos nutraceuticos**

Son sustancias químicas encontradas como un componente natural del alimento que son benéficas al cuerpo humano en la prevención o tratamiento de enfermedades o en la mejora del rendimiento fisiológico. Los nutrientes esenciales pueden considerarse nutraceuticos ya que proveen beneficios, además de su función esencial en el crecimiento o mantenimiento del cuerpo humano. Los flavonoides son una extensa categoría de compuestos producidos por plantas y muchos parecen tener un potencial nutraceutico debido a que reducen los niveles

de colesterol en sangre, reducen la aparición de osteoporosis y cáncer, así como quizá el aumento de la capacidad antioxidante (Wildman, 2001). Son metabolitos secundarios, los cuales no tienen una función directa en las principales actividades bioquímicas que soportan el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas (Conn, 1981).

### II.3. Antioxidantes

La función principal de los antioxidantes es prevenir o inhibir la degradación inducida por los radicales libres (Morello y col., 2002).

Las características requeridas para que las moléculas antioxidantes sean efectivas incluyen las siguientes propiedades estructurales (Rice-Evans, 1999):

- Presencia de un sustituyente donador de hidrógeno/electrón con un apropiado potencial de reducción, en relación a aquellos de los pares redox de los radicales para ser atrapados.
- Habilidad para deslocalizar el radical resultante.

#### II.3.1. Clasificación de antioxidantes

Principalmente hay cinco tipos de antioxidantes, los cuales se describen a continuación (Mukhopadhyay, 2000):

- a) Antioxidantes primarios.- son compuestos, principalmente sustancias fenólicas, que terminan con las cadenas de radicales libres en oxidación de lípidos y funcionan como donadores de electrones, por ejemplo: tocoferoles, butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroquinona (TBHQ), etc.
- b) Secuestradores de oxígeno.- Son sustancias que reaccionan con el oxígeno y lo remueven, por ejemplo: ácido ascórbico (vitamina C), palminato de ascorbilo, ácido eritórbico, etc.

- c) Antioxidantes secundarios.- Son compuestos que funcionan descomponiendo los hidroperóxidos lipídicos en productos finales estables.
- d) Antioxidantes enzimáticos.- Son enzimas que funcionan removiendo el oxígeno disuelto (glucosa oxidasa) o por remoción de especies altamente oxidativas (superóxido dismutasa).
- e) Agentes quelantes.- Son sustancias que forman complejos con iones de metales pesados, es decir, atrapan al metal formando un anillo alrededor de este. Con ello se logra la estabilización del ion. Ayudan a mejorar en gran manera la acción de los antioxidantes fenólicos. La mayoría de estos tienen poca o ninguna actividad, por ejemplo: ácido cítrico, aminoácidos y fosfolípidos como cefalina.

### II.3.2. Antioxidantes naturales vs antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes también pueden clasificarse en naturales o sintéticos, estando estos últimos en desuso debido a estudios que les atribuyen efectos carcinogénicos (Martínez-Valverde y col., 2000). En este contexto, los antioxidantes naturales parecen ser más seguros que los sintéticos. Aunado a esto, en las últimas décadas, varios estudios epidemiológicos han demostrado que una ingesta de alimentos ricos en antioxidantes naturales se correlaciona con una reducción en el riesgo de la enfermedad cardiaca coronaria (Pokorny y col., 2001). Los carotenoides y los compuestos fenólicos son los principales antioxidantes dietarios (Shahidi y Ho, 2007).

Las ventajas y desventajas de los antioxidantes naturales y sintéticos se resumen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Comparación entre los antioxidantes naturales y sintéticos (Pokorny y col., 2001)

Antioxidantes sintéticos	Antioxidantes naturales
Económico	Costoso
Aplicación extensa	Uso restringido para algunos productos
Actividad antioxidante media a alta	Amplia actividad antioxidante
Creciente preocupación en su seguridad	Percibidas como sustancias inocuas
Restricción en su uso	Incremento en su uso y ampliación de aplicaciones
Baja solubilidad en agua	Soluble en un amplio rango de solventes
Disminución de interés	Aumento de interés

Los antioxidantes naturales se encuentran presentes en casi todas las plantas, microorganismos, hongos e incluso en tejidos animales. La mayoría de los antioxidantes naturales son compuestos fenólicos y los mas importantes entre ellos son los flavonoides, tocoferoles y ácidos fenólicos (Pokorny y col., 2001).

Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias químicas que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidróxilos incluyendo derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.). La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. En la Figura 1 se muestra la clasificación de los compuestos fenólicos de acuerdo a su estructura química básica, en la cual los flavonoides son el grupo más importante, dividiéndose en varias subclases con más de 5000 compuestos (Martínez-Valverde y col., 2000).

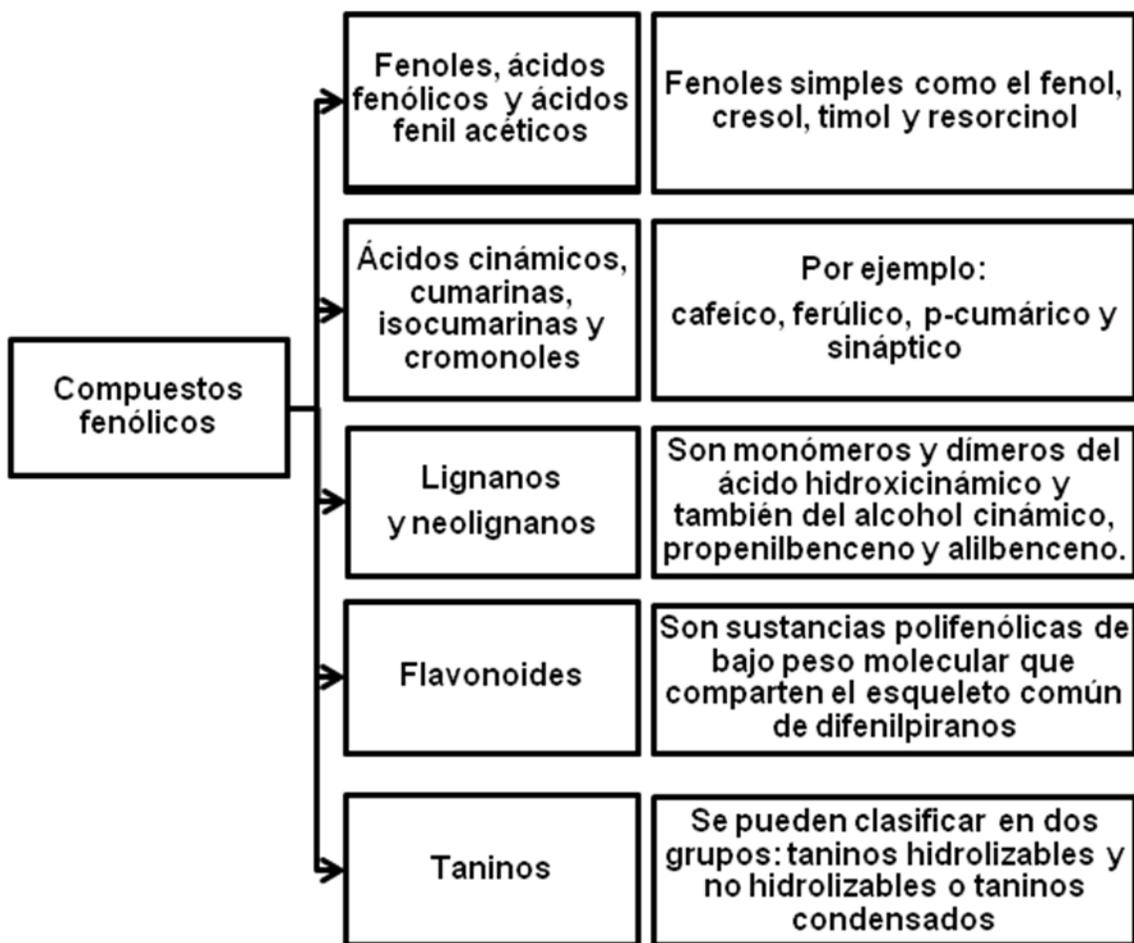


Figura 1. Clasificación de los compuestos fenólicos de acuerdo a su estructura química (Martínez-Valverde y col., 2000).

Los flavonoides se caracterizan por la estructura C6-C3-C6 (Figura 2). La estructura base de estos compuestos consiste en dos anillos aromáticos enlazados por una cadena de tres carbonos alifáticos que normalmente ha sido condensada para formar un pirano o menos común, un anillo furano.

Los flavonoides están presentes en frutas, hortalizas de hojas verdes, raíces, bulbos tubérculos, hierbas, especias, legumbres, té, café, cacao, chocolate y vino tinto. Se pueden clasificar en siete grupos: flavonas, flavanonas, flavonoles, flavanololes, isoflavonas, flavanoles (catequinas) y antocianidinas.

Casi todos los flavonoides poseen diversas propiedades biológicas y químicas comunes: (a) la actividad antioxidante, (b) la capacidad para atrapar ERO, (c) la capacidad de atrapar electrófilos, (d) la capacidad de inhibir nitrosación, (e) la capacidad de quelar metales, (f) el potencial de producir peróxido de hidrógeno en presencia de ciertos metales y (g) la capacidad de modular ciertas actividades de las enzimas celulares (Shahidi y Ho, 2007).

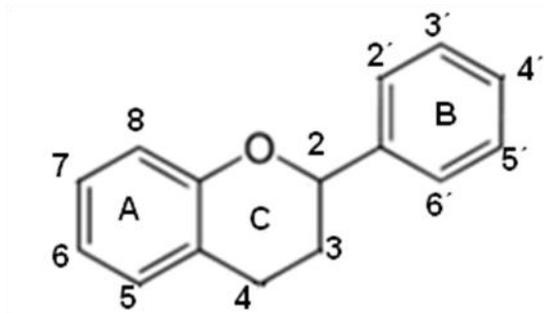


Figura 2. Estructura genérica de los flavonoides (Wolfe y Hai, 2008).

Algunos de los flavonoides más comunes son apigenina, crisina, luteolina, datiscetina, quercetina, miricetina, morina y kaemferol. Aproximadamente el 90% de los flavonoides en plantas están presentes como glicósidos (Pokorny y col., 2001).

### II.3.3. Relación estructura - actividad antioxidante

Las propiedades de los flavonoides para donar electrones y/o hidrógenos han sido la base de su acción antioxidante. En la mayoría de los flavonoides la parte de la molécula con mayor eficiencia en las propiedades de donación de electrones es el anillo B. Por lo tanto, la actividad antioxidante de los flavonoides como donadores de electrones y/o hidrógeno se relaciona al potencial de reducción y a la reactividad de los grupos hidroxilo sustituyentes (Rice-Evans, 1999). En general

hay tres grupos estructurales determinantes para el secuestro de radicales libres y/o potencial antioxidante de flavonoides: (Figura 3) (a) una fracción catecol en el anillo B, (b) un grupo cetónico  $\alpha,\beta$ -insaturado en el anillo C y (c) la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 3 y 5 (Pokorny y col., 2001).

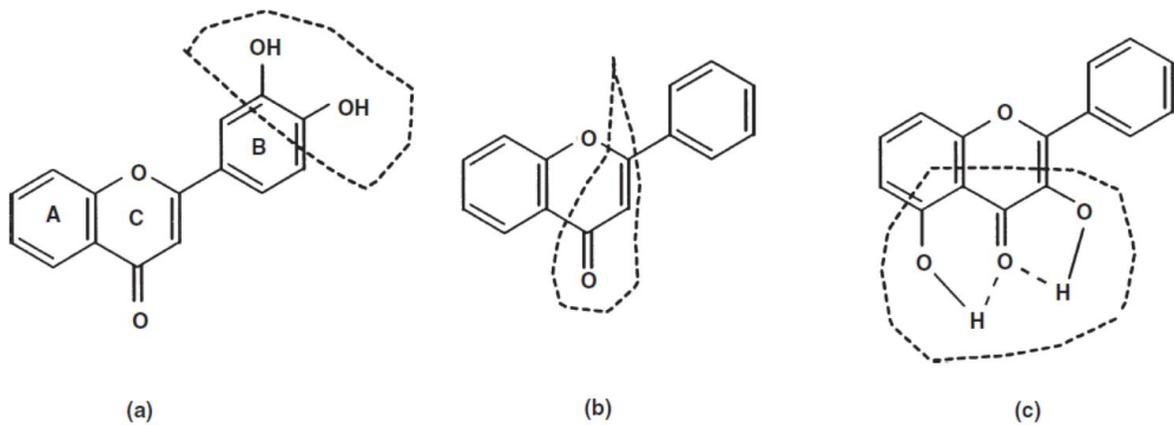


Figura 3. Relación actividad antioxidante-estructura de flavonoides (Pokorny y col., 2001).

Químicamente, un fenol no sustituido es prácticamente inactivo. La sustitución del anillo fenólico con grupos alquil incrementa la densidad de electrones y aumenta la reactividad con aceptores de electrones (Rice-Evans, 1999).

Diferentes flavonoides como la quercetina, morina, y baicaleína (Figura 4) fueron identificados como antioxidantes fuertes. Se sugiere que la estructura cetónica no saturada del anillo pirona (anillo C), un grupo hidroxilo libre en la posición 3, y el grupo catecol del anillo B contribuyen a la actividad antioxidante de la quercetina (Figura 4a) (Patil y col., 2009).

Se ha encontrado que compuestos fenólicos con grupos *orto* o *para*-difenoil tienen potenciales de oxidación electroquímico más bajos que compuestos con *meta*-difenoles o fenoles aislados (Kilmartin y col., 2001).

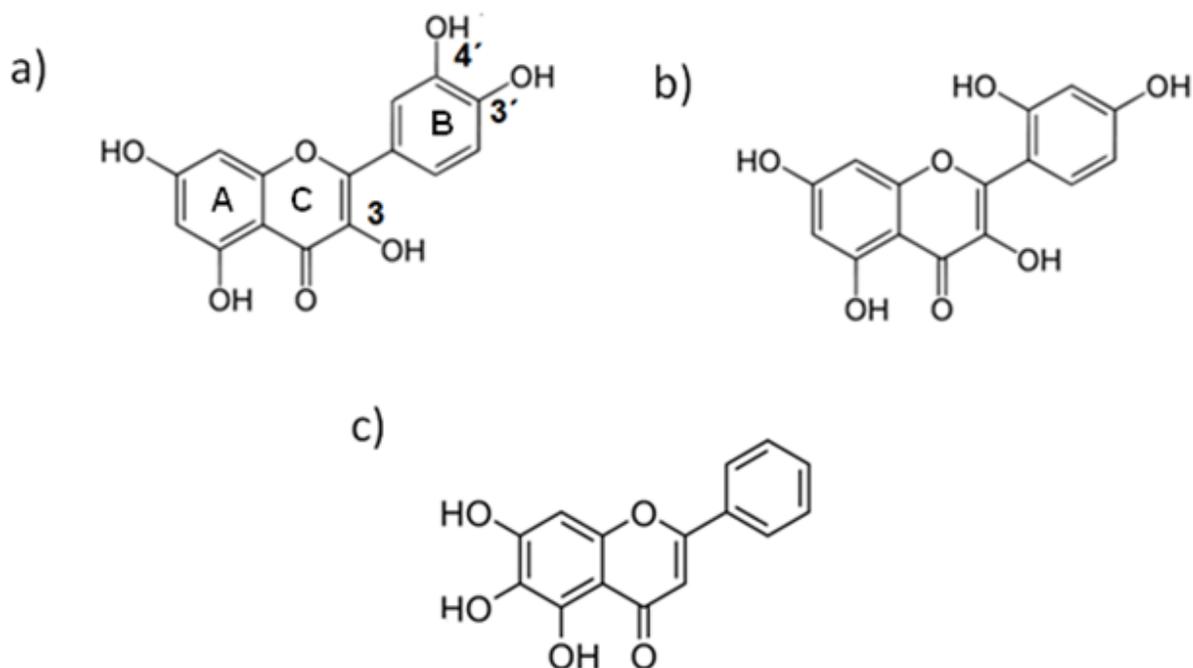


Figura 4. Estructura química de a) quercetina b) morina y c) baicaleína.

#### II.4. Antioxidantes en plantas

En los últimos años, diversas plantas medicinales han sido investigadas por su actividad contra ERO específicas. La capacidad para atrapar estas se ha evaluado utilizando diferentes técnicas basadas en espectrofotometría, quimioluminiscencia y cromatografía (Cuadro 2) (Pietta y col., 1998).

Estudios recientes indican que el uso de los extractos de plantas es más efectivo, conveniente y seguro que usar la planta entera (Mukhopadhyay, 2000).

Cuadro 2 Extractos de plantas con actividad antioxidante (Pietta y col., 1998).

Especie	% Componente(s) de referencia	Método	
<i>Crataegus m.</i>	1.8% vitexina 2''-O-ramnósido	HPLC (Pietta, 1998)	
<i>Camellia sinensis</i> (té verde)	70% catequina	HPLC (Pietta y col., 1998a)	
<i>Cynara scolymus</i> (alcachofa)	14% derivados ácido cafeíco, como ácido clorogénico	CE (Pietta y col., 1998b)	
<i>Echinacea purpurea</i>	4.5% equinacósido	CE (Pietta y col., 1998b)	
<i>Eleutherococcus s.</i>	1.5% eleuterósido B	CE (Pietta y col., 1994)	
<i>Ginkgo biloba</i>	11-24% flavon glicósidos	HPLC (Pietta, 1998)	
<i>Hamamelis virg</i>	16.7% taninos como hamamelitanino	Espectrofotométrico (Markham y col., 1998)	
<i>Melilotus off</i> (trébol de olor)	17.9% cumarina	Espectrofotométrico (Markham y col., 1998)	
<i>Vaccinium myrtillus</i> (arándano)	25% antocianinas	HPLC (Gao. y col., 1994)	
<i>Vitis vinifera</i> (uva)	Semilla	39.6% flavanoles totales	Espectrofotométrico (Simonetti y col., 1997)
	Cáscara	40% fenoles totales	
<i>Passiflora incarnata</i>	4% isovitexina	HPLC (Pietta, 1998)	
<i>Panax ginseng</i>	15% ginsenósidos	HPLC (Pietta y col., 1986)	

Otro ejemplo de extracto con capacidad antioxidante es el de *Larrea divaricata* cuyo principal constituyente del exudado resinoso es el ácido nordihidroguaiarético (NDGA) 44, que fue uno de los primeros antioxidantes fenólicos permitidos para la estabilización de las grasas y aceites comestibles (Pokorny y col., 2001).

#### II.4.1. Familia Burseraceae

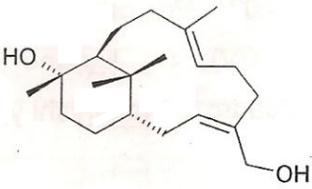
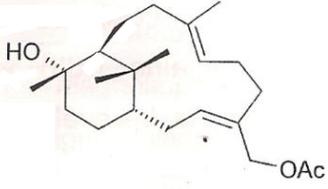
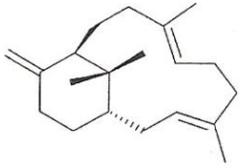
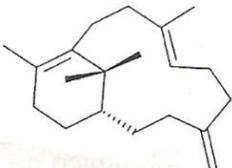
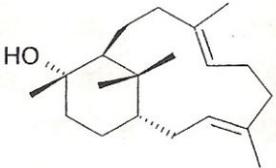
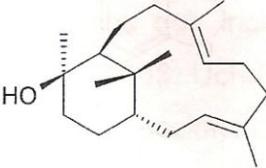
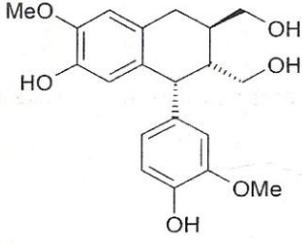
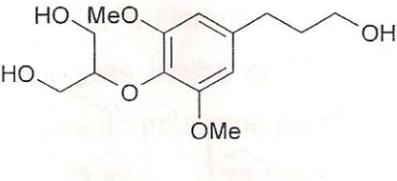
El género *Bursera* (Burseraceae) comprende alrededor de un centenar de especies de árboles cuya distribución se extiende desde el extremo sur de los Estados Unidos de Norteamérica, hasta Venezuela, Perú y el Sur de Brasil. El mayor número de especies de este género se concentra en México, en donde se encuentran más de 100 especies distribuidas principalmente en la gran Depresión del Río Balsas, que comprende una parte importante de los estados de Oaxaca, Puebla, Morelos, México y Michoacán (Campos, 2006).

Muchas plantas del género *Bursera* (Burseraceae) son de importancia en la medicina tradicional, y tiene varios usos domésticos en la región central de México, donde cerca de 70 especies son endémicas y aproximadamente 18 crecen abundantemente (Hernández y col., 2005). Especies de la familia *Burseraceae* deben su valor económico a los aceites esenciales, terpenos, esteroides y a los lignanos en sus resinas (Peraza y col., 1995)

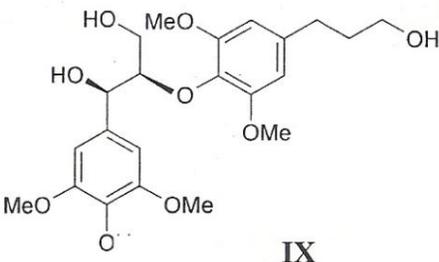
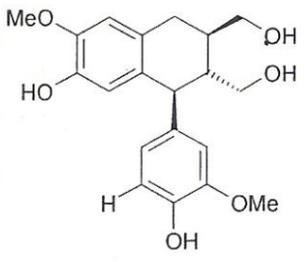
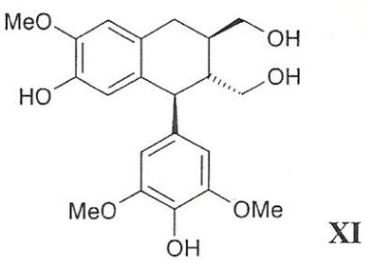
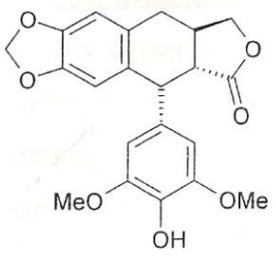
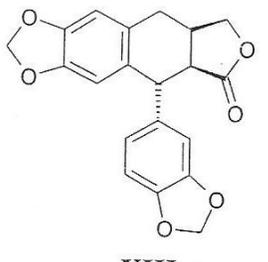
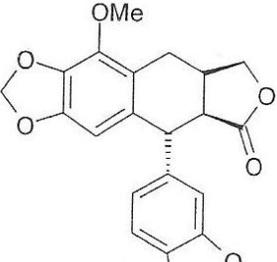
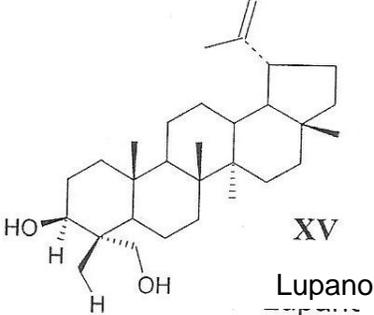
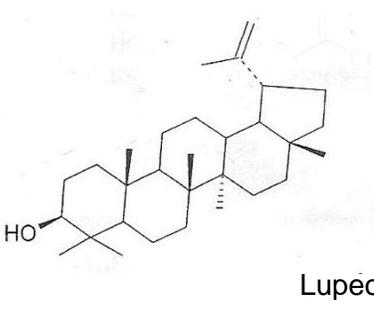
*Bursera simaruba* es un árbol originario de México y habita en climas cálido, semicálido y templado. Sus ramas, la flor, el fruto y la resina se usan con fines medicinales por sus propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, entre otras. Esta especie también se ha utilizado como afrodisíaca, diaforética, diurética, expectorante, purgativa, galactogoga, antiséptica y repelente de insectos (Campos, 2006).

Estudios fitoquímicos de diferentes especies del género *Bursera* han permitido el aislamiento de triterpenos, bilignanos y flavonoides (Cuadro 3) (Peraza y Peña, 1992). Durante el proceso de aislamiento, se obtuvieron en forma pura los triterpenos lupeol, epilupeol, epiglutinol,  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina (Peraza y col., 1995).

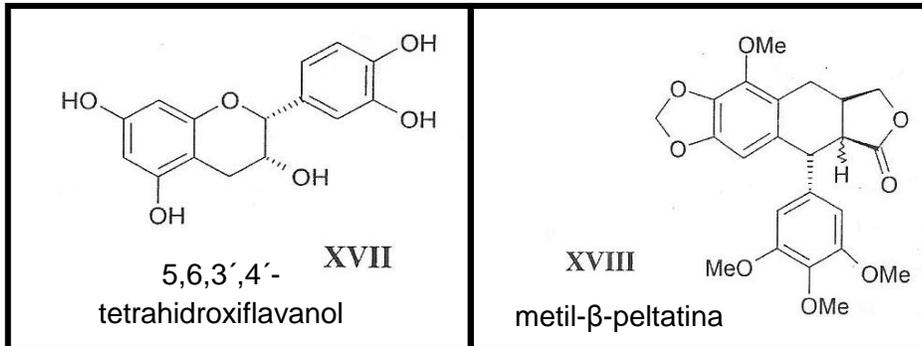
Cuadro 3. Estructuras químicas de compuestos aislados en especies del género *Bursera* (Campos, 2006).

 <p style="text-align: center;"><b>I</b></p> <p style="text-align: center;">(+)-verticilan-3,7-dien-12,20-diol</p>	 <p style="text-align: center;"><b>II</b></p> <p style="text-align: center;">20 acetato (+)-verticilan-3,7-dien-12,20-diol</p>
 <p style="text-align: center;"><b>III</b></p> <p style="text-align: center;">(+)-verticilan-3,7,12(18)-trieno</p>	 <p style="text-align: center;"><b>IV</b></p> <p style="text-align: center;">(-)-verticilan-4(20),7,11-trieno</p>
 <p style="text-align: center;"><b>V</b></p> <p style="text-align: center;">(1S,3E,7E,11S,12S)-(+)-verticilan-3,7-dien-12-ol</p>	 <p style="text-align: center;"><b>VI</b></p> <p style="text-align: center;">(1S,3E,7E,11S,12R)-(+)-verticilan-3,7-dien-12-ol</p>
 <p style="text-align: center;"><b>VII</b></p> <p style="text-align: center;">Burselignano</p>	 <p style="text-align: center;"><b>VIII</b></p> <p style="text-align: center;">Bursefenilpropano</p>

Cuadro 3. (Continuación). Estructuras químicas de compuestos aislados en especies del género *Bursera* (Campos, 2006).

 <p style="text-align: center;"><b>IX</b> Burseneolignano</p>	 <p style="text-align: center;"><b>X</b> (+)-isolariciresinol</p>
 <p style="text-align: center;"><b>XI</b> 5-metoxi-(+)-isolariciresinol</p>	 <p style="text-align: center;"><b>XII</b> 4'-dimetildeso-podofilotoxina</p>
 <p style="text-align: center;"><b>XIII</b> Picropoligamaína</p>	 <p style="text-align: center;"><b>XIV</b> Burseranina</p>
 <p style="text-align: center;"><b>XV</b> Lupano</p>	 <p style="text-align: center;"><b>XVI</b> Lupeol</p>

Cuadro 3. (Continuación). Estructuras químicas de compuestos aislados en especies del género *Bursera* (Campos, 2006).



En la medicina tradicional, la infusión de la corteza de *B. simaruba* se utiliza para adelgazar o en el tratamiento de úlceras estomacales; sin embargo, el proceso de ebullición provoca la liberación de taninos que pueden tener efectos tóxicos (Campos, 2006).

#### II.4.2. Antioxidantes en té

Después del agua, el té es la segunda bebida más consumida en el mundo. El consumo mundial per cápita estimado es alrededor de 0.12 L/día (Wildman, 2001).

La infusión del arbusto *Camellia sinensis* (denominado “la planta del té”) se prepara a partir de las hojas de esta planta. La mayoría de los té s pueden clasificarse en tres tipos: té negro, té oolong y té verde; esta clasificación depende del grado de oxidación y el proceso al que se someten sus hojas (Chen y col., 2007). Una fermentación más completa para el té negro produce una gama de teaflavinas y tearubiginas (Roginsky y col., 2003).

Las hojas de té verde pueden contener 35% de su peso seco en polifenoles que son principalmente flavonoles como la catequina, epicatequina, epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) y epigallocatequina galato (EGCG) (Duthie, 1999; Wildman, 2001).

Además, el té verde contiene quercetina, kaempferol, miricetina, y sus glicósidos, glicósidos de apigenina, y lignanos, pero en baja concentración (Wildman, 2001)(Cuadro 4).

Estos compuestos han mostrado potencial actividad antioxidante a través de su capacidad para reaccionar con las especies reactivas de oxígeno y quelar iones metálicos en los distintos análisis *in vitro* (Roginsky y col., 2003).

#### II.4.2.1. Manzanilla (*Matricaria chamomilla*)

Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) ha sido una de las plantas medicinales más utilizadas y bien conocida desde hace siglos. En la medicina tradicional, se utiliza para tratar heridas, úlceras, eczemas, gota, irritaciones de la piel, neuralgias, ciática, dolores reumáticos, hemorroides, mastitis y otras enfermedades.

En los últimos años, la manzanilla se ha hecho cada vez más popular en su forma de té. Su consumo es de más de 1 millón de tazas al día. La manzanilla en forma de extracto acuoso, se ha utilizado frecuentemente como un sedante suave para calmar los nervios y reducir la ansiedad, tratar la histeria, pesadillas, insomnio y otros problemas del sueño. Se ha valorado como un relajante digestivo y se ha utilizado para tratar diversos trastornos gastrointestinales, como flatulencia, indigestión, diarrea, anorexia, mareos, náuseas y vómitos. La manzanilla presenta otras propiedades tales como antiulcerosas, antibacterianas, antimicóticas.

El aceite esencial de la manzanilla se utiliza también como tratamiento para la malaria y las infecciones por helmintos, cistitis, los resfriados y la gripe. La cantidad de investigaciones sobre la utilidad de la manzanilla sigue aumentando debido a sus actividades biológicas reportadas, que parecen estar relacionados con su contenido de varias clases de compuestos bioactivos.

El extracto acuoso de flores de manzanilla contiene aproximadamente el 1,2% de apigenina y 0,5% de aceites esenciales. Otros componentes importantes de las flores incluyen varios compuestos fenólicos, principalmente los flavonoides apigenina, quercetina y patuletina como glucósidos y diversos derivados acetilados.

Cuadro 4. Concentración de ácidos fenólicos y flavonoides y sus productos de oxidación en té verde y té negro (Wildman, 2001).

Subclase de flavonoides	Compuesto	Cantidad (mg/g)	
		Té verde	Té negro
Flavonoles		50-100	60-80
	Quercetina		10-20
	Kaempferol	20-45	14-16
	Miricetina		2-5
Flavanoles		300-400	50-100
	Catequina	10-20	5
	Epicatequina	10-50	10-20
	Epigallocatequina (EGC)	30-100	10-20
	Galocatequina	10-30	
	Epicatequina galato (ECG)	30-100	30-40
	Epigallocatequina galato (EGCG)	70-150	40-50
Flavandioles		20-30	
Ácidos fenólicos		30-50	100-120
Teaflavinas			30-60
Tearubiginas			300-600

Los principales componentes del aceite esencial extraído de las flores de manzanilla son los terpenoides  $\alpha$ -bisabolol y su óxido, azulenos, incluyendo chamazuleno y derivados acetileno.

Estudios destinados a evaluar los principales componentes presentes en la manzanilla confirman que la apigenina es un componente importante y que posee actividad contra el cáncer de próstata (Srivastava y Gupta, 2007).

#### II.4.2.2. Hierba de limón (*Cymbopogon citratus*)

*Cymbopogon citratus*, también conocido como hierba de limón, se utiliza ampliamente como un ingrediente esencial en la cocina asiática debido a su fuerte sabor a limón. En la India, un té preparado con hierba de limón se utiliza como sedante para el sistema nervioso central (Schaneberg y Khan, 2002; Masuda y col., 2008). La infusión o decocción de su parte aérea tiene un amplio uso en la medicina popular. La infusión de hierba de limón carece de efectos tóxicos, así como de efectos hipnóticos o ansiolíticos en humanos. Un débil efecto diurético y antiinflamatorio se reportó por la ingestión oral de una decocción de 10 o 20% en dosis de 25 ml/kg en ratas.

La planta se recomienda para el tratamiento de trastornos digestivos, inflamación, diabetes, desórdenes nerviosos y fiebre, así como otros problemas de salud (Cheel y col., 2005).

Los aceites esenciales (AE) son una mezcla de compuestos presentes en las plantas aromáticas y medicinales que, debido a su contenido en compuestos fenólicos, terpenos, monoterpenos, y sesquiterpenos, son responsables de propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Viuda-Martos y col., 2010).

El aceite esencial de hierba de limón se ha utilizado también para tratar una amplia variedad de daños en la salud tales como acné, pie de atleta, sudoración excesiva, flatulencia, dolor de músculos y piel grasa. Estudios sobre la bioactividad de los diferentes componentes del aceite esencial han demostrado que poseen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas, antibacterianas y antiinflamatorias (Schaneberg y Khan, 2002; Masuda y col., 2008).

El aceite esencial de hierba de limón se compone principalmente de citral (65-80% en promedio), que en realidad es una mezcla de isómeros bioactivos: neral (1) y geranial (2). Otros componentes activos aislados son limoneno (3), citronelal (4),  $\beta$ -mirceno (5), y el geraniol (6) (Figura 5). El aceite esencial de hierba de limón de

alta calidad se compone principalmente de citral (> 75%) (Schaneberg y Khan, 2002).

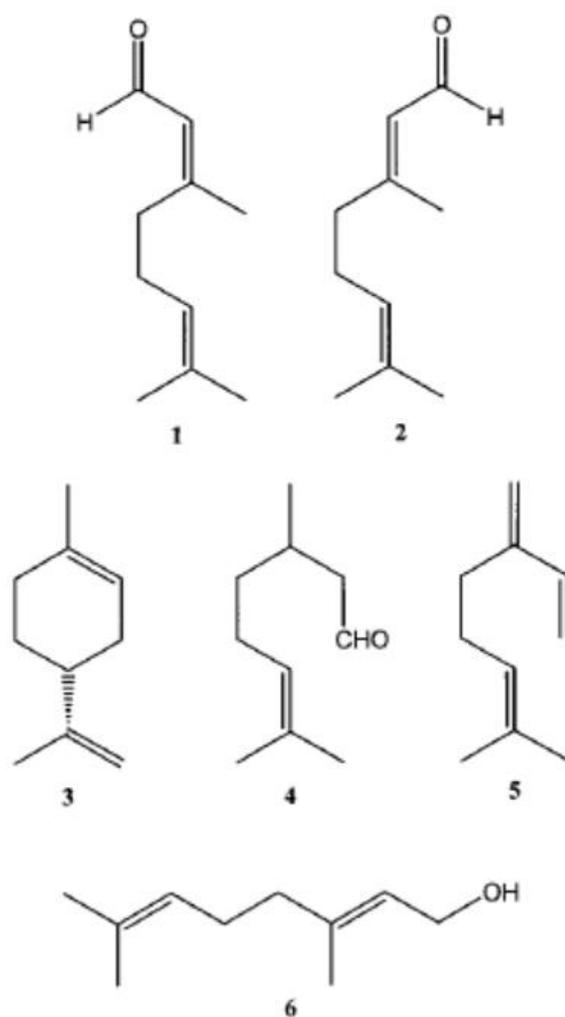


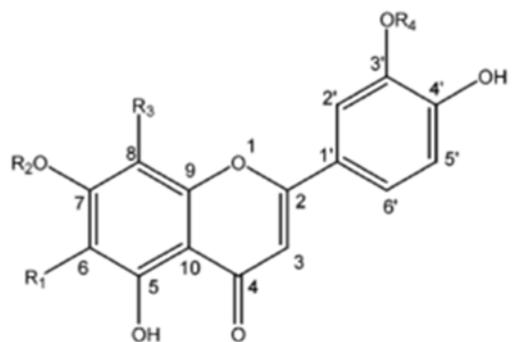
Figura 5. Estructuras de compuestos detectados en aceite esencial de *C.citratus* (Schaneberg y Khan, 2002).

En 2005, Cheel y colaboradores aislaron, identificaron y cuantificaron los principales compuestos con actividad antioxidante de diferentes extractos obtenidos

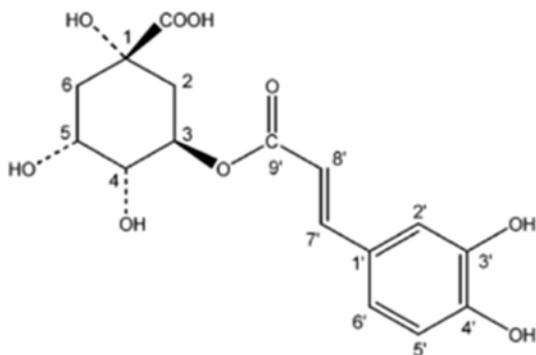
de partes aéreas de la hierba de limón *C. citratus*. En la Figura 6 se observan las estructuras de los compuestos aislados del extracto polar de *C. citratus*.

a)

Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
I. Isoorientina	Glu	H	H	H
II. Isoscoparina	Glu	H	H	CH <sub>3</sub>
III. Swetiajaponina	Glu	CH <sub>3</sub>	H	H
IV. Isoorientina-2-O-ramnósido	Glu-Rh	H	H	H
V. Orientina	H	H	Glu	H



b)



c)

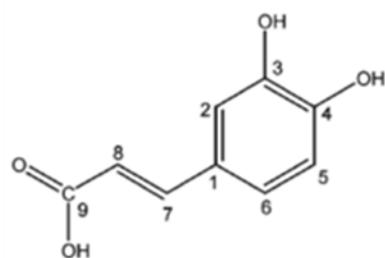


Figura 6 Compuestos aislados del extracto polar de *C. citratus*. a) Sustituyentes presentes en los compuestos (I-V) conteniendo la misma estructura básica; b) Ácido clorogénico; c) Ácido cafeíco (Cheel y col., 2005).

El contenido de los compuestos fenólicos aislados en los extractos MeOH-H<sub>2</sub>O (7:3 y 1:1), MeOH y acuosos obtenidos por decocción e infusión se resume en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Contenido de flavonoides, ácido cafeico y clorogénico en extractos de *C. citratus* en % peso/peso, rendimientos en términos de materia seca inicial (Cheel y col., 2005).

Compuesto	peso/peso				
	MeOH/H <sub>2</sub> O (7:3)	MeOH/H <sub>2</sub> O (1:1)	MeOH	Decocción <sup>a</sup>	Infusión <sup>b</sup>
Isoorientina	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.47 ± 0.04	trazas	0.08 ± 0.04
Isoscoparina	trazas	0.07 ± 0.02	0.09 ± 0.03	trazas	trazas
Swertijaponina	0.77 ± 0.04	0.72 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.37 ± 0.05	0.29 ± 0.02
Isoorientina-2-O-ramnósido	0.68 ± 0.03	1.16 ± 0.02	0.67 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.03
Orientina	0.44 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.44 ± 0.05	0.14 ± 0.03	0.08 ± 0.02
Ácido clorogénico	trazas	0.09 ± 0.01	trazas	trazas	0.35 ± 0.04
Ácido cafeico	trazas	0.13 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.02

<sup>a</sup>Decocción: 10 g de material vegetal en polvo secado al aire, hervido en 250 ml de agua durante 2.5 h; <sup>b</sup>Infusión: 10 g de material vegetal en polvo secado al aire, sumergido en 250 ml de agua hirviendo durante 15 minutos.

El mejor efecto antioxidante determinado por DPPH se encuentra en el extracto de metanol y se puede relacionar con el contenido de la isoorientina (0,47%) y orientina (0,44%) de la muestra; estos compuestos se presentan en concentraciones mucho más altas en el extracto metanólico que en el resto de los

extractos. Los principales compuestos obtenidos a partir de la planta en este estudio fueron las C-glicosilflavonas, orientina e isorientina, así como el ácido clorogénico (Cheel y col., 2005).

En 2010, Viuda-Martos y colaboradores analizaron la actividad antioxidante del aceite esencial de la hierba de limón (*Cymbopogon citratus*), tomillo (*Thymus vulgaris*), romero (*Rosmarinus officinalis*), mejorana (*Majorana hortensis*), orégano (*Origanum syriacum*), artemisia (*Artemisia annua*), por cinco diferentes métodos: 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DDPH), poder antioxidante reductor de hierro (FRAP), determinación del ácido tiobarbitúrico (TBARS), capacidad para quelar ion ferroso (FIC), determinación de la estabilidad oxidativa de la grasa (Rancimat). Los resultados obtenidos se resumen en el Cuadro 6 (Viuda-Martos y col., 2010).

Cuadro 6. Resumen de capacidad antioxidante de aceites de tomillo, romero, mejorana, hierba de limón, orégano y artemisia, medida por cinco métodos (Viuda-Martos y col, 2010).

Método	Tomillo	Romero	Mejorana	Hierba de limón	Orégano	Artemisia
DDPH	****	*	*	*	****	**
FRAP	***	*	***	***	***	****
TBARS	****	**	***	---	****	**
FIC	***	***	****	***	****	****
Rancimat	*	*	---	---	*	---

--- pro-oxidante; \*baja; \*\*baja-media; \*\*\*media-alta; \*\*\*\*alta actividad antioxidante

## II.5. Técnicas para la determinación de capacidad antioxidante *in vitro*

### II.5.1. Técnicas convencionales

Estos ensayos pueden clasificarse en dos grupos principales de acuerdo a su mecanismo de reacción: métodos que involucran la transferencia de un átomo de hidrógeno (TP) y métodos que implican la transferencia de un electrón (TE).

Técnicas comunes para detección de capacidad antioxidante son: capacidad para absorber el radical oxígeno (ORAC), quimioluminiscencia (CL) las cuales involucran TP. Mientras que, algunas que emplean TE son: poder antioxidante reductor de hierro (FRAP), Folin-Ciocalteu (FC), 2,2- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>) y 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>).

Capacidad para absorber el radical oxígeno (ORAC):

ORAC es la técnica que mide la capacidad de los antioxidantes para inhibir las oxidaciones generadas por el radical peróxido. 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.

Quimioluminiscencia (CL):

El fundamento químico del método por quimioluminiscencia (CL) se basa en la reacción de radicales oxidantes con un compuesto marcador para producir especies con un estado excitado que emitan quimioluminiscencia. La presencia de luz continua depende de la producción constante de radicales libres intermedios derivados de p-iodofenol, luminol y oxígeno, y esta emisión de luz es sensible a la interferencia de los antioxidantes secuestradores de radicales, pero se restaurará cuando todos los antioxidantes añadidos se hayan consumido en la reacción.

Poder antioxidante reductor de hierro (FRAP):

Esta técnica 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).

2,2- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico (ABTS $^{\bullet+}$ ):

Se basa en la habilidad de los antioxidantes para atrapar el radical catión de larga vida ABTS $^+$ . Preliminarmente el ABTS $^+$  es oxidado por radicales peróxido u otros oxidantes a su radical catión ABTS $^{\bullet+}$  el cual presenta un color azul intenso. La capacidad antioxidante se determina como la capacidad de los compuestos para estabilizar al ABTS $^{\bullet+}$ , lo que se ve reflejado en la decoloración de la mezcla de reactivos.

1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH $^{\bullet}$ ):

El DPPH $^{\bullet}$  tiene un color púrpura intenso y, a diferencia del ABTS $^{\bullet}$ , no se produce antes del desarrollo de la técnica ya que se encuentra disponible comercialmente. Así, la técnica se basa en la medición de la capacidad de los antioxidantes para reducir al DPPH $^{\bullet}$ . Dicha capacidad se sigue a  $\lambda_{\text{max}} = 515 \text{ nm}$  medida por la disminución en su absorbancia.

Folin-Ciocalteu (FC):

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 7 se resumen las ventajas y desventajas de los métodos *in vitro* para la determinación de la capacidad antioxidante (CAO) en alimentos y suplementos alimenticios (Prior y col., 2005).

Cuadro 7. Ventajas y desventajas de métodos para la determinación de capacidad antioxidante y fenólicos (Prior y col., 2005).

Método	Mecanismo de reacción	Ventajas	Desventajas
ORAC	TP*	Proporciona una fuente controlable de radicales peróxido Puede adaptarse para detectar tanto antioxidantes hidrofílicos como hidrofóbicos	Es sensible a la temperatura y poca variación de la misma en áreas externas del microplato, pueden disminuir la reproducibilidad. Requiere detección por fluorómetro poco disponibles en laboratorios
CL	TP*	Reacciones de quimioluminiscencia pueden automatizarse y ejecutarse en microplacas.	La elección del emisor (marcador) es una consideración crítica
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 considerablemente 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.
FC	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 elevada.

Cuadro 7. (Continuación). Ventajas y desventajas de métodos para la determinación de capacidad antioxidante y fenólicos (Prior y col., 2005).

ABTS <sup>+</sup>	TE <sup>**</sup>	<p>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</p>	<p>Esta técnica se basa en la hipótesis de que las reacciones redox se llevan a cabo rápidamente y que son completadas en 6 min; 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 30 min) para su detección, por lo que si la determinación se realiza 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</p>
DPPH	TE <sup>**</sup>	<p>Es simple, rápida, solo requiere un espectrofotómetro UV-Vis</p>	<p>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.</p>

\* Transferencia protónica; \*\* Transferencia electrónica

### II.5.2. Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas se han empleado para la evaluación de extractos de alimentos en términos de poder antioxidante, debido a su rapidez, simplicidad y bajo costo (Barros y col., 2008).

En algunas de 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 usarse como un valor comparativo de la actividad antioxidante en la solución de análisis. Las técnicas electroquímicas permiten no sólo la determinación de antioxidantes activos sino también permiten 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 y col., 2002).

Los compuestos antioxidantes pueden actuar como agentes reductores y, en solución, tienden a ser fácilmente oxidados en los electrodos inertes. Basado en este factor, se estableció una interesante relación entre el comportamiento electroquímico y el “poder antioxidante” donde se dice que un bajo potencial de oxidación significa alto poder antioxidante (Blasco y col., 2004).

El proceso fundamental en electroquímica es la transferencia de electrones entre la superficie del electrodo y las moléculas de la solución adyacente, hay un proceso heterogéneo, en contraste con otras técnicas, por ejemplo, resonancia magnética nuclear (RMN), ultravioleta (UV), etc. (Kissinger y Bott, 2002). La reacción electroquímica está afectada por el transporte de la especie electroactiva. Cuando hay un gradiente de concentración en el bulbo de la solución, se origina el transporte de materia por difusión (Costa, 1981).

Las técnicas potencioestáticas (de potencial controlado) están relacionadas con el estudio de los procesos de transferencia de carga en la interfase electrodo-

disolución y se basan en situaciones dinámicas. En el Cuadro 8 se mencionan algunas de estas técnicas y sus respectivas características (Wang, 2001).

Cuadro 8. Características de las técnicas potencioestáticas (Wang, 2001).

Técnica*	Electrodo de trabajo **	Límite de detección (M)	Velocidad (tiempo por ciclo)(min)	Respuesta
Polarografía DC	DME	$10^{-5}$	3	Onda
Polarografía NP	DME	$5 \times 10^{-7}$	3	Onda
Polarografía DP	DME	$10^{-8}$	3	Pico
Polarografía AC	DME	$5 \times 10^{-7}$	1	Pico
Voltamperometría DP	Sólido	$5 \times 10^{-7}$	3	Pico
Voltamperometría Cíclica	Estacionario	$10^{-5}$	0.1-2	Pico

\*DC= Corriente directa; NP: Normal de pulso; DP: Diferencial de pulso; AC= Corriente alterna. \*\* DME=Electrodo de gota de mercurio

#### II.5.2.1. Voltamperometría cíclica (VC)

La voltamperometría cíclica (VC) es la técnica electroanalítica más versátil para el estudio de especies electroactivas (Bott y Jackson, 1996). La VC es a menudo el primer experimento realizado en un estudio analítico. En particular, ésta ofrece una rápida localización del potencial redox de las especies electroactivas, una evaluación conveniente de los efectos del medio sobre el proceso redox y puede también utilizarse para propósitos cuantitativos, basado en las mediciones de la corriente de pico. Tales aplicaciones cuantitativas requieren que se establezca una línea base (Wang, 2001).

La VC puede aplicarse para caracterizar una serie de antioxidantes, incluyendo ácidos fenólicos y flavonoides, ácido ascórbico, y antioxidantes sintéticos (Kilmartin y col, 2001).

La capacidad de los flavonoides que actúan como antioxidantes, por donación de electrones depende directamente de los potenciales redox de sus radicales e inversamente de la reactividad de las moléculas flavonoides con el oxígeno. El rango de potenciales de reducción de algunos radicales flavonoides, en relación con los del ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocoferol, se muestran en el Cuadro 9 (Rice-Evans, 1999).

Cuadro 9. Potenciales de reducción de radicales flavonoides (Rice-Evans, 1999).

Flavonoide	$E_{Red}$	TEAC
Quercetina	0.33	4.7
Epigallocatequina galato	0.43	4.8
Epigallocatequina	0.42	3.8
Taxifolina	0.5	1.9
Catequina	0.57	2.4
Luteolina	0.6	2.1
Rutina	0.6	2.4
Kaempferol	0.75	1.3

Roginsky y colaboradores en el 2003, realizaron un estudio por medio de la técnica electroquímica de VC para caracterizar compuestos que contribuyen a la actividad antioxidante de tés. Los voltamperogramas resultantes para té verde, té oolong y té negro se muestran en la Figura 7.

Se ha demostrado que la corriente positiva para la oxidación de los tés verde y oolong diluidos se debe principalmente a EGCG, el principal polifenol y componente presente oxidable. Otros flavan-3-oles son oxidados a potenciales

menores de 400 mV. El pico o el hombro a 120 mV se debe a grupos pirogalol (trifenoles) en el anillo B de los flavonoides presentes, mientras que el pico principal en 200-220 mV se debe al galato o al grupo catecol.

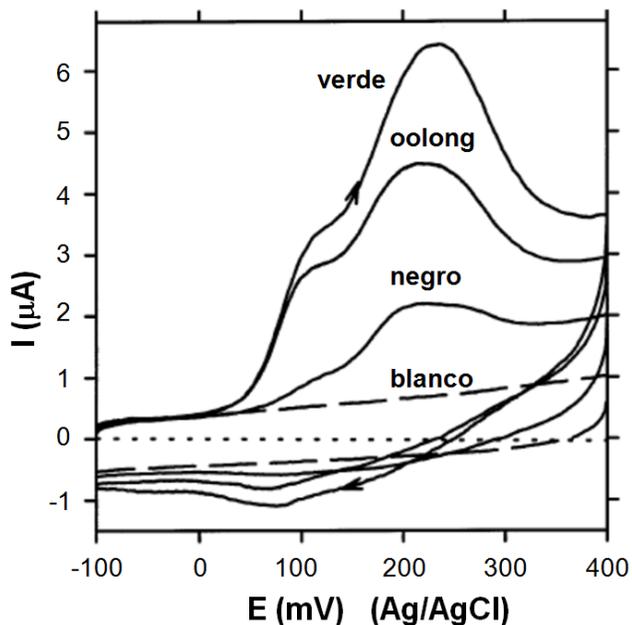


Figura 7. Voltamperograma cíclico del té verde, té oolong, té negro y respuesta del blanco. El té fue diluido 50 veces en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7. El análisis se realizó con un electrodo de carbón vítreo a 100mV/s (Roginsky y col., 2003).

En la señal de oxidación del té negro, a 120 mV se detecta una corriente mucho menor que la observada en los otros té analizados. Esto se atribuye a las transformaciones oxidativas que se producen durante la fermentación generada en los tratamientos previos de las hojas (reducción en los niveles de EGCG y EGC). Diversos grupos de catecol y galato en teaflavinas y otros polifenoles producen el pico principal en torno a 230 mV (Roginsky y col., 2003).

### II.5.2.2. Técnicas voltamperométricas de pulso (VDP)

Las técnicas voltamperométricas de pulso, introducidas por Barker y Jenkin, están encaminadas a mediciones con bajos límites de detección, tales técnicas permiten la conveniente cuantificación por debajo de una concentración de  $10^{-8}$  M (Wang, 2001).

#### II.5.2.2.1. Voltamperometría diferencial de pulso (VDP)

Como se mencionó anteriormente la VC se utiliza frecuentemente para la caracterización de los sistemas electroactivos. Sin embargo, cuando sustancias orgánicas están presentes, existe gran posibilidad de que ocurran fenómenos de adsorción sobre la superficie del electrodo, limitando el uso de esta técnica para mediciones cuantitativas. Para superar esta restricción, y obtener información cuantitativa en la capacidad antioxidante de los extractos, fue utilizada la voltamperometría diferencial de pulso (VDP). En esta técnica la corriente se mide antes y después del la aplicación del potencial de pulso permitiendo la discriminación de efectos, tales como la adsorción en la superficie del electrodo, que es aproximadamente constante en cierto intervalo de potencial (Barros y col., 2008).

La VDP es una técnica ampliamente utilizada para mediciones a niveles traza de especies orgánicas e inorgánicas. El voltamperograma diferencial de pulso resultante consiste en un gráfico de potencial contra corriente, donde el valor de corriente máxima de la señal es directamente proporcional a la concentración de los analitos de estudio. La selección de la amplitud del pulso y la velocidad de barrido usualmente requieren una compensación entre la sensibilidad, resolución y velocidad. Por ejemplo, grandes amplitudes de pulso generan un pico grande y ancho. Comúnmente se emplean amplitudes de pulso de 25-50 mV, acopladas con una velocidad de barrido de 5 mV/s (Wang, 2001).

En 2004, Blasco y colaboradores por medio de VDP utilizando un electrodo de carbón vítreo, Ag/AgCl como electrodo de referencia y platino como electrodo

auxiliar, a diferentes pHs (2 y 7.5) encontraron que ácidos fenólicos presentaron una señal a bajo potencial (100-450 mV), mientras que flavonoides exhibieron dos señales (una a 0-300 mV y otra a 600-900 mV) (Blasco y col., 2004).

### II.5.3. Comparación entre técnicas convencionales y técnicas electroquímicas

Los métodos de detección electroquímica, junto con los métodos cromatográficos se han utilizado para la determinación de polifenoles.

Romani y colaboradores en 2000 encontraron una buena relación entre el método de referencia HPLC/DAD y VDP al analizar compuestos fenólicos presentes en uva, té y aceitunas (Cuadro 10).

Cuadro 10. Determinación de la concentración de polifenoles en extractos naturales por HPLC/DAD y VDP (Romani y col., 2000).

	HPLC/DAD (mmol/L)	VDP (mmol/L)
Té <sup>1</sup>	4.7 ± 0.09	4.5 ± 0.16
Piel de uva <sup>2</sup>	2.8 ± 0.02	2.6 ± 0.12
Aceitunas <sup>3</sup>	3.9 ± 0.06	2.5 ± 0.32

<sup>1</sup>Contenido de polifenoles expresado en EGCG. <sup>2</sup>contenido de antocianíco expresado en malvina. <sup>3</sup>contenido antocianíco expresado en cianidina 3-O-rutinosido (Cy-3R).

La técnica electroquímica de VDP tiene una gran ventaja en comparación con la convencional ya que su tiempo de análisis va de unos pocos segundos a unos pocos minutos para cada muestra (Romani y col., 2000).

Zielinska y colaboradores en el 2008 emplearon la técnica electroquímica de VC y métodos espectrofotométricos para determinar la actividad antioxidante de cebollas resultando la VC un método adecuado para la determinación de la capacidad antioxidante (Zielinska y col., 2008).

### III. HIPÓTESIS.

La técnica electroquímica de voltamperometría diferencial de pulso es una manera rápida y confiable de evaluar la capacidad antioxidante de los extractos *Bursera bipinnata*, *Bursera copallifera*, *Bursera simaruba*, *Cymbopogon citratus* y *Matricaria chamomilla*.

## IV. OBJETIVOS.

### IV.1. Objetivo General

Analizar la capacidad antioxidante de extractos de *Bursera bipinnata*, *Bursera copallifera*, *Bursera simaruba*, *Cymbopogon citratus* y *Matricaria chamomilla* mediante las técnicas electroquímicas de voltamperometría cíclica y voltamperometría diferencial de pulsos.

### IV.2. Objetivos específicos

- Analizar el comportamiento redox de las muestras, mediante voltamperometría cíclica (VC).
- Determinar la capacidad antioxidante del analito de estudio a través de voltamperometría diferencial de pulso (VDP).

## V. METODOLOGÍA.

### V.1. Materiales.

Extractos de las diferentes especies de estudio, obtenidos previamente, se proporcionaron para el análisis de su capacidad antioxidante. En la primer columna del Cuadro 11 se enlistan cada una de las especies analizadas, en la segunda se indica el origen del extracto. Finalmente, en la tercer columna se muestra el solvente que se utilizó para el análisis electroquímico.

Cuadro 11. Listado de muestras

Muestra	Extracto	Solvente
<i>Bursera simaruba</i>	MeOH	MeOH
	Acuoso	MeOH
	Hexánico	Acetona
<i>Bursera copallifera</i>	MeOH	MeOH
	Hexánico	Acetona
	MeOH/H <sub>2</sub> O 7:3	MeOH
<i>Bursera bipinnata</i>	MeOH	MeOH
	Hexánico	Acetona
	MeOH/H <sub>2</sub> O 7:3	MeOH
<i>Cymbopogon citratus</i>	MeOH	MeOH
<i>Matricaria chamomilla</i>	Acuoso	H <sub>2</sub> O

### V.2. Métodos.

#### V.2.1. Preparación de las muestras

En un vial se pesaron 10 mg del extracto y se disolvieron en 500 µL del solvente indicado en el Cuadro 11.

### V.2.2. Análisis electroquímico

Se utilizó un potenciostato Bas Epsilon y un sistema de celda convencional de tres electrodos donde carbón vítreo fue el electrodo de trabajo, Ag/AgCl (3M KCl) el electrodo de referencia y como electrodo auxiliar se empleó un alambre de platino (Figura 8).

En una celda electroquímica se colocaron 2970  $\mu\text{L}$  de la solución amortiguadora Sørensen a pH 7 (blanco), se insertaron los electrodos para realizar el análisis y se obtuvo su comportamiento electroquímico tanto por voltamperometría cíclica (VC) como por voltamperometría diferencial de pulsos (VDP).

Posteriormente, se adicionaron 30  $\mu\text{L}$  de la muestra correspondiente y se hizo burbujear con nitrógeno durante 5 min. para remover el oxígeno disuelto. Después se analizó por VC y VDP de igual manera que el blanco, empleando el mismo sistema de celda.

Al término de cada análisis el electrodo de trabajo se pulió con alúmina sobre un paño suave y se enjuagó con agua deionizada de manera tal que se obtuvo una apariencia espejo.

#### V.2.2.1. Preparación de solución amortiguadora Sørensen

Se preparó una solución 0.2 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y otra 0.2 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  y se mezclaron en una proporción 23:2. Posteriormente se diluyó esta solución con agua deionizada en una proporción 1:1 para obtener una concentración de 0.1M. Se ajustó la solución a pH 7 agregando NaOH 0.1 N.

#### V.2.2.2. Voltamperometría cíclica (VC)

Se utilizó VC para conocer de manera rápida el comportamiento redox de cada una de las muestras evaluadas durante este estudio.

El barrido se realizó en un intervalo de potencial de 0 a 1200 mV y se adecuó a ventanas más apropiadas para cada muestra según su voltamperograma resultante. Se empleó una velocidad de barrido de 100 mV/s. El análisis se efectuó por triplicado para cada muestra.

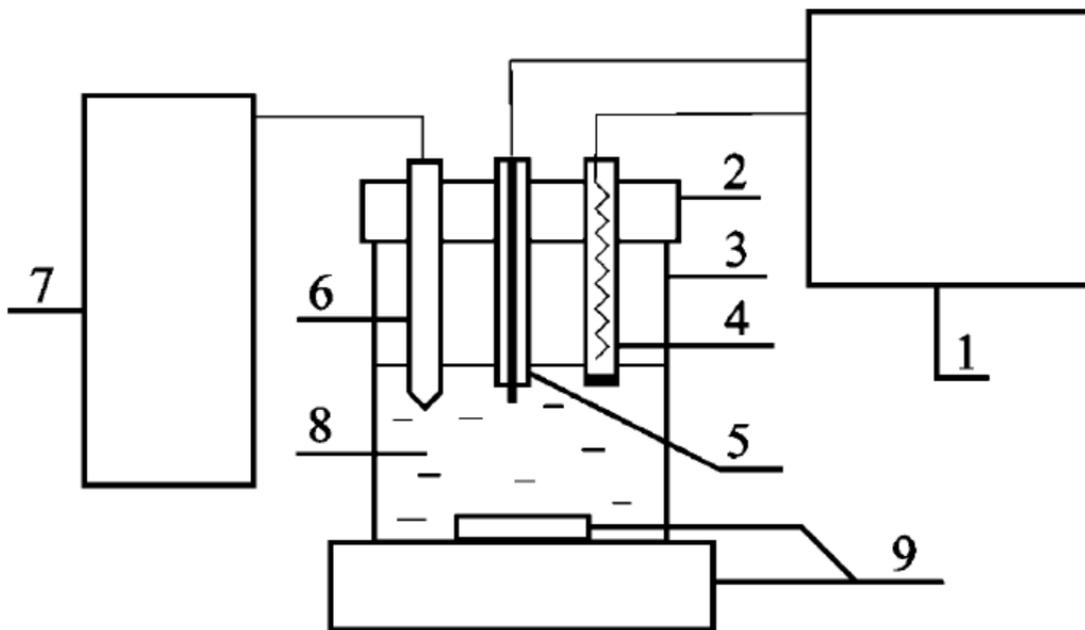


Figura 8. Esquema del equipo electroquímico. 1) analizador voltamétrico; 2) contenedor; 3) celda electroquímica; 4) electrodo de referencia; 5) electrodo de trabajo; 6) tubo de gas; 7) contenedor de gas (nitrógeno); 8) electrolito soporte y analito de estudio; 9) agitador magnético.

#### V.2.2.3. Voltamperometría diferencial de pulso (VDP)

El barrido se realizó en una ventana de potencial de -200 mV a +1500 mV y se adecuó a ventanas más apropiadas para cada muestra según su voltamperograma resultante.

Las condiciones a las cuales se operó el sistema fueron a una amplitud de pulso de 70 mV y velocidad de barrido de 5 mV/s. Esta técnica se realizó inmediatamente después de la VC en la misma muestra seguida de la limpieza del electrodo de trabajo.

## VI. RESULTADOS

### VI.1. Voltamperometría cíclica (VC)

#### VI.1.1. *Bursera bipinnata*

El voltamperograma resultante del extracto metanólico de *B. bipinnata* presenta dos señales de oxidación a 109 mV y 454 mV y una señal de reducción a 129 mV como resultado de la reducción del producto de la oxidación. En la Figura 9 se puede observar que exhibe un sistema un sistema irreversible.

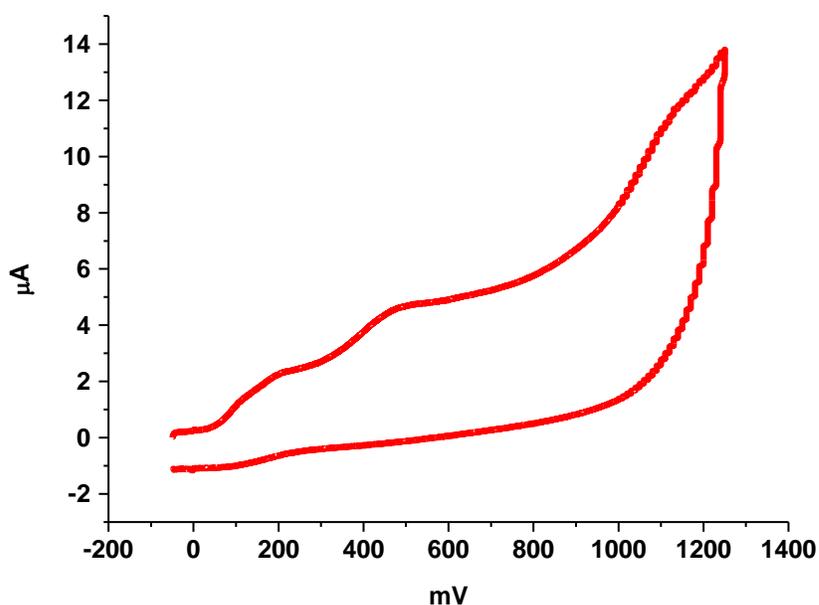


Figura 9. Voltamperograma cíclico del extracto metanólico de *Bursera bipinnata* en solución amortiguadora Sörensen a pH 7, contra un electrodo de Ag/AgCl y velocidad de barrido de 100 mV/s.

Los voltamperogramas correspondientes al extracto metanol-agua de *B. bipinnata* presentan un comportamiento electroquímico muy parecido al extracto metanólico, tanto en las señales de oxidación y reducción, como en la corriente que exhiben (Figura 10, Cuadro 12).

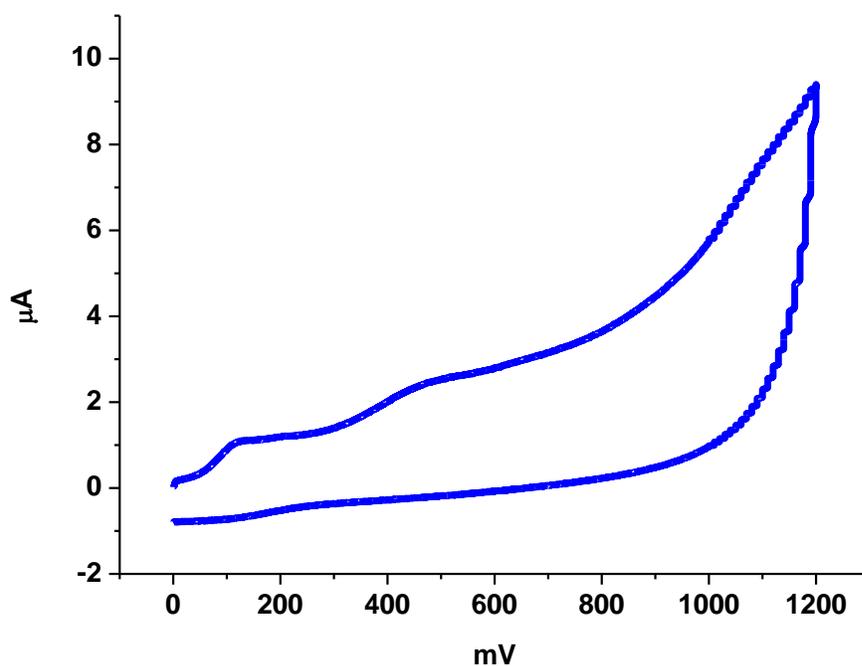


Figura 10. Voltamperograma cíclico del extracto MeOH-H<sub>2</sub>O (7:3) de *Bursera bipinnata* en solución amortiguadora Sörensen a pH 7, contra un electrodo de Ag/AgCl y velocidad de barrido de 100 mV/s.

Cuadro 12. Señales obtenidas por voltamperometría cíclica en extractos de *Bursera bipinnata*.

Señal observada	Extracto MeOH		Extracto MeOH-H <sub>2</sub> O 7:3	
	Potencial (mV)	Corriente (µA)	Potencial (mV)	Corriente (µA)
Oxidación (1)	109	0.415	121	0.403
Oxidación (2)	454	0.223	454	0.198
Reducción	129	0.095	131	0.104

En la Figura 11 se presenta el voltamperograma cíclico del extracto hexánico, el cual presenta un sistema irreversible ya que sólo se observa una señal de oxidación (945 mV, 0.088 $\mu$ A), que es mucho mayor a lo detectado con el extracto metanólico, por lo que se puede deducir que el extracto hexánico no logró extraer aquellos compuestos con capacidad antioxidante elevada.

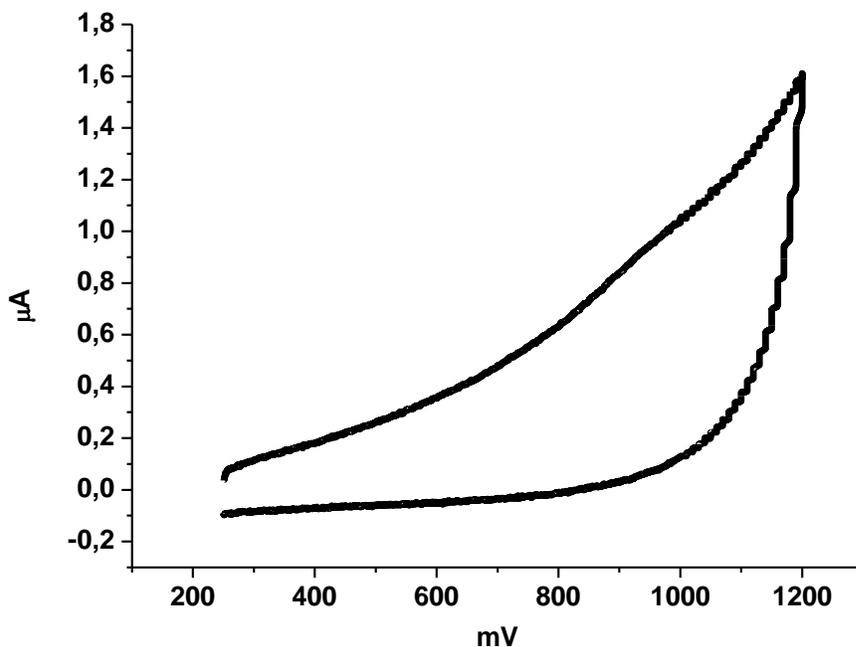


Figura 11. Voltamperograma cíclico del extracto hexánico de *Bursera bipinnata* en solución amortiguadora Sörensen a pH 7, contra un electrodo de Ag/AgCl y velocidad de barrido de 100 mV/s.

#### VI.1.2. *Bursera copallifera*

En la Figura 12 se presentan los voltamperogramas resultantes al analizar el extracto metanólico y metanol-agua de *Bursera copallifera*. Ambos extractos exhiben un comportamiento electroquímico muy similar en cuanto a los potenciales redox. En el extracto metanólico los potenciales de oxidación se perciben a 172 y

467mV y el de reducción a 110 mV. En el caso de la extracción obtenida con metanol-agua las señales de oxidación se observan a 164 y 472 mV y la de reducción a 113 mV. Sin embargo, la respuesta electroquímica de ambos extractos en cuanto a la intensidad de corriente es diferente. En las señales de oxidación del extracto con metanol-agua se percibe una intensidad de corriente menor que en las del extracto metanólico. La corriente está relacionada directamente con la concentración de compuestos electroactivos, lo cual revela que con ambos extractos (MeOH, MeOH:H<sub>2</sub>O) se logró extraer los mismos compuestos pero en diferentes concentraciones. En el Cuadro 13 se indican los valores de potencial e intensidad de corriente para cada señal observada.

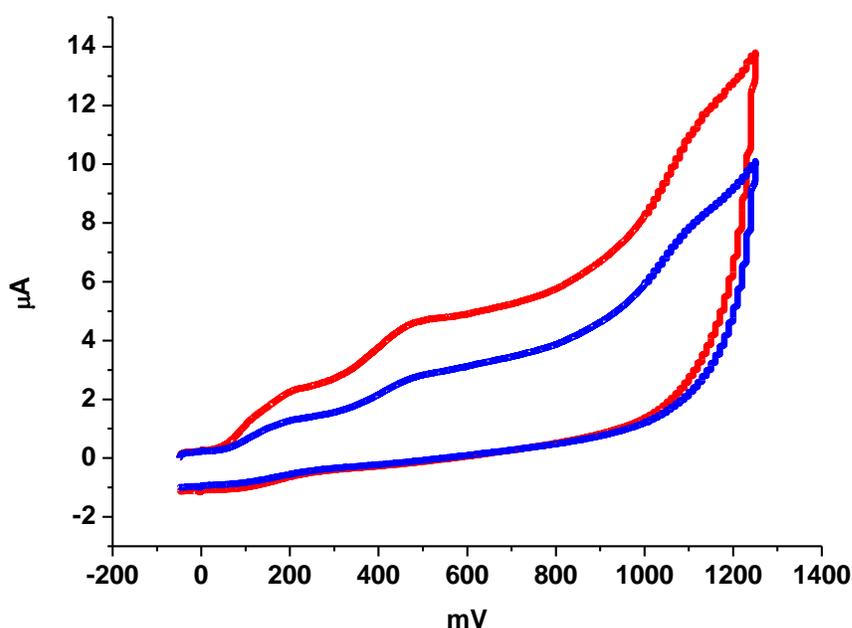


Figura 12. Voltamperograma cíclico del extracto — MeOH-H<sub>2</sub>O (7:3) y — MeOH de *Bursera copallifera* en solución amortiguadora Sørensen a pH 7, contra un electrodo de Ag/AgCl y velocidad de barrido de 100 mV/s.

Cuadro 13. Señales obtenidas por voltamperometría cíclica en extractos de *Bursera copallifera*.

Señal observada	Extracto MeOH		Extracto MeOH-H <sub>2</sub> O 7:3	
	Potencial (mV)	Corriente (μA)	Potencial (mV)	Corriente (μA)
Oxidación (1)	172	1.016	164	0.455
Oxidación (2)	467	0.470	472	0.229
Reducción	110	0.256	113	0.156

El extracto hexánico de *B. copallifera* presenta un sistema irreversible con una señal de oxidación muy pequeña a 1050 mV (Figura 13). Si se compara este extracto con los extractos metanólico y metanol-agua, se puede observar que en el hexánico se pierden las dos señales de oxidación y la de reducción que se observan en los otros extractos, presentando en cambio una señal de oxidación a 1050 mV con corriente de 0.052 μA.

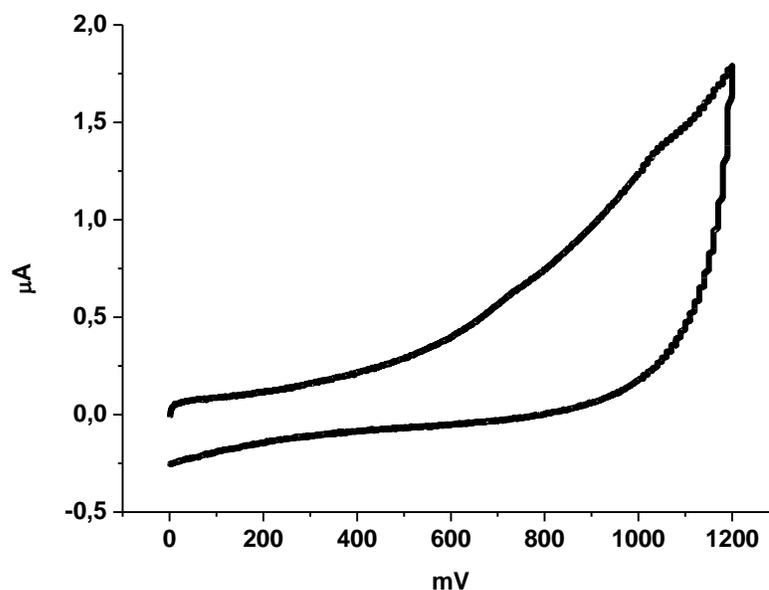


Figura 13. Voltamperograma cíclico del extracto hexánico de *Bursera copallifera* en solución amortiguadora Sørensen a pH 7, contra un electrodo de Ag/AgCl y velocidad de barrido de 100 mV/s.

### VI.1.3. *Bursera simaruba*

En la Figura 14 se observa el voltamperograma del extracto metanólico, con una ventana de potencial de -100 a 1200 mV, el cual presenta, dos señales de oxidación a 223 y 872 mV y una señal de reducción a 113 mV.

Mientras que, en la Figura 15 se puede observar que el extracto acuoso presenta una señal de oxidación a un potencial de 223 mV, dos hombros alrededor de 480 y 650 mV y una señal de reducción a 144 mV.

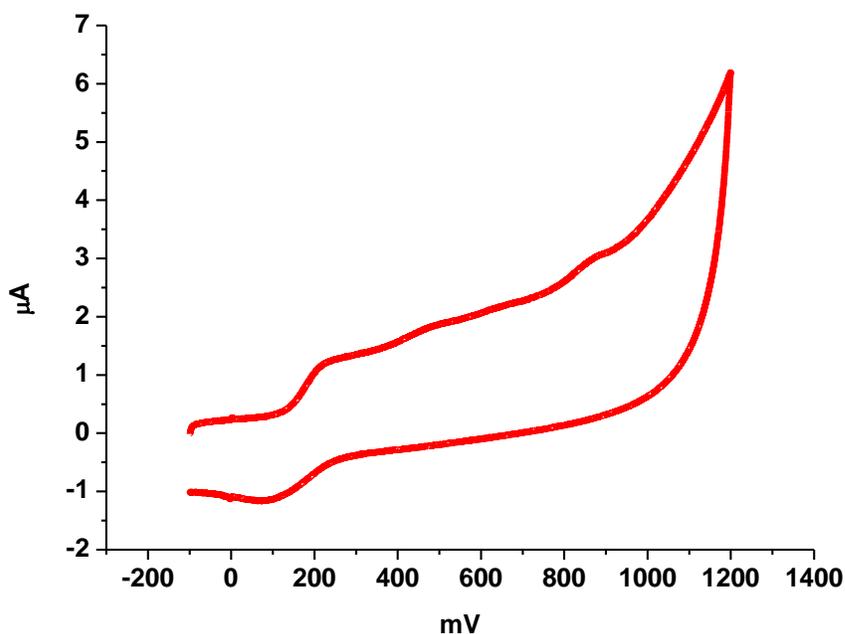


Figura 14. Voltamperograma cíclico del extracto metanólico de *Bursera simaruba* en solución amortiguadora Sørensen a pH 7, contra un electrodo de Ag/AgCl y velocidad de barrido de 100 mV/s (ventana de potencial de -50 a 900 mV).

Las condiciones de análisis utilizadas en los extractos (metanólico y acuoso) no fueron las mismas ya que se trabajó a diferentes ventanas de potencial, lo cual se ve reflejado en que a mayores ventanas de potencial el producto de la primera

oxidación se sigue oxidando y en caso de existir una señal de reducción (a ventanas menores) en las más amplias, puede presentarse con menor intensidad de corriente.

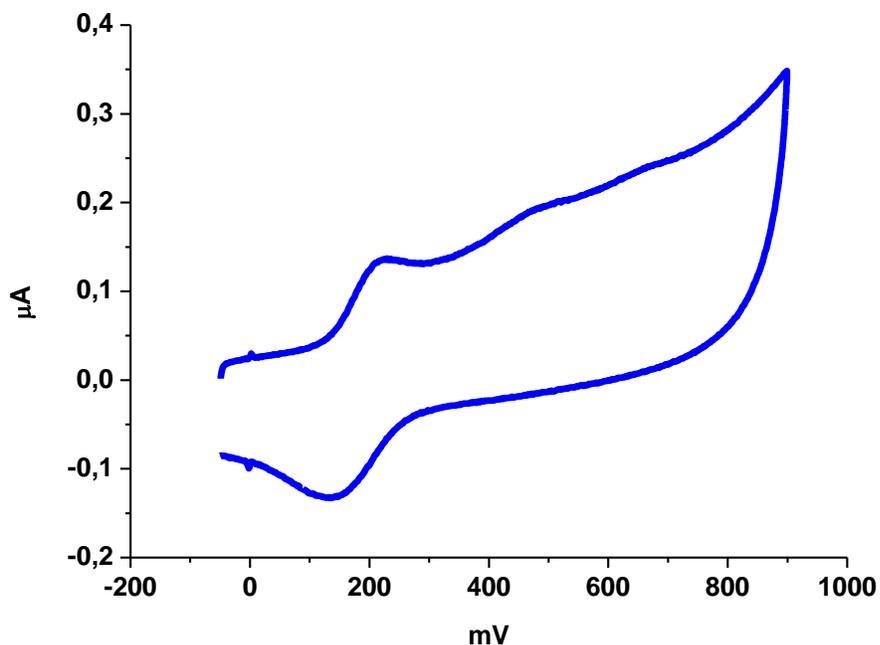


Figura 15. Voltamperograma cíclico del extracto acuoso de *Bursera simaruba* en solución amortiguadora Sørensen a pH 7, contra un electrodo de Ag/AgCl y velocidad de barrido de 100 mV/s (ventana de potencial de -50 a 900 mV).

Con el extracto metanólico se obtuvieron señales de oxidación con corrientes de pico más elevadas (mayor concentración de especies electroactivas), que con el acuoso (Cuadro 14).

Por otro lado, el extracto hexánico de *Bursera simaruba* no presentó señal de oxidación o de reducción por voltamperometría cíclica.

Cuadro 14. Señales obtenidas por voltamperometría cíclica en extractos de *Bursera simaruba*.

Señal observada	Extracto metanólico (-100 a 1200 mV)		Extracto acuoso (-50 a 900 mV)	
	Potencial (mV)	Corriente ( $\mu\text{A}$ )	Potencial (mV)	Corriente ( $\mu\text{A}$ )
Oxidación (1)	223	0.705	223	0.644
Oxidación (2)	872	0.308	-----	-----
Reducción	113	0.503	144	0.787

#### VI.1.4. *Cymbopogon citratus*

En la Figura 16 se muestra el voltamperograma cíclico del extracto metanólico de *Cymbopogon citratus*, el cual presenta una señal de oxidación a 288 mV y una de reducción a 263 mV (Cuadro 15). El sistema observado fue irreversible.

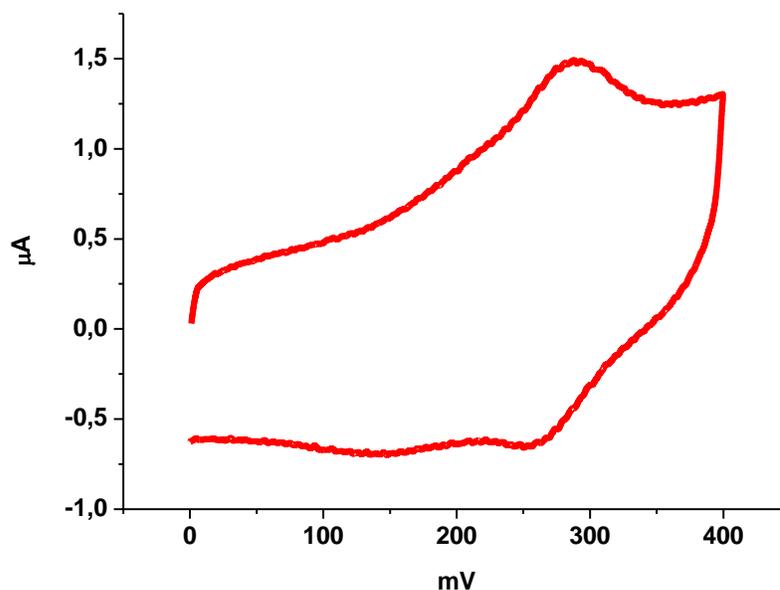


Figura 16. Voltamperograma cíclico del extracto metanólico de *Cymbopogon citratus* en solución amortiguadora Sørensen a pH 7, contra un electrodo de Ag/AgCl y velocidad de barrido de 100 mV/s.

Cuadro 15. Señales obtenidas por voltamperometría cíclica en extracto metanólico de *Cymbopogon citratus*.

Señal observada	Potencial (mV)	Corriente ( $\mu\text{A}$ )
Oxidación	288	0.5646
Reducción	263	0.2045

#### VI.1.5. *Matricaria chamomilla*

Por medio de VC se pudo determinar que el sistema que exhibe el extracto acuoso de *Matricaria chamomilla* es irreversible (Figura 17) con una señal de oxidación a 300mV y una de reducción a 276 mV (Cuadro 16); además, en el voltamperograma se puede observar un hombro junto a la señal de oxidación a un potencial cercano a 200 mV.

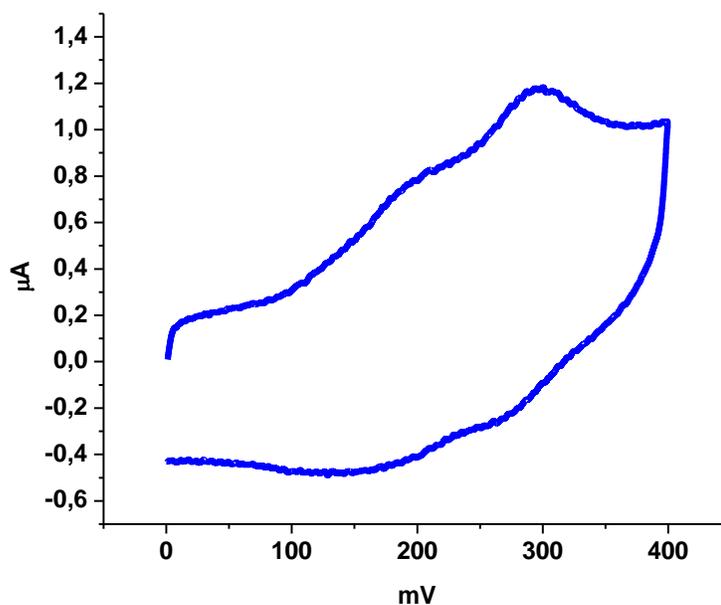


Figura 17. Voltamperograma cíclico del extracto acuoso de *Matricaria chamomilla* en solución amortiguadora Sørensen a pH 7, contra un electrodo de Ag/AgCl y velocidad de barrido de 100 mV/s.

Cuadro 16. Señales obtenidas por voltamperometría cíclica en extracto acuoso de *Matricaria chamomilla*.

Señal observada	Potencial (mV)	Corriente ( $\mu\text{A}$ )
Oxidación	300	0.156
Reducción	276	0.067

## VI.2. Voltamperometría diferencial de pulsos (VDP)

### VI.2.1. *Bursera bipinnata*

En la Figura 18 se puede observar el voltamperograma diferencial de pulsos obtenido para los extractos metanol y metanol-agua (7:3), donde se observa una señal de oxidación a 70 mV en ambos extractos.

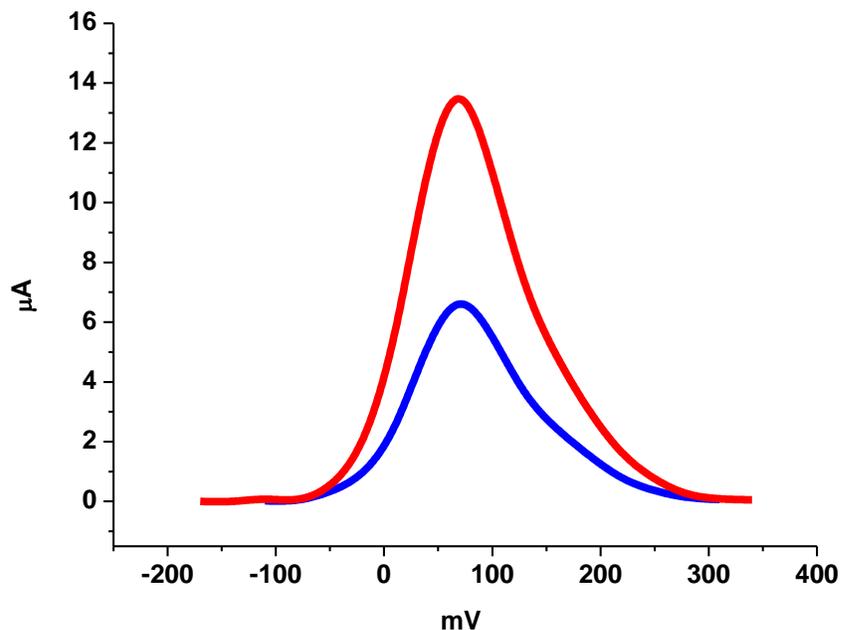


Figura 18. Voltamperograma diferencial de pulsos del extracto — MeOH y — MeOH-H<sub>2</sub>O (7:3) de *Bursera bipinnata* en solución amortiguadora Sørensen a pH 7, contra un electrodo de Ag/AgCl.

En el Cuadro 17 se observa que con el extracto metanólico se obtuvo mayor corriente que con el extracto metanol-agua, lo cual, también fue observado previamente por medio de voltamperometría cíclica, esto debido a que la extracción que se realizó solo con metanol logró extraer mayor cantidad de compuestos electroactivos.

Cuadro 17. Señales obtenidas por voltamperometría diferencial de pulsos en extractos de *Bursera bipinnata*

Extracto	Señal de Oxidación	
	Potencial (mV)	Corriente ( $\mu\text{A}$ )
MeOH	70	13.53
MeOH:H <sub>2</sub> O (7:3)	70	6.70

#### VI.2.2. *Bursera copallifera*

En el análisis realizado para *Bursera copallifera* se obtuvo una señal de oxidación a 100 mV tanto para el extracto metanólico como para el de metanol-agua, tal como se observa en la Figura 19. Sin embargo, este último presentó una menor corriente (Cuadro 18).

Cuadro 18. Señales obtenidas por voltamperometría diferencial de pulsos en extractos de *Bursera copallifera*.

Extracto	Señal de Oxidación	
	Potencial (mV)	Corriente ( $\mu\text{A}$ )
MeOH	100	15.88
MeOH:H <sub>2</sub> O (7:3)	100	11.91

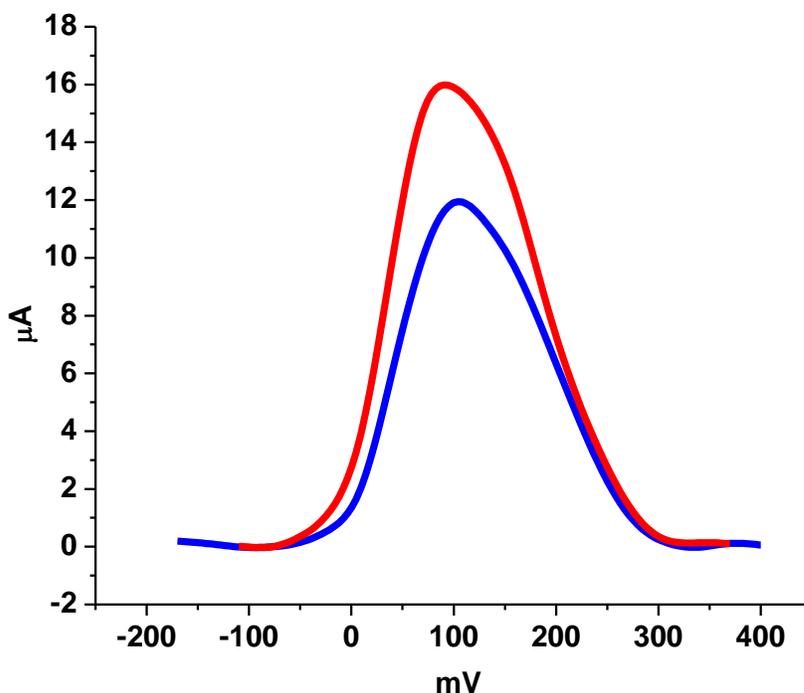


Figura 19. Voltamperograma diferencial de pulsos del extracto — MeOH y — MeOH-H<sub>2</sub>O H<sub>2</sub>O (7:3) de *Bursera copallifera* en solución amortiguadora Sörensen a pH 7, contra un electrodo de Ag/AgCl.

### VI.2.3. *Bursera simaruba*

Los resultados obtenidos mediante voltamperometría diferencial de pulsos muestran dos señales de oxidación, lo cual se puede observar en la Figura 20. El extracto metanólico presentó señales de oxidación a 159 mV y a 579 mV, mientras que el acuoso exhibe señales a 160 mV y a 581 mV. Con estos resultados se puede deducir que los compuestos responsables de tales señales fueron los mismos en ambos extractos, además de que las corrientes detectadas fueron muy similares ya que solo presentan diferencias menores a  $1 \times 10^{-6}$  A (Cuadro 19).

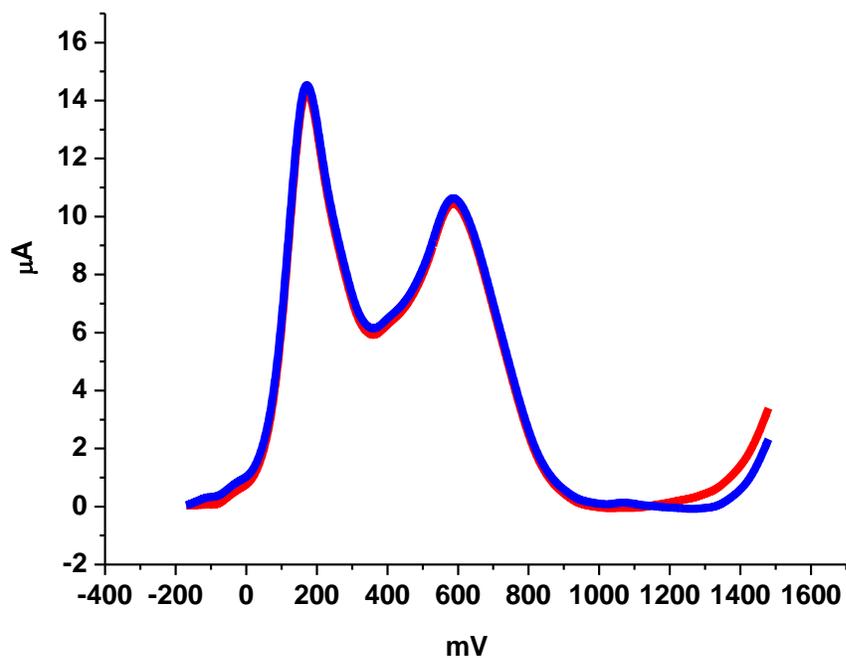


Figura 20. Voltamperograma diferencial de pulsos de los extractos — metanólico y — acuoso de *Bursera simaruba* en solución amortiguadora Sörensen a pH 7, contra un electrodo de Ag/AgCl.

Cuadro 19. Señales obtenidas por voltamperometría diferencial de pulsos en extractos de *Bursera simaruba*.

Señal observada	Extracto metanólico		Extracto Acuoso	
	Potencial (mV)	Corriente ( $\mu\text{A}$ )	Potencial (mV)	Corriente ( $\mu\text{A}$ )
Oxidación 1	159	14.72	160	14.98
Oxidación 2	579	10.58	581	10.73

En el caso de los extractos hexánicos de *B. bipinnata*, *B. copallifera* y *B. simaruba* no se observan señales de oxidación en sus voltamperogramas por lo que puede deducirse que con este solvente no se lograron extraer compuestos electroactivos.

#### VI.2.4. *Cymbopogon citratus*

El voltamperograma diferencial de pulsos resultante es el que se observa en la Figura 21, con una señal de oxidación a 250 mV con corriente de 11.67  $\mu\text{A}$ .

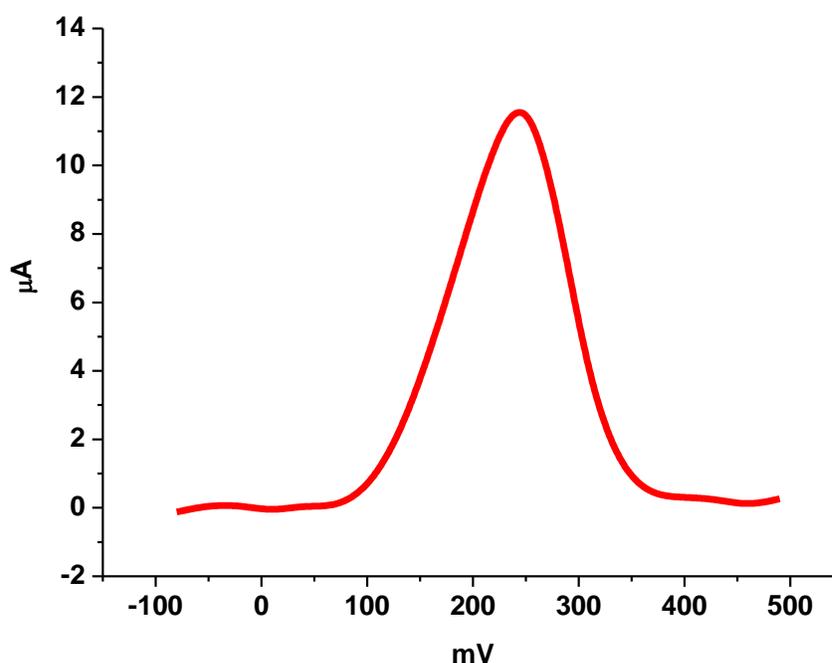


Figura 21. Voltamperograma diferencial de pulsos del extracto metanólico de *Cymbopogon citratus* en solución amortiguadora Sörensen a pH 7, contra un electrodo de Ag/AgCl.

#### VI.2.5. *Matricaria chamomilla*

En la Figura 22 se puede observar el voltamperograma diferencial de pulsos del extracto acuoso de *Matricaria chamomilla*, el cual presenta una señal de oxidación a un potencial de 230 mV con corriente de 6.86  $\mu\text{A}$ .

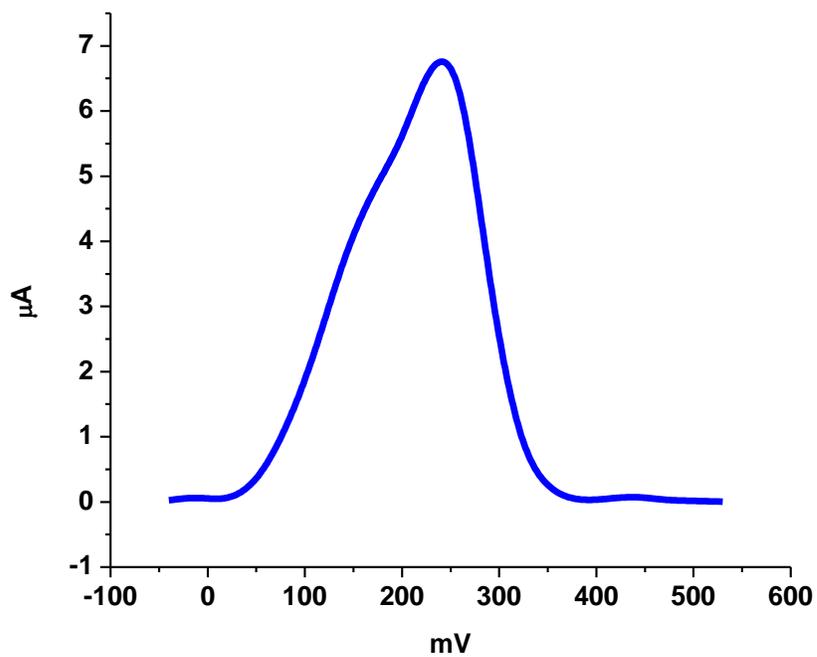


Figura 22. Voltamperograma diferencial de pulsos del extracto acuoso de *Matricaria chamomilla* en solución amortiguadora Sørensen a pH 7, contra un electrodo de Ag/AgCl.

## VII. DISCUSIÓN

El análisis electroquímico de todas las especies se realizó a pH 7, el cual se eligió arbitrariamente debido a que se desconocen los compuestos electroactivos presentes en cada especie y a que representa un valor de pH cercano al fisiológico.

Por medio de la voltamperometría cíclica (VC) se pudo determinar el comportamiento redox y reversibilidad de cada una de las muestras.

En un sistema reversible el  $\Delta E_p$  se aproximará a 60 mV y su relación de corriente ( $i_{pa}/i_{pc}$ ) será igual a 1. Si no se cumple esta condición y el sistema presenta señal de oxidación y de reducción definidas, se dice que es un sistema cuasi-reversible. En ausencia de una señal de reducción definida el sistema se considera irreversible (Mabbott, 1983).

De esta forma se logró determinar que todas las muestras presentaron un sistema irreversible.

El objetivo principal de este análisis fue evaluar la capacidad antioxidante de las muestras, para esto se debe tener en cuenta que un compuesto con elevada capacidad antioxidante presenta señales de oxidación por debajo de 600 mV (Janeiro y col., 2004)

Considerando lo anterior, se puede deducir que la capacidad antioxidante del extracto hexánico de las especies de *Bursera* es muy baja ya que presenta señal de oxidación a potenciales mucho mayores a 600 mV; sin embargo, sus extractos metanólicos presentaron señales a potenciales menores de 600 mV, es decir, exhibieron mayor capacidad antioxidante. Esto puede deberse a que los extractos hexánicos de *Bursera* no fueron capaces de separar todos los compuestos electroactivos que les conceden capacidad antioxidante, y que se logran obtener con el extracto metanólico.

Por otra parte, el extracto metanólico de *Cymbopogon citratus* y el acuoso de *Matricaria chamomilla* presentaron elevada capacidad antioxidante.

Por medio de VDP se lograron obtener señales con mejor resolución y mayor corriente que con VC.

La capacidad antioxidante determinada por estas técnicas se atribuye a los compuestos electroactivos que contienen las muestras de análisis.

Estudios que se han realizado para especies del género *Bursera* (*Burseraceae*) han logrado identificar diversos componentes químicos, entre los cuales se encuentra el 5,6,3',4'-tetrahidroxi-flavanol, que debido a su estructura química (Figura 23), es posible que sea uno de los compuestos que contribuyen a su capacidad antioxidante; sin embargo, deben realizarse análisis estructurales para hacer tal afirmación.

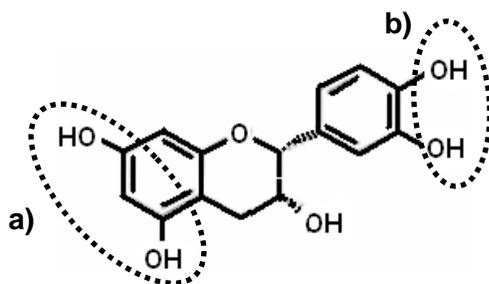


Figura 23. Estructura química del 5,6, 3',4'-tetrahidroxi-flavanol a) grupo resorcinol, b) grupo catecol.

El 5,6,3',4'-tetrahidroxi-flavanol contiene en su estructura al grupo resorcinol en el anillo A (Figura 23.a), el cual se oxida a potenciales elevados (600 mV) y el grupo catecol ubicado en el anillo B (Figura 23.b), el cual se oxida a potenciales positivos muy bajos (200 mV), es decir, este último tiene mayor facilidad para ceder sus electrones. Estas características estructurales le conceden una elevada capacidad antioxidante (Janeiro y col., 2004).

En cuanto a los resultados del presente estudio para los extractos tanto metanólico como acuoso de *Bursera simaruba*, se obtuvieron señales una alrededor de 160 mV, que podría ser atribuible al grupo catecol y otra cercana a 580 mV que podría deberse al grupo resorcinol. Es por esta razón que probablemente el compuesto

que le confiere la capacidad antioxidante es el 5,6,3',4'-tetrahidroxi-flavanol, debido a que contiene ambos grupos.

Cabe mencionar que el voltamperograma obtenido es producto de la suma de todos los compuestos electroactivos presentes en la muestra.

Otros compuestos que pueden contribuir a la actividad antioxidante de las especies de *Bursera* (Burseraceae) son los lignanos y neolignanos, que son compuestos fenólicos, dichos compuestos son: burselignano (VII), burseneolignano (IX), (+)-isolariciresinol (X) y 5-metoxi-(+)-isolariciresinol (XI) (Cuadro 3).

Por todo lo anterior, se puede pensar que los voltamperogramas obtenidos de las especies de *Bursera* (Burseraceae) son el resultado de la suma de la capacidad antioxidante de los compuestos ya mencionados.

En 2005, Cheel y colaboradores, determinaron la capacidad antioxidante de extractos: metanólico, metanol-agua (1:1), (7:3) y acuosos (infusión, decocción) de *Cymbopogon citratus* y encontraron el mejor efecto antioxidante en el extracto metanólico, lo cual está relacionado con el contenido de isoorientina y orientina en la muestra. También, estos autores realizaron la identificación estructural de los compuestos presentes en *Cymbopogon citratus* por medio de espectroscopía resonancia magnética nuclear (RMN), los principales compuestos encontrados fueron las C-glicosilflavonas, orientina e isoorientina, así como el ácido clorogénico. Adicionalmente, identificaron swertiajaponina, isoorientina-2-O-ramnósido y ácido cafeíco (Cheel y col., 2005).

Como se puede observar en la figura 6, la orientina e isoorientina, presentan en su estructura el doble enlace en los carbonos 2 y 3 en conjugación con un grupo carbonilo en el carbono 4 del anillo C, que es determinante para que posea actividad antioxidante (Pokorny y col., 2001). Mientras que el ácido clorogénico y el ácido cafeíco presentan la fracción catecol en su estructura, por lo cual se puede deducir que la señal obtenida tanto por voltamperometría cíclica como por voltamperometría diferencial de pulsos para el extracto de *C.citratus* es la suma de

todos los componentes con actividad antioxidante mencionados anteriormente, debido a las características estructurales de estos compuestos.

De acuerdo a Srivastava y Gupta en 2007, el extracto acuoso de *Matricaria chamomilla* contiene principalmente a los flavonoides: quercetina, apigenina y patuletina (Srivastava y Gupta, 2007).

En 2009, González por medio de VC a 100 mV/s y por VDP con una amplitud de pulso de 70 mV y velocidad de barrido de 5 mV/s, a varios valores de pH 2, 5, 7.5 y 10, encontró que la apigenina no presenta señales de oxidación a potenciales bajos, por lo que no posee elevada capacidad antioxidante; esto se debe a que no presenta en su estructura al grupo catecol (Figura 24b) (González, 2009).

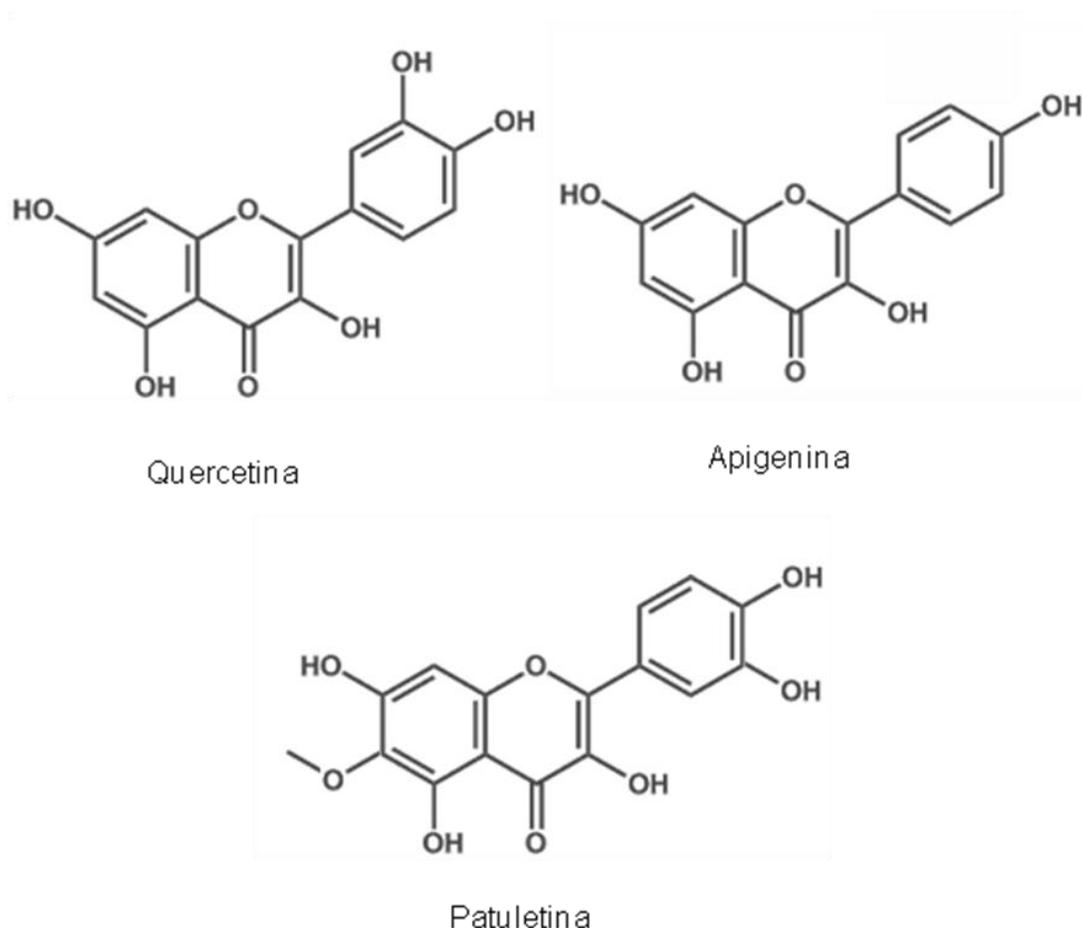


Figura 24. Principales flavonoides presentes en el extracto acuoso de *Matricaria chamomilla*.

Con lo anterior, se puede deducir, que las señales de oxidación observadas a bajos potenciales para el extracto de Matricaria chamomilla son debidas a la presencia de dichos flavonoides, conocidos como compuestos con elevada capacidad antioxidante.

## VIII. CONCLUSIONES

La técnica electroquímica VDP demostró ser sencilla, rápida, sensible y de bajo costo para el análisis la capacidad antioxidante de extractos de especies del género *Bursera* (Burseraceae), *Cymbopogon* y *Matricaria*, lo cual le da ventajas contra las técnicas espectrofotométricas.

Por medio de VC se logró obtener el comportamiento redox de los diferentes extractos, los resultados muestran que extractos metanólico y metanol-agua de las especies de *Bursera* presentaron un sistema irreversibile, mientras que, los extractos hexánicos no presentaron electroactividad significativa. En tanto que, el extracto metanólico de *Cymbopogon Citratus* y el acuoso de *Matricaria Chamomilla* presentaron un sistema irreversible.

El objetivo principal de este trabajo fue determinar la capacidad antioxidante de los diferentes extractos por VDP, los resultados muestran que los extractos de metanol y metanol-agua de especies de *Bursera*, el metanólico de *Cympogopon citratus*, así como el extracto acuoso de *Matricaria chamomilla* presentaron señales exhibidas a bajos potenciales de oxidación lo cual se traduce en una elevada capacidad antioxidante.

Resultados de los diferentes extractos de las especies de *Bursera* sugieren que las extracciones realizadas solo con metanol fueron más efectivas en la obtención de los compuestos electroactivos; mientras que, cuando se realizaron con hexano, la obtención de estos fue muy poca o prácticamente nula.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Barros, L., Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M., Ferreira, I C., 2008.** Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. Food Chemistry. Vol.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. Vol. 511:71–81.
- Bott, A., Jackson, B. 1996.** Study of ferricyanide by cyclic voltammetry using the CV-50W. Current separations. Vol.15: 25-30
- Campos, L. M. 2006.** Estudio fitoquímico de la resina de *Bursera simaruba* (palo mulato). Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Químico farmacéutico biólogo. 1, 8-10.
- Cheel, J., Theoduloz, C., Rodríguez, J., Schmeda-Hirschmann, G. 2005.** Free radical scavengers and antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf..). Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 53: 2511- 2517.
- Chen, H., Liang H., Ding, J., Lai, J., Huan, Y., Qiao X. 2007.** Rapid differentiation of tea products by surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 55:10093-10100.
- Conn, E. 1981.** The Biochemistry of plants. A comprehensive Treatise Vol. 7. Academic Press, USA: 1-2.
- Costa, J. M. 1981.** Fundamentos de electródica: cinética electroquímica y sus aplicaciones. Alhambra, Madrid: 86-87.
- Duthie, G., 1999.** Antioxidant food supplements in human health by academic press, USA: 35-40.
- González, F. 2009.** 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. Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestro en ciencias y tecnología de alimentos. 51-52.

**Hernández**, H. J., Román M. L., Cerda G. C., Joseph N. P. **2005** Verticillane derivatives from *Bursera suntui* and *Bursera kerberi*. *Journal of Natural Products*. Vol. 68:1598-1602.

**Janeiro**, P., Corduneanu, O., Oliveira B., **2004**. Chrysin and (±)-taxifolin electrochemical oxidation mechanisms. *Electroanalysis*. Vol. 17:1059-1064.

**Kilmartin**, P., Zou, H., Waterhouse, A. **2001**. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 49:1957-1965.

**Kissinger**, P., Bott, A. **2002**. Electrochemistry for the non-electrochemist. *Current Separations*. Vol. 20:51-53.

**Korotkova**, E.I., Karbainov, Y.A., Shevchuk, A.V., **2002**. Study of antioxidant properties by voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Vol. 518: 56-60.

**Liu**, Y., Nair G.M. **2010**. An efficient and economical MTT assay for determining the antioxidant activity of plant natural product extracts and pure compounds. *Journal of Natural Products*. Vol. 73:1193-1195.

**Mabbott**, A.G. **1983**. An introduction to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*. Vol. 60: 697-706

**Martinez-Valverde**, I., Periago, M. J., Ros, G. **2000** Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. Vol. 50: 5-18.

**Martins**, R., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Lopes, V., Guedes, P., Oliveira, C., Silva. **2008**. Oxidation management of white wines using cyclic voltammetry and multivariate process monitoring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 56:12092–12098.

**Masuda**, T., Odaka, Y., Ogawa, N., Nakamoto, K., Kuninaga, H. **2008**. Identification of geranic acid, a tyrosinase inhibitor in lemongrass (*Cymbopogon citratus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 56:597-601.

**Morello**, M., Shahidi F., Ho C. **2002**, Free radicals in foods: chemistry, nutrition, and health effects, ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, DC: 1-9.

**Mukhopadhyay, M. 2000.** Natural extracts using supercritical carbon dioxide. CRC Press, USA: 225-226.

**Patil, B., Jayaprakasha, K., Chidambara, N., Vikram A. 2009.** Bioactive compounds: Historical perspectives, opportunities, and challenges. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 57:8142-8160.

**Peraza, S., Peña L. 1992** Isolation of picropolygamain from the resin of *Bursera simaruba*. Journal of Natural Products. Vol. 55:1768-1771.

**Peraza, S., Salazar, N., Peña, L., 1995.** A new triterpene from the resin of *Bursera simaruba*. Journal of Natural Products. Vol. 58:271-274.

**Pietta, P., Simonetti, P., Mauri, P. 1998.** Antioxidant activity of selected medicinal plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 46:4487-4490.

**Pokorny, J., Yanishlieva N., Gordon M., 2001.** Antioxidants in food. Practical applications. First published. Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, USA: 46-56.

**Prior, R., 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. Vol. 53:4290-4302.

**Rice-Evans, C. 1999.** Antioxidant food supplements in human health. Academic Press, Japan: 240-243

**Roginsky, V., Barsukova, T., Hsu, F.C., Kilmartin, P. 2003.** Chain-breaking antioxidant activity and cyclic voltammetry characterization of polyphenols in a range of green, oolong, and black teas. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 51: 5798-5802.

**Romani, A., Minunni, M., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F. 2000.** Comparison among differential pulse voltammetry, amperometric biosensor, and HPLC/DAD analysis for polyphenol determination. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 48:1197-1203.

**Schaneberg, B., Khan, I., 2002,** Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemon grass by GC. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 50:1345.1349,

- Shahidi, F., Ho, C. 2007.** Antioxidant measurement and applications: an overview, ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, DC: 2-6.
- Srivastava, J., Gupta, S. 2007.** Antiproliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 55: 9470-9478.
- Viuda-Martos, M., El Gendy A., Sendra E., Fernández, J., El Razik, A., Omer, E., Pérez, J.A. 2010.** Chemical composition and antioxidant and anti-*Listeria* activities of essential oils obtained from some egyptian plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 58: 9063-9070.
- Wang, J. 2001.** Analytical electrochemistry, Segunda edición. Jhon Wiley and Sons, New York: 2, 28-30, 67-71.
- Wildman, R. 2001.** Handbook of nutraceuticals and functional foods. CRC Press., USA: 2, 237-240.
- Wolfe, K., Hai, R. 2008.** Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 56: 8404–8411.
- Zielinska, D., Szawara-Nowak, D., Ornatowska, A., Wiczowski. 2007.** Use of cyclic voltammetry, photochemiluminescence, and spectrophotometric methods for the measurement of the antioxidant capacity of buckwheat sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 55: 9891–9898.