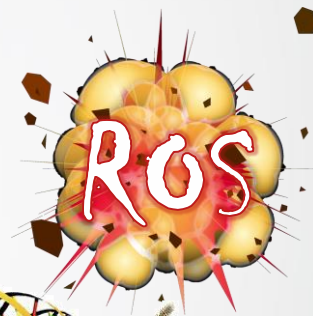
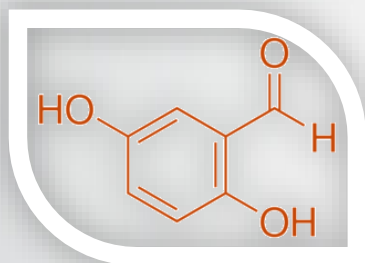


TESIS DOCTORAL

ANTIOXIDANTES ALIMENTARIOS: MECANISMOS DE OXIDACIÓN ELECTRÓDICA, MEDIDA ELECTROQUÍMICA DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPOSICIÓN EN TÉS, INFUSIONES Y ESPECIAS



Rafael Estévez Brito
2016



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

TITULO: ANTIOXIDANTES ALIMENTARIOS: MECANISMOS DE OXIDACIÓN
ELECTRODICA, MEDIDA ELECTROQUIMICA DE CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE Y COMPOSICION EN TES, INFUSIONES Y
ESPECIAS

AUTOR: *Rafael Estévez Brito*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2016
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA

Y

TERMODINÁMICA APLICADA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**ANTIOXIDANTES ALIMENTARIOS. MECANISMOS DE OXIDACIÓN
ELECTRÓDICA, MEDIDA ELECTROQUÍMICA DE CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE Y COMPOSICIÓN EN TÉS, INFUSIONES Y
ESPECIAS**

**Tesis Doctoral
Rafael Estévez Brito
Córdoba, 2016**

Trabajo presentado para optar al Grado de Doctor en Química




Fdo.: Rafael Estévez Brito
Licenciado en Ciencias Químicas

Título de Tesis:

**ANTIOXIDANTES ALIMENTARIOS: MECANISMOS DE OXIDACIÓN
ELECTRÓDICA, MEDIDA ELECTROQUÍMICA DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
Y COMPOSICIÓN EN TÉS, INFUSIONES Y ESPECIAS**

Los directores del trabajo:



Fdo.: José Miguel Rodríguez Mellado
Catedrático del Departamento de
Química Física y
Termodinámica Aplicada
Universidad de Córdoba



Fdo.: Mercedes Ruiz Montoya
Profesora Titular adscrita al
Departamento de Ingeniería
Química, Química Física y
Química Orgánica
Universidad de Huelva



TÍTULO DE LA TESIS: ANTIOXIDANTES ALIMENTARIOS. MECANISMOS DE OXIDACIÓN ELECTRÓDICA, MEDIDA ELECTROQUÍMICA DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPOSICIÓN EN TÉS, INFUSIONES Y ESPECIAS

DOCTORANDO: Rafael Estévez Brito

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

El trabajo presentado como Tesis Doctoral por D. Rafael Estévez Brito, ha sido realizado bajo nuestra dirección en los laboratorios del Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada de la Universidad de Córdoba y en los laboratorios Joseph Banks de la School of Life Sciences de la Universidad de Lincoln, Inglaterra, y reúne las condiciones exigidas según la legislación vigente.

Durante la elaboración de la Tesis la labor del doctorando ha sido altamente satisfactoria, desarrollando las tareas de investigación según el plan de trabajo marcado para alcanzar los objetivos previstos. En el proceso, el doctorado ha demostrado su iniciativa, tanto en el diseño de nuevos experimentos como en la consecución de los objetivos, contribuyendo a la interpretación y discusión de los resultados y a establecer las conclusiones del trabajo. Su estancia en la universidad de Lincoln ha permitido una colaboración con los especialistas de la misma que ha contribuido a mejorar los aspectos teóricos y prácticos del trabajo.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 18 de marzo de 2016

Firma de los directores

Fdo.: José Miguel Rodríguez Mellado

Fdo.: Mercedes Ruiz Montoya

Mediante la defensa de esta memoria se pretende optar a la obtención de la mención de “Doctorado Internacional”, habida cuenta que el doctorando reúne los requisitos exigidos para tal mención:

1. Se cuenta con informes favorables de dos doctores expertos, con experiencia investigadora acreditada, pertenecientes a alguna institución de educación superior o instituto de investigación fuera de España.

2. En el Tribunal, que ha de evaluar la Tesis, existe un miembro de un instituto de educación superior o centro de investigación de un país distinto al nuestro.

3. Parte de la redacción y defensa de esta Memoria se realizará en una de las lenguas habituales para la comunicación científica y distinta a cualquiera de las lenguas oficiales en España.

4. El doctorando ha realizado dos estancias de investigación en la School Of Life Sciences de la University Of Lincoln (Lincoln, England, de más de tres meses cada una, siendo una de ellas gracias a la concesión de una ayuda para la movilidad con objeto de obtener el Doctorado con Mención Internacional, concedida por la Universidad de Córdoba.

La investigación realizada en la presente Memoria, forma parte de la programación plurianual de actividades del Grupo de Investigación FQM-198 de la Universidad de Córdoba, para la cual ha recibido financiación a través de:

- El apoyo financiero de la Junta de Andalucía a los Grupos de investigación FQM-198, RNM-371 y FQM-348.
- El apoyo financiero de la CICYT dentro del marco del proyecto CTQ 2011-28937.
- El apoyo financiero de la Universidad de Córdoba en el marco de las "Ayudas puente para el Desarrollo de Proyectos de I + D precompetitivos 2015".

Agradecimientos.

Me gustaría empezar agradeciendo la labor desarrollada por los directores de tesis, José Miguel y Mercedes. A José Miguel, en primer lugar por haber apostado por mí, por su paciencia y por ser tan “polvorilla”. Siempre con unas ganas de trabajar y una curiosidad contagiosas, que me han llevado a aprender mucho, además de química. A Mercedes me gustaría agradecerle el estar ahí para lo que hemos necesitado, aportando su granito de arena siempre en momentos decisivos.

Por supuesto, agradecer a mis padres su apoyo, desde que nací hasta este momento, inculcándome valores y enseñándome...haciéndome como soy hoy en día, especialmente mis cosas buenas. Recuerdo con especial cariño a mi madre, cuando era pequeño y estábamos de vacaciones, y me ponía a mezclar todo lo que sobraba de la comida en vasos, porque me llamaba la atención ver las distintas fases que se formaban...y “guarreaaba” (como ella me decía)...supongo que fue el hecho que los llevó a regalarme mi Quimicefa en Navidad. También, especialmente a mi padre, que me ha inculcado la constancia en el trabajo, y que se sentaba las horas conmigo para hacer las “tareas de mates”, repasar la tabla periódica, o lo que surgiese. Muchas Gracias a los dos.

También me gustaría agradecer el apoyo de todos los compañeros del departamento, comenzando por Sara, con la que he pasado tantas tardes de los viernes haciendo voltametría y compartiendo una caja de donettes. Gente maravillosa como “mi Guadita”; mi compi de despacho a la que tanto he torturado con la música, por si no tenía bastante con estar embarazada y escribiendo la tesis, Luisa; Toñi, que al principio me denominaba “el muchacho del bocata”... ¿qué sería la hora de comer sin un poco de chinche entre nosotros?; a Pilar, una compañera de grupo “tela de apañá” y a la que deseo toda la suerte del mundo (y que no se ponga muy nerviosa), para su lectura, que ya le queda poco; Alain, a quien también deseo mucha suerte... ¡Ánimo, que eres el siguiente!; y por supuesto a dos grandes amigos que me llevo de esta experiencia, Mauri y Alex, sois geniales. También a Alberto Palma de la Universidad de Huelva, un compañero en la distancia que ha contribuido significativamente al desarrollo de esta

investigación. A los “profes”, que por suerte siempre han sido tan llanos y cercanos conmigo, ayudando siempre en todo lo que han podido: Mari Tere, que es como una compañera más y me ha hecho sentir siempre tan a gusto en el departamento; Teresa, Elo, Manolo (Sr. Decano), Luis, José Manuel, José Luis, Rafa, Marta, muchas gracias a todos por todo. A Gustavo, de las últimas “adquisiciones” del departamento, pero que crea tan “buenrollismo” en el laboratorio.

Me gustaría extender el agradecimiento a los compañeros de los laboratorios de Lincoln. A José González por haberme tratado tan bien, especialmente durante las estancias, siempre buscando un hueco para preguntar cómo iban las cosas, claro que como su tiempo es extremadamente limitado, lo mejor era hablarlo en The Shed o en algún sitio de los que conoce en la ciudad (¿qué le íbamos a hacer?...). A Leonie y a Tom, los técnicos de laboratorio, que siempre estaban dispuestos a echar una mano en todo cuanto hiciera falta, solucionando cualquier problema de la forma más rápida y eficaz, lo que transmitía una gran seguridad a la hora de trabajar con técnicas y equipos nuevos para mí, tan sólo por tenerlos a ellos en el laboratorio. Y por supuesto, a “the Boss” (my very good friend Bakhtiyar) y a “the King” (Samuel), que siendo cada uno de una punta del mundo, al menos a mí, me hicieron sentir como en casa.

Y cómo no, aunque no esté en este edificio, pero sí en este departamento, en el área de motores, a Micky (Miguel Carmona), simplemente decir que MUCHAS GRACIAS por todo, y sabes que me quedo corto, ya que eres lo más parecido a un hermano que tengo.

Por último, y para nada menos importante, agradecer la oportunidad que me ha brindado este departamento, tanto a nivel profesional como personal, ya que me ha permitido conocer a muchas personas, y también reencontrarme con otras. Ahí es donde entra ella, Rebeca (mi “Rubi”), a la que quiero agradecer simplemente que sea como es, por su apoyo, por su cariño y por su paciencia (a veces creo que infinita), ya que me hace sentir el más afortunado del mundo, algo que deseo para la nueva etapa que comienza en mi vida, y por supuesto, para todas las que vengan.

A mis padres,
y a Rebeca

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN: 1

- 1.1. El Estrés Oxidativo: 3
 - 1.1.1. El Estrés Oxidativo en la Salud Humana: 3
 - 1.1.2. Daño biomolecular ocasionado por el estrés oxidativo: 5
 - 1.1.2.1. Daño oxidativo a Proteínas: 5
 - 1.1.2.2. Daño oxidativo a Lípidos: 6
 - 1.1.2.3. Daño oxidativo a Glúcidos: 7
 - 1.1.2.4. Daño Oxidativo al ADN: 7
- 1.2. Los Radicales libres y las Especies Reactivas de Oxígeno como especies oxidantes: 8
 - 1.2.1. Los Radicales Libres: 8
 - 1.2.2. Principales ROS: 8
 - 1.2.2.1. Oxígeno Singlete: 9
 - 1.2.2.2. Anión radical superóxido y radical hidropéroxilo: 10
 - 1.2.2.3. Peróxido de Hidrógeno: 11
 - 1.2.2.4. Radical Hidroxilo: 11
 - 1.2.2.5. Radical alcoxilo y radical péroxilo: 12
 - 1.2.2.6. Ozono: 12
 - 1.2.3. Formación de Radicales Libres: 13
 - 1.2.3.1. Fuentes Exógenas: 13
 - 1.2.3.2. Fuentes Endógenas: 14
- 1.3. Los Antioxidantes: 15
 - 1.3.1. Antioxidantes Fenólicos: 16
 - 1.3.2. Clasificación de los Compuestos Fenólicos: 17
 - 1.3.3. Los Compuestos Fenólicos en la dieta: 17
 - 1.3.4. La Actividad Antioxidante de los Compuestos Fenólicos: 18
 - 1.3.5. Determinación de la Actividad Antioxidante: 18
 - 1.3.5.1. Reacciones SET y reacciones HAT: 19
 - 1.3.5.1.1. Métodos antioxidantes que utilizan mecanismos SET: 21
 - 1.3.5.1.1.1. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power): 21
 - 1.3.5.1.1.2. CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity): 21
 - 1.3.5.1.1.3. DMPD (N,N-Dimethylphenylenediamine Dihydrochloride): 22
 - 1.3.5.1.2. Métodos antioxidantes que utilizan mecanismos HAT: 22
 - 1.3.5.1.2.1. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity): 22
 - 1.3.5.1.2.2. TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter): 22
 - 1.3.5.1.2.3. CBA (Crocin Bleaching Assay): 22
 - 1.3.5.1.2.4. TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substances): 23
 - 1.3.5.1.2.5. TOSC (Total Oxyradical Scavenging Capacity): 23
 - 1.3.5.1.2.6. LDL's (Low Density Lipoprotein): 23
 - 1.3.5.1.2.7. Ensayo de la Desoxirribosa: 24

1.3.5.1.2.8. Ensayo de la Xantina Oxidasa:	24
1.3.5.1.3. Métodos antioxidantes que utilizan mecanismos SET y HAT:	25
1.3.5.1.3.1. ABTS(2,2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulphonic Acid - Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico):	25
1.3.5.1.3.2. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity - Capacidad Antioxidante Equivalente en Trolox):	25
1.3.5.1.3.3. DPPH (1,1-Difenil-2-Picrilhidrazilo):	26
1.3.5.1.4. Técnicas Electroquímicas:	28
1.4. Técnicas Cromatográficas en el estudio de la composición de extractos de tés, infusiones y especias: componentes principales y antioxidantes:	31
1.5. Bibliografía:	36
Summary:	46

CAPÍTULO II: NUEVOS MÉTODOS DE MEDIDA ELECTROQUÍMICA DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE: 49

2.1. Introducción:	53
2.2. Objetivos de este capítulo:	54
2.3. Experimental:	55
2.3.1. Instrumental:	55
2.3.2. Electroodos:	55
2.3.3. Reactivos y disoluciones:	55
2.3.4. Condiciones de trabajo:	56
2.3.5. Procedimiento de trabajo en la simulación del daño a ácidos nucleicos:	57
2.4. Resultados y Discusión:	60
2.4.1. Simulación del daño a ácidos nucleicos:	60
2.4.1.1. Optimización de variables para la inmovilización de los nucleósidos Adenosina y Guanosina sobre GCE:	60
2.4.1.1.1. Adenosina:	60
2.4.1.1.2. Guanosina:	65
2.4.1.1.3. Adenosina + Guanosina:	70
2.4.1.2. Optimización de variables para la inmovilización de los nucleósidos Adenosina y Guanosina sobre CPE:	72
2.4.1.2.1. Guanosina:	73
2.4.1.2.1. Adenosina:	76
2.4.1.3. Validación del sensor con GCE:	77
2.4.1.4. Validación del sensor con CPE:	80
2.4.2. Uso de un hidroperóxido sintético:	81
2.5. Bibliografía:	91
Summary:	92

CAPÍTULO III: MECANISMOS DE OXIDACIÓN ELECTROQUÍMICA DE ANTIOXIDANTES: 95

- 3.1. Introducción: 97
- 3.2. Objetivos del capítulo: 98
- 3.3. Experimental: 98
 - 3.3.1. Instrumental: 98
 - 3.3.2. Células y electrodos: 99
 - 3.3.3. Reactivos y disoluciones: 100
 - 3.3.4. Condiciones de trabajo: 100
- 3.4. Resultados y Discusión: 102
 - 3.4.1. Oxidación electroquímica del sesamol: 102
 - 3.4.1.1. Determinación de la constante de disociación: 102
 - 3.4.1.2. Mecanismo de oxidación sobre electrodo de carbón vitrificado: 105
 - 3.4.2. Constantes de disociación de los grupos fenólicos de ácido gálico y 2,4- y 2,5- dihidroxibenzaldehídos en relación con sus actividades antioxidantes: 127
 - 3.4.3. Mecanismo de oxidación del 2,5-dihidroxibenzaldehído sobre GCE: 138
- 3.5. Bibliografía: 160
- Summary: 163

CAPÍTULO IV: COMPOSICIÓN DE EXTRACTOS ALIMENTARIOS EN RELACIÓN CON LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE: 165

- 4.1. Introducción: 169
- 4.2. Objetivos del Capítulo: 177
- 4.3. Materiales y Métodos: 177
 - 4.3.1. Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas (CG-EM): 178
 - 4.3.1.1. Preparación de las Muestras/Extractos: 178
 - 4.3.1.2. Método utilizado en CG-EM: 178
 - 4.3.2. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC): 179
 - 4.3.2.1. Preparación de las muestras/extractos: 179
 - 4.3.2.2. Método utilizado en HPLC: 180
- 4.4. Resultados de CG-EM: 184
 - 4.4.1. Tés: 190
 - 4.4.1.1. Té Blanco: 190
 - 4.4.1.2. Té Negro: 192
 - 4.4.1.3. Té Rojo: 194
 - 4.4.1.4. Té Verde: 195
 - 4.4.1.5. Mezcla de 3 Tés: 197
 - 4.4.2. Infusiones: 199
 - 4.4.2.1. Manzanilla: 199
 - 4.4.2.2. Menta-Poleo: 201

- 4.4.2.3. Rooibos: 203
- 4.4.2.4. Salvia: 205
- 4.4.2.5. Tila: 207
- 4.4.3. Especias: 209
 - 4.4.3.1. Albahaca: 209
 - 4.4.3.2. Canela en polvo: 212
 - 4.4.3.3. Canela en rama: 214
 - 4.4.3.4. Clavo: 215
 - 4.4.3.5. Comino: 216
 - 4.4.3.6. Cúrcuma: 218
 - 4.4.3.7. Jengibre: 221
 - 4.4.3.8. Nuez Moscada: 224
 - 4.4.3.9. Orégano: 226
 - 4.4.3.10. Romero: 228
 - 4.4.3.11. Tomillo: 230
- 4.5. Resultados de HPLC: 233
 - 4.5.1. Tés: 236
 - 4.5.1.1. Té Blanco: 236
 - 4.5.1.2. Té Negro: 238
 - 4.5.1.3. Té Rojo: 240
 - 4.5.1.4. Té Verde: 241
 - 4.5.1.5. Mezcla de 3 Tés: 243
 - 4.5.2. Infusiones: 246
 - 4.5.2.1. Manzanilla: 246
 - 4.5.2.2. Menta-Poleo: 247
 - 4.5.2.3. Rooibos: 248
 - 4.5.2.4. Salvia: 249
 - 4.5.2.5. Tila: 250
 - 4.5.3. Especias: 251
 - 4.5.3.1. Albahaca: 251
 - 4.5.3.2. Canela en polvo: 252
 - 4.5.3.3. Canela en rama: 254
 - 4.5.3.4. Clavo: 255
 - 4.5.3.5. Comino: 256
 - 4.5.3.6. Cúrcuma: 257
 - 4.5.3.7. Jengibre: 258
 - 4.5.3.8. Nuez Moscada: 259
 - 4.5.3.9. Orégano: 260
 - 4.5.3.10. Romero: 261
 - 4.5.3.11. Tomillo: 262
- 4.6. Comparativa de los extractos en agua y en metanol obtenidos en CG-EM: 264
 - 4.6.1. Tés: 264
 - 4.6.1.1. Té Blanco: 264
 - 4.6.1.2. Té Negro: 264

4.6.1.3. Té Rojo:	265
4.6.1.4. Té Verde:	265
4.6.1.5. Mezcla de 3 Tés:	265
4.6.2. Infusiones:	266
4.6.2.1. Manzanilla:	266
4.6.2.2. Menta-Poleo:	266
4.6.2.3. Rooibos:	267
4.6.2.4. Salvia:	267
4.6.2.5. Tila:	268
4.6.3. Especias:	269
4.6.3.1. Albahaca:	269
4.6.3.2. Canela en polvo:	270
4.6.3.3. Canela en rama:	270
4.6.3.4. Clavo:	271
4.6.3.5. Comino:	271
4.6.3.6. Cúrcuma:	272
4.6.3.7. Jengibre:	273
4.6.3.8. Nuez Moscada:	274
4.6.3.9. Orégano:	274
4.6.3.10. Romero:	275
4.6.3.11. Tomillo:	276
4.6.4. Comentarios sobre los resultados obtenidos en CG-EM y HPLC:	277
4.7. Comparativa del Contenido en Antioxidantes de los extractos en agua y en metanol:	279
4.7.1. Tés:	279
4.7.2. Infusiones:	281
4.7.3. Especias:	282
4.8. Bibliografía:	284
Summary:	287

CAPÍTULO V: CONCLUSIONS: 293

ANEXO: 301

Artículos y Comunicaciones a Congresos

CAPÍTULO I



INTRODUCCIÓN

1.1. El Estrés Oxidativo

1.1.1. El Estrés Oxidativo en la Salud Humana

En nuestro planeta existe una gran cantidad de oxígeno y, por tanto, en la naturaleza casi todos los materiales se oxidan: las grasas se enrancian, los tornillos se cubren de óxido, la goma pierde elasticidad, el papel se amarillea, la fruta madura y se pudre, etc. Estas reacciones de óxido-reducción son muy importantes ya que los seres vivos obtienen la mayor parte de su energía a partir de ellas, por ejemplo, en la fotosíntesis y en el metabolismo aeróbico.

A pesar de que el oxígeno es imprescindible para la vida, puede ser también fuente de enfermedades a través de una producción incontrolada de radicales libres entre los que se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS: “*Reactive Oxygen Species*”), que dañan las macromoléculas (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) y alteran los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, etc.) [1-3]. Estos ROS son iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Físicamente, son moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a sus de electrones desapareados. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular, pero en épocas de estrés ambiental sus niveles pueden aumentar mucho, rompiendo el equilibrio y provocando daños significativos a las estructuras celulares, provocando una situación conocida como *estrés oxidativo*.

Los radicales libres son moléculas que se producen durante muchas reacciones metabólicas, mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía, especialmente en situaciones de hiperoxia, ejercicio intenso e isquemia, aunque también se producen por exposición a determinados agentes externos como las radiaciones ionizantes o luz ultravioleta, contaminación ambiental, humo del tabaco, etc.

Las ROS inorgánicas más importantes son: el oxígeno molecular O_2 , el radical-anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y su precursor, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). También hay ROS orgánicos como el radical peroxilo (ROO^{\cdot}), el hidroperóxido orgánico (ROOH) y los lípidos peroxidados.

Gran parte de las ROS desempeñan papeles fisiológicos de vital importancia, aunque también se encuentran implicadas en reacciones de oxidación no deseadas, frente a las que el organismo ha desarrollado ciertas defensas antioxidantes [4]. La producción endógena de una determinada cantidad de ROS en condiciones normales, sin sobrepasar unos límites concretos, es un proceso celular normal e inevitable exento del más mínimo daño oxidativo gracias a la provisión por parte de la célula, que resulta imprescindible para la vida de ésta por ser un proceso implicado en la regulación y producción de energía metabólica, activación o inactivación de biomoléculas, etc.[5-10] y que cuenta

Capítulo 1

con mecanismos antioxidantes con los que la célula combate estos daños. Sin embargo, en el momento en que tiene lugar un aumento considerable de la velocidad de formación de ROS con respecto a lo establecido en condiciones normales, casi siempre se origina como consecuencia una disminución de los propios mecanismos de defensa, derivando en una situación de desequilibrio entre las especies oxidantes (más numerosas ahora) y las antioxidantes, lo que origina unos daños oxidativos importantes sobre determinadas moléculas presentes en el organismo, reflejándose en sus funciones biológicas. El balance existente entre los agentes oxidantes y antioxidantes determinará el estado redox, manteniendo una “homeostasis redox” o estado de equilibrio de las condiciones de oxidación-reducción finales.

En oposición a los radicales libres, se encuentran los antioxidantes, que son sustancias que presentes en concentraciones bajas, en comparación con el sustrato oxidable, retrasan significativamente o evitan la oxidación de éste [11, 12]. En función de cómo interaccionan con los agentes oxidantes, los antioxidantes pueden ser:

- Antioxidantes primarios: impiden la formación de radicales libres, especialmente las ROS. Algunos ejemplos de estos, son: la vitamina E [13], polifenoles como resveratrol [14] o enzimas antioxidantes, con lo que indirectamente reducen el daño en el ADN y en las membranas [15-16].

- Antioxidantes secundarios: interrumpen la propagación de radicales libres (ejemplos: α -tocoferol, ácido ascórbico) o desplazan las ROS (ejemplos: ácido ascórbico, carotenoides, glutatión y enzimas antioxidantes), inhibiendo la generación de ROS, e impidiendo la activación metabólica de carcinógenos [17-18].

- Antioxidantes terciarios: reparan el daño causado por los radicales libres o eliminan moléculas que se han estropeado, modificando el potencial redox mejorando la reparación del ADN [19-20]. Algunos ejemplos son: la vitamina C, polifenoles, selenio o N-acetilcisteína.

En la dieta humana, existen numerosos antioxidantes de especial interés debido a su posible acción protectora contra los radicales libres producidos por el estrés oxidativo. Los efectos dañinos de los radicales libres están controlados por una gran variedad de antioxidantes, como son los antioxidantes endógenos o propios del organismo (coenzima Q, glutatión, albúmina, transferrina, ceruloplasmina, ácido úrico, ácido tióctico, bilirrubina...), antioxidantes exógenos o adquiridos a través de la dieta (vitaminas E y C, carotenoides, flavonoides, escualeno, selenio, compuestos fenólicos...), enzimas antioxidantes (Superóxido-dismutasa (SOD), Catalasa, Glutatión-peroxidasa, Licopeno...) y Cofactores antioxidantes (Cobre, Magnesio, Manganeso, Selenio...).

El estrés oxidativo [21-24] es la exposición a diversas fuentes de formación de radicales libres que originan una alteración del equilibrio que debe existir entre las especies o

factores oxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de controlar la producción y/o propagación de las primeras. Este desequilibrio puede ser debido a un incremento brusco de las sustancias oxidantes (principalmente ROS), a una insuficiencia de agentes antioxidantes, o a una combinación de ambos factores. En estas circunstancias, las células se encuentran expuestas a un ambiente oxidante que genera efectos adversos sobre el estado redox celular, provocando daños reversibles o irreversibles a todo tipo de biomoléculas, incluyendo proteínas, lípidos, glúcidos, ácidos nucleicos (ADN)[25, 26] y componentes de la matriz extracelular, e iniciando una serie de reacciones químicas capaces de producir alteraciones en la relación estructura/función de órganos, sistemas o grupos celulares especializados, lo que está asociado directamente con un número creciente de síndromes de interés médico y social.

Se ha comprobado experimentalmente que más de un centenar de enfermedades se relacionan con el desequilibrio redox: procesos patológicos como la enfermedad de Erdheim-Chester [27], el Alzheimer [28], el Parkinson [29], la enfermedad de Crohn [30], ciertos tipos de cáncer [31-33], diabetes mellitus [34], patologías cardiovasculares [35], aterosclerosis[36], procesos reumáticos [37], patologías gastroentéricas [38] y afecciones broncopulmonares [39]. También los procesos fisiológicos como el envejecimiento [40], el daño causado por el ejercicio físico agotador [41], etc.

1.1.2. Daño biomolecular ocasionado por el estrés oxidativo

La naturaleza del daño ocasionado por el estrés oxidativo depende principalmente de dos factores: la reactividad del radical libre que lo produce y la disponibilidad de un sustrato susceptible de ser atacado en las proximidades de la formación de dicho radical libre. A pesar de la amplia variedad de daños que pueden darse, los mecanismos por los que se producen son comunes, y consisten en la captación de un átomo de hidrógeno, o de un electrón, de una determinada molécula cercana (molécula diana) por parte del radical libre, estabilizándose el electrón desapareado del radical mediante la formación de un par electrónico. De una u otra manera, se genera un nuevo radical que generalmente posee la reactividad de su predecesor (aunque en contadas ocasiones, puede no presentar reactividad).

1.1.2.1. Daño oxidativo a Proteínas

Hoy en día, existen pruebas experimentales que relacionan de manera directa los mecanismos de proteólisis con los radicales libres y su interacción con las proteínas [42]. Algunas de las proteínas implicadas, se caracterizan además por ser dianas de la acción de los radicales libres además de por su capacidad para generar o propagar estas especies reactivas. El daño oxidativo sobre las proteínas, además de modificarlas como sustrato implicado en los mecanismos proteolíticos, afecta también a éstos.

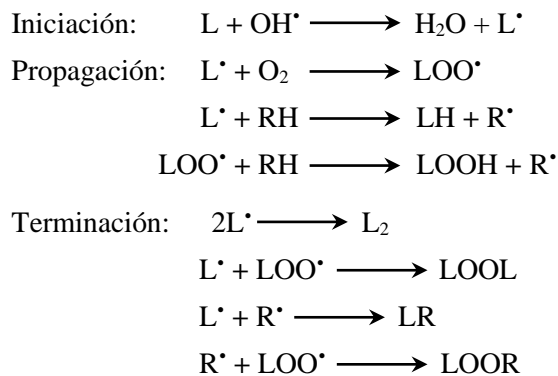
Capítulo 1

Los aminoácidos presentes en las proteínas presentan residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres. Los ataques que se producen pueden ser de naturaleza difusa dando lugar a modificaciones generalizadas, o por el contrario, ataques selectivos que modifican zonas específicas. Las modificaciones de tipo general, pueden producir la alteración de la estructura proteica, lo que tiene como consecuencia directa la pérdida o modificación de su función biológica, procesos de inactivación, fragmentación, desnaturalización y/o degradación proteica, alteraciones de funciones celulares como la producción de energía, interferencias en los potenciales de membrana y cambios en el tipo y nivel de proteínas celulares [43,44].

Los ataques selectivos son los que están catalizados por metales de transición, de manera que las enzimas que los poseen en su estructura, son las que presentan un mayor riesgo de este tipo de ataques [45]. La principal modificación que se da en la degradación proteolítica es la oxidación de grupos tioles de los aminoácidos [46], lo que origina que las proteínas con más grupos -SH se oxiden en un mayor grado con respecto a otras proteínas que resultan más resistentes frente a la eliminación mediante proteólisis celular, favoreciéndose la acumulación de las mismas [5]. Esta acumulación de proteínas dañadas, incrementa con el paso de los años como consecuencia del aumento de la velocidad de oxidación y/o la disminución de la capacidad degradativa de las mismas [47], lo que está intrínsecamente asociado al proceso de envejecimiento.

1.1.2.2. Daño oxidativo a Lípidos

El proceso de peroxidación lipídica o “enranciamiento” es el daño oxidativo más importante en los lípidos. Consiste en un daño de los tejidos que puede ser iniciado por diversos ROS: O_2 , el 1O_2 , el H_2O_2 y el OH^\bullet , y afecta a estructuras con alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, presentes en cantidades importantes en las membranas celulares. Cuanto mayor es el número de dobles enlaces en la estructura del lípido, éste es más susceptible de ser atacado [48]. El enranciamiento es un proceso continuo y fisiológico que en condiciones normales actúa como un renovador de membranas biológicas, pero cuando su activación es excesiva se relaciona con la patogénesis de numerosas enfermedades y ciertos procesos patológicos de interés: Alzheimer, diabetes mellitus, etc. [49, 50]. Es un proceso que consta de tres etapas fundamentales: iniciación, propagación y terminación [48]:



1.1.2.3. Daño oxidativo a Glúcidos

Algunos polisacáridos tienen funciones protectoras, mientras que la mayoría de los monosacáridos se autooxidan en condiciones fisiológicas formando cetoaldehídos e intermediarios como el radical $O_2^{\bullet-}$, el cual es captado por moléculas de glucosa impidiendo su posterior acción radical. Algunos monosacáridos como la manosa o el manitol, presentan también la capacidad de capturar radicales tales como OH^{\bullet} y el $O_2^{\bullet-}$ [51], pese a esto, los radicales libres provocan una importante disminución del contenido de ATP intracelular, alterando así la vía glucolítica y mitocondrial.

1.1.2.4. Daño Oxidativo al ADN

A pesar de que el ADN es una molécula bien protegida, es propenso al daño oxidativo [52], especialmente por parte de los radicales OH^{\bullet} y $H_2 O_2^{\bullet-}$ [26, 53], centrado principalmente en sus bases nitrogenadas. La alteración más frecuente de las bases púricas consiste en la abstracción de un protón de la posición C-8 de la guanina por parte del radical OH^{\bullet} , originando el nucleósido 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG), de elevado efecto mutagénico. Los glicoles de timina y citosina, así como los hidratos de pirimidina, dan lugar a la fragmentación del ADN. La cuantificación de la formación de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG), se utiliza como indicador de la extensión del daño oxidativo sobre el ADN [54].

Las enzimas reparadoras de los fragmentos dañados no son capaces de eliminar las lesiones oxidativas en su totalidad [55], y se van acumulando produciendo un aumento gradual y permanente de mutaciones con la edad, generándose diversos procesos patológicos relacionados con este tipo de daño, como carcinogénesis y envejecimiento. También pueden originar mutaciones, roturas espontáneas en las cromátidas y pérdida de fragmentos cromosómicos, llegando incluso a provocar la pérdida total de cromosomas en situaciones extremas [56].

1.2. Los Radicales libres y las Especies Reactivas de Oxígeno como especies oxidantes

1.2.1. Los Radicales Libres

Desde un punto de vista químico, un radical libre (RL) es una especie química, átomo, molécula, o fragmento de molécula, que posee al menos un electrón desapareado, bien por pérdida o ganancia, en su orbital más externo [57]. Puede presentar carga.

La presencia del electrón desapareado, conlleva un momento magnético que da lugar a propiedades paramagnéticas, y a inestabilidad en la configuración electrónica, lo que se traduce en una elevada reactividad para conseguir una mayor estabilidad [58].

La forma en que el radical libre reacciona con otros compuestos químicos puede ser:

- El radical cede su electrón desapareado (radical reductor).
- El radical toma un electrón de una molécula estable apareando así su propio electrón (radical oxidante).
- El radical se enlaza covalentemente a una molécula estable.

En cualquier caso, el radical compensa su orbital incompleto desestabilizando la configuración electrónica del compuesto químico con el que reacciona, lo que provoca la formación de un nuevo radical libre [59], aunque también pueden formarse radicales libres por ruptura homolítica de una molécula estable [60].

De esta forma, los radicales libres dan lugar a reacciones en cascada con formación continua de especies altamente reactivas. La única forma de finalizar este proceso de reacción/formación de radicales libres, es que coincidan dos radicales que puedan combinar sus electrones desapareados y unirse mediante un enlace covalente, aunque en ocasiones, pueden formarse especies estables como radicales [61]. La alta reactividad de los radicales libres, es la responsable de su toxicidad y de su corta vida media [62, 63].

1.2.2. Principales ROS

Los radicales libres más destacados son las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species), no sólo por su elevada abundancia procedente de la respiración aeróbica, sino también por sus conocidas implicaciones en procesos relevantes como el deterioro de alimentos, el envejecimiento celular y una gran diversidad de patologías de enfermedades crónico-degenerativas [64-67]. En la Tabla 1 se indican las principales especies reactivas de oxígeno (ROS) [65].

Especies Radicales	Especies NO Radicales
Anión Superóxido $O_2^{\cdot-}$	Oxígeno Singlete 1O_2
Hidroxilo OH^{\cdot}	
Hidroperoxilo HO_2^{\cdot}	Ozono O_3
Alcoxilo RO^{\cdot}	Peróxido de Hidrógeno H_2O_2
Peroxilo RO_2^{\cdot}	

Tabla 1. Principales ROS

De manera análoga a las ROS, existen especies reactivas de nitrógeno (RNS), de cloro (RCIS) y de bromo (RBrS).

El oxígeno tiene dos electrones desapareados en su orbital más externo, lo que proporciona carácter paramagnético a la molécula y hace que la molécula de O_2 sólo interactúe con radicales cuyos electrones tengan spin complementario a los suyos, fenómeno conocido como “restricción de spin”, lo que previene la adición directa de un par de electrones hacia la molécula, ya que sería necesaria la inversión del spin de uno de los electrones antes de la unión, lo cual está impedido por el Principio de Exclusión de Pauli. Como este proceso de inversión de spin es relativamente lento comparado con la vida media de los elementos en contacto con el oxígeno, la molécula de oxígeno en su estado fundamental se comporta como un oxidante relativamente débil, permitiendo la coexistencia de la materia orgánica y el oxígeno libre.

El oxígeno es un aceptor final de electrones en la respiración celular, donde se lleva a cabo la reducción del oxígeno (en este caso tetravalente) para producir agua en la cadena de transporte electrónico. A pesar de que éstos son procesos seguros (no se crean ROS), el ambiente reductivo del medio intracelular favorece la reducción del O_2 en su estado fundamental, con formación de ROS. Esta es la principal causa del envejecimiento, lo que se conoce como la *paradoja del oxígeno* [68].

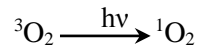
1.2.2.1. Oxígeno Singlete

El Oxígeno singlete (1O_2) se corresponde con el estado electrónicamente excitado de menor energía del oxígeno molecular, en el que los dos electrones albergados en orbitales antienlazantes se disponen con spines opuestos, dando como resultado un carácter fuertemente oxidante, y en consecuencia, una especie electrófila altamente reactiva, a pesar de no tratarse de un radical libre propiamente dicho.

Esta ROS se genera cuando el oxígeno molecular en estado fundamental (triplete) absorbe energía electromagnética e invierte de manera transitoria el spin de uno de sus

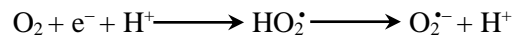
Capítulo 1

electrones desapareados, consiguiendo así una orientación antiparalela del spin de los electrones de los orbitales antienlazantes más externos [69, 70].

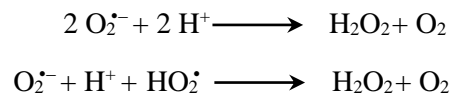


1.2.2.2. Anión radical superóxido y radical hidropéroxilo

El anión radical superóxido es un radical libre cargado negativamente que se forma por la reducción univalente del oxígeno molecular. Se origina en todas las células eucariotas animales, generalmente en la mitocondria [1-3] y el retículo endoplasmático [71]. Durante la respiración celular, aproximadamente entre el 1% y el 2% de los electrones transportados en la cadena respiratoria mitocondrial no participan en la reducción completa de oxígeno a agua, sino en la formación de este radical [3].



El radical $\text{O}_2^{\bullet -}$ es la base conjugada de un ácido débil, el radical hidropéroxilo (HO_2^\bullet), capaz de atravesar membranas y actuar como molécula bio-señalizadora en el crecimiento y desarrollo celular, así como en respuesta a situaciones de estrés. Ambos radicales se mantienen en equilibrio; sin embargo, como el pK_a de disociación es 4.88, en entornos de pH fisiológicos el radical predominante es el anión superóxido [72], el cual se dismuta produciendo peróxido de hidrógeno y oxígeno.



Las principales reacciones responsables de la formación del $\text{O}_2^{\bullet -}$ son:

- Reacciones enzimáticas catalizadas por enzimas deshidrogenasas flavoproteínicas [73], oxidasas e hidroxilasas [74].
- Autooxidación de moléculas como gliceraldehído, ascorbato, hidroquinonas, tioles (cisteína, catecolaminas, flavinas y hemoproteínas), en presencia de algunos metales a nivel de trazas [75].

Debido a este tipo de reacciones, se calcula, que cada célula del organismo puede producir más de un millar de moléculas de $\text{O}_2^{\bullet -}$ por día [76].

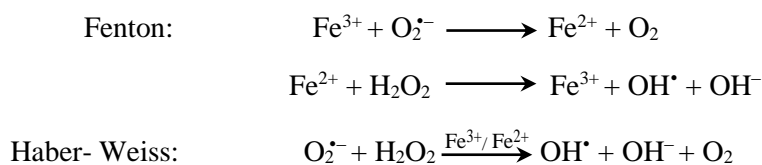
Aunque este ROS es relativamente poco reactivo e inestable, es potencialmente tóxico, ya que es la principal fuente de formación de H_2O_2 cuando se elimina a nivel celular, mediante su reducción, catalizada por la enzima superóxido dismutasa.

1.2.2.3. Peróxido de Hidrógeno

El H_2O_2 no es un radical libre, ya que no posee electrones desapareados. Siendo la especie menos reactiva, es un importante precursor de otros radicales libres, lo que unido a su capacidad para atravesar las membranas biológicas [77], le permite protagonizar reacciones de oxidación en diversos puntos de la célula, distantes del lugar de producción de este ROS, creándose así nuevos radicales libres.

Existen diversas fuentes de formación de peróxido de hidrógeno; la principal es la debida a la reducción directa del oxígeno molecular, en la que participan dos electrones y dos protones [64]. En menor proporción se produce por la dismutación del radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ mediante la enzima superóxido dismutasa [78, 79], como producto de algunas enzimas (glucosa oxidasa, uricasa, etc.) [80], o a través de reacciones de autooxidación [73].

El H_2O_2 no es tóxico cuando se encuentra en concentraciones fisiológicas, pero mediante la reacción de Fenton-Haber-Weiss [81] puede dar lugar al radical OH^{\bullet} (el ROS que presenta mayor toxicidad) en presencia de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre, y en combinación con el anión radical superóxido:

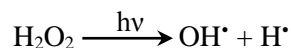


La naturaleza del daño producido por estas reacciones depende de la disponibilidad y localización de estos metales de transición. La reducción del H_2O_2 para producir agua, está catalizada por sistemas enzimáticos como la glutatión peroxidasa [33].

1.2.2.4. Radical Hidroxilo

El radical hidroxilo, es el radical libre de mayor reactividad, y presenta una vida media de 109 segundos [82]. Aunque no se difunde fácilmente, es el radical más dañino que existe. Se desconoce la existencia de una enzima capaz de eliminarlo de manera directa.

Una posible fuente de formación es la disociación (poco frecuente) de la molécula de agua como consecuencia de radiaciones de alta energía (rayos X, rayos γ).



La radiación ultravioleta (UV) no tiene suficiente energía como para disociar una molécula de agua, pero sí una molécula de H_2O_2 en dos moléculas del radical hidroxilo.



Capítulo 1

El proceso más importante de formación de este radical, es el debido a las reacciones de Fenton-Haber-Weiss (vistas en el apartado anterior), en las que una molécula de peróxido de hidrógeno reacciona con una molécula de anión radical superóxido, u otro agente reductor, para producir OH^\bullet , OH^- y O_2 . La velocidad de estas reacciones es demasiado baja como para ser importantes a nivel fisiológico, aunque algunos metales de transición como el hierro o el cobre, actúan como catalizadores acelerando su velocidad notablemente [32].

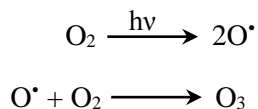
La alta reactividad del OH^\bullet queda demostrada por su capacidad para reaccionar con las bases púricas y pirimidínicas del ADN, lo que hace que se considere un agente genotóxico [83]. También puede extraer un protón de la cadena carbonada procedente de ácidos grasos poliinsaturados, iniciando de esta forma la peroxidación lipídica [84], así como provocar daños a aminoácidos y proteínas [85].

1.2.2.5. Radical alcoxilo y radical peroxilo

Ambos radicales son especies reactivas generadas durante la lipoperoxidación como consecuencia del ataque de otros radicales libres sobre las cadenas carbonatadas de los ácidos grasos, resultando fundamentales en el desarrollo del proceso al contribuir en el inicio y propagación de la reacción. Sus correspondientes reactividades son inferiores a la del radical hidroxilo, sin embargo su selectividad es superior a la de éste [86].

1.2.2.6. Ozono

La molécula de ozono está compuesta por tres átomos de oxígeno; se forma al disociarse el oxígeno en dos átomos que se unen, cada uno de ellos, a otra molécula de oxígeno gaseoso (O_2). Este proceso ocurre cuando el oxígeno del medio ambiente, se somete a un pulso de mucha energía, como por ejemplo un rayo.



La presencia de ozono en la estratosfera, protege del exceso de radiación ultravioleta, pero debido a su elevado poder oxidante y a su elevada reactividad, su presencia en la troposfera puede afectar a la vegetación natural, los cultivos e incluso a la salud humana. Dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición al ozono, los daños serán más o menos perjudiciales.

El ozono es un potente oxidante que reacciona con proteínas y lípidos, especialmente con las membranas biológicas. Su elevada reactividad, limita su acumulación. Una

exposición prolongada a ozono a una concentración tan baja como 0,1 p.p.m., puede provocar un envejecimiento prematuro.

Por su elevado poder oxidante se emplea como desinfectante, depurador y purificador de aguas minerales ya que elimina los olores y sabores del agua por oxidación de la materia orgánica, no deja residuos, es compatible con otros tratamientos, no afecta al pH, no colorea el agua y no deja ningún residuo químico perjudicial.

1.2.3. Formación de Radicales Libres

Los radicales libres se producen fisiológicamente en cantidades moderadas, ya que participan en importantes funciones biológicas. Si alcanzan niveles elevados en el organismo, provocan daños celulares de diversos tipos, teniendo una repercusión importante en la salud. La formación de radicales libres puede deberse a la acción de fuentes exógenas o endógenas [87].

1.2.3.1. Fuentes Exógenas

Las principales fuentes exógenas de producción de radicales libres se pueden clasificar en:

- 1) Factores Ambientales: la contaminación atmosférica producida por contaminantes fotoquímicos, el humo del tabaco inhalado directamente o indirectamente, la hiperoxia, los plaguicidas, los compuestos xenobióticos (cloroformo, paracetamol, etanol, tetracloruro de carbono, etc.), los metales pesados, los disolventes, los anestésicos y los hidrocarburos aromáticos. Todos estos compuestos pueden poseer radicales libres de manera intrínseca como el humo del tabaco, o bien generarlos a través del metabolismo celular y los procesos relacionados con éste [88].
- 2) Compuestos de naturaleza prooxidante (con marcado carácter oxidante por sí mismos) que entran en el organismo a través de la dieta, ya que se encuentran en gran parte de los aditivos químicos utilizados en los alimentos en conservas y embutidos (conservantes, colorantes, saborizantes, etc.), las grasas animales y vegetales calentadas al fuego o por hidrogenación, bebidas alcohólicas, azúcares refinados, etc.
- 3) Contaminantes químicos, componentes de perfumes, cremas para la piel, champús, jabones, pinturas, detergentes para la ropa, productos de limpieza, etc. son radicales libres o precursores de estos.
- 4) Agentes antineoplásicos y antibióticos, fármacos que se utilizan por su capacidad para reducir el O_2 a O_2^- , el H_2O_2 y el OH^\bullet : adriamicina, bleomicina, daunorubicina y algunos antibióticos con grupos quinoides o metales [89].

Capítulo 1

5) Irradiaciones sobre los organismos, las cuales pueden provocar el paso de un compuesto a su estado excitado, lo que puede originar un radical o acentuar su carácter oxidante. Son radiaciones solares, ultravioleta, rayos X y rayos γ , e ionizantes (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas α y β) [90].

6) Metabolización de determinados fármacos [91].

1.2.3.2. Fuentes Endógenas

Las mitocondrias presentes en los tejidos sanos son la principal fuente de radicales libres en los organismos aerobios [92], ya que estos orgánulos son los responsables de más del 90% del consumo del oxígeno celular. La cadena de transporte electrónico, constituida por una serie de proteínas con propiedades redox capaces de reducir el oxígeno molecular hasta la formación de agua, se encuentra acoplada a su vez a la fosforilación oxidativa para producir ATP. Estos procesos constituyen la principal fuente endógena de ROS.

Entre el 1% y el 2% de los electrones transportados por la cadena mitocondrial no alcanza su destino final, por lo que no intervienen en la producción de ATP, sino que están implicados en las reducciones parciales del O_2 . Entre el 1% y el 5% de las moléculas de O_2 son activadas por incorporación directa de un electrón generando el anión radical superóxido. Dicha producción es proporcional a la actividad de la cadena de transporte electrónico, pero no es necesariamente proporcional al consumo de O_2 en el organismo [93]. En determinadas ocasiones, la actividad de la cadena de transporte electrónico se mantiene constante en el tiempo, constituyendo un estado estable de formación de $O_2^{\cdot-}$ capaz de reducir metales de transición, favoreciendo así la formación de OH^{\cdot} . La liberación de ROS hacia el exterior mitocondrial depende del potencial de membrana, principalmente cuando se alcanza el potencial máximo [94].

Aunque la principal fuente de formación de ROS es la hiperactividad mitocondrial, otras fuentes no menos importantes son la isquemia-reperusión, las reacciones enzimáticas e inmunitarias, la autooxidación de catecolaminas, la producción de ácido láctico, etc. [95].

Las fuentes endógenas de formación de ROS pueden clasificarse en dos grupos, según cómo las regulen los sistemas de homeostasis del organismo:

- Fuentes de formación regulada. En este grupo se incluye el sistema inmune, con su necesidad fisiológica de ROS. Los macrófagos y neutrófilos (fagocitos activados) requieren un ambiente oxidativo controlado, donde se pueda desarrollar su metabolismo y la eliminación de antígenos y células apoptóticas [96].

- Fuentes de formación no regulada. Las que se producen espontáneamente en respuesta a determinados estímulos, como el ejercicio físico, la dieta, la temperatura ambiental o las radiaciones.

1.3. Los Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que desarrollan una función vital en el organismo, ya que actúan como sistema de defensa en la prevención del daño oxidativo provocado por los radicales libres, en especial las ROS.

Actualmente existe un gran interés en la investigación de productos y antioxidantes de origen natural frente a los de origen sintético [97, 98]. Algunos, como BHT (Butilhidroxitolueno), TBHQ (Terbutilhidroquinona), BHA (Butilhidroxianisol) o el propilgalato se utilizan frecuentemente como aditivos alimentarios en productos de consumo habitual y están regulados por la ley, debido a sus posibles efectos tóxicos cuando se consumen en exceso. Se ha establecido una relación de condimentos y especias con propiedades médicas y fisiológicas de alto interés para la sociedad [99, 100], siendo de especial interés los antioxidantes alimentarios en la prevención de lesiones inflamatorias, deficiencias nutricionales, enfermedades autoinmunes, Parkinson, infartos de miocardio, neurodegeneración, envejecimiento, neoplasias, aterosclerosis y diabetes [101] relacionándolo directamente con la producción de radicales libres. Este hecho ha provocado que en las últimas décadas, el número de publicaciones científicas relacionadas con antioxidantes, especialmente los de origen natural, haya experimentado un crecimiento exponencial.

Este gran interés se debe fundamentalmente a tres razones:

- 1) El poder antioxidante de una amplia variedad de agentes fitoquímicos.
- 2) Los beneficios del consumo de antioxidantes naturales frente a las enfermedades crónico-degenerativas y el proceso de envejecimiento.
- 3) La inseguridad que suscita en las personas el consumo de antioxidantes sintéticos.

Existe una preferencia generalizada en la población mundial, acerca de consumir antioxidantes naturales frente a los de origen sintético, resultando los naturales mucho más aceptados y demandados comercialmente [102]. El consumo de antioxidantes naturales a través de la dieta supone un refuerzo considerable de las defensas naturales propias del organismo, teniendo esto como resultado, el reconocimiento de que el consumo de antioxidantes es sinónimo de salud.

1.3.1. Antioxidantes Fenólicos

Capítulo 1

Los compuestos fenólicos constituyen un importante y heterogéneo grupo de compuestos ampliamente repartidos en el reino vegetal, formado por más de 8.000 estructuras identificadas [103]. Presentan entre sus propiedades, la capacidad de precipitar macromoléculas tales como proteínas, carbohidratos y enzimas digestivas, lo que reduce la digestión de ciertos alimentos y que generó antiguamente, el término de antinutrientes. En la década de los 90 del siglo pasado, la percepción sobre estos compuestos cambia drásticamente, aumentando el interés en ellos por sus efectos beneficiosos sobre la salud, descritos en determinadas enfermedades cardiovasculares [104, 105], enfermedades neurodegenerativas [106,107], en la prevención y tratamiento de distintos tipos de cáncer [105,108] y, en general, en todas aquellas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Los numerosos beneficios aportados por la extensa variedad de compuestos fenólicos responden a sus propiedades antiinflamatorias [109], anticancerígenas [110] y, fundamentalmente, a sus propiedades antioxidantes [107]. La influencia de estas últimas en la mejora de la salud, así como la gran abundancia de estos compuestos en nuestra dieta cotidiana, han despertado un gran interés desde el punto vista científico-empresarial, tanto en el campo de los ingredientes funcionales, como en el campo farmacológico.

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales fracciones de metabolitos secundarios sintetizados por las plantas, ya que intervienen en procesos fisiológicos referentes al crecimiento y la reproducción, en la respuesta a condiciones de estrés, en procesos defensivos frente a herbívoros, patógenos, parásitos, contaminación, radiación UV, temperaturas extremas, etc. [111], y son los principales responsables de propiedades como el color, la astringencia, el sabor y el aroma.

A pesar de la gran variedad de compuestos fenólicos que existen, la mayoría presenta un origen metabólico común: la ruta del ácido shikímico (plantas superiores) y la del ácido malónico (bacterias y hongos) [112]. En ellas tiene lugar una biosíntesis que conduce a la producción de ácidos benzoicos y cinámicos, así como a ciertos aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina). En su mayoría, se trata de moléculas muy solubles que presentan como elemento común un anillo bencénico con uno o varios grupos hidroxilo en sus estructuras moleculares, que además pueden incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. [113, 114]. No obstante, ciertos compuestos fenólicos son solubles sólo en disolventes orgánicos.

1.3.2. Clasificación de los compuestos Fenólicos

Teniendo en cuenta la amplia variedad de compuestos fenólicos que existen, y el gran número de estos, resulta difícil establecer un criterio de clasificación. La forma más simple de ordenar este tipo de compuestos es en base a su número de átomos de carbono (“esqueleto”), de esta forma tendremos: fenoles simples y fenoles complejos.

En los Fenoles Simples se distinguen tres grandes grupos:

- Los fenil-propanoides simples: son aquellos que presentan un esqueleto básico de fenil-propanoide (un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos). Por ejemplo, el ácido trans-cinámico, el ácido p-cumárico y sus derivados como el ácido cafeico.
- Las lactonas fenil-propanoides (o "ésteres cíclicos"), conocidas como cumarinas: poseen un esqueleto fenil-propanoide, pero el propano está ciclado. Por ejemplo: la umbeliferona, o el "psoralen" (cumarina con un anillo de furano).
- Los derivados del ácido benzoico: en estos, el esqueleto es un anillo aromático unido a un carbono, es decir, son formados a partir de fenil-propanoides que pierden dos átomos de carbono del grupo propilo. Ejemplos: vainillina, ácido salicílico.

En los Fenoles Complejos se pueden distinguir dos grandes grupos:

- Los Lignanós, metabolitos secundarios de las plantas que se encuentran en una gran variedad de plantas como las semillas de lino, calabaza o ajonjolí, el centeno, la soja, el brócoli, los frijoles y en algunas bayas. Aunque están ampliamente distribuidos en la naturaleza, sus cantidades son muy pequeñas, del orden de $\mu\text{g/g}$ de producto seco.
- Los Flavonoides: son compuestos que sintetizan todas las plantas terrestres, así como algunas algas. La síntesis de estos compuestos presenta una parte común, pero la composición química de sus productos finales es muy diferente de unas especies a otras, así como los mecanismos de regulación de su biosíntesis, por lo que la composición y concentración de flavonoides es muy variable, dependiendo de las especies e incluso del ambiente.

1.3.3. Los Compuestos Fenólicos en la dieta

Los productos naturales con alto contenido en antioxidantes fenólicos, adquieren un papel imprescindible por la tendencia generalizada en la población hacia una alimentación basada en el consumo de productos saludables. Su presencia en los alimentos de origen vegetal como frutas, vegetales, café, té, especias y condimentos, etc. [115] aporta aproximadamente un gramo diario, dependiendo de la dieta [116].

1.3.4. La Actividad Antioxidante de los Compuestos Fenólicos

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos reside en su estructura química, idónea para reaccionar con los radicales libres. El fundamento de la interacción "Antioxidante-Radical Libre" se basa en la facilidad del antioxidante para donar electrones o átomos de hidrógeno del grupo hidroxilo unido al grupo aromático [117] y en la capacidad del nuevo radical que se origina, para deslocalizar el electrón

Capítulo 1

desapareado (efecto resonante) en el sistema de dobles enlaces característico del anillo aromático [118], pudiendo estabilizarse mediante la formación de quinonas [119]. A esto hay que sumarle que los compuestos fenólicos presentan una gran capacidad de captación de iones metálicos, principalmente hierro y cobre, de manera que inhiben la formación de radicales libres a través de la reacción de Fenton.

Es muy importante el grado de metoxilación e hidroxilación [120] del compuesto fenólico, ya que está directamente relacionado con la capacidad antioxidante de éste. Otros factores de gran influencia son: la concentración, la localización de los grupos hidroxilos y el nivel de oxidación que presente el antioxidante [120, 121].

1.3.5. Determinación de la Actividad Antioxidante

La determinación de la actividad antioxidante de compuestos puros, resulta imprescindible para conocer la protección frente a la oxidación o el deterioro del alimento que lo alberga en su composición. Además de que estos antioxidantes se encuentran en diferentes proporciones, no se encuentra uno solo en cada alimento, sino que lo más normal es encontrarse con mezclas donde hay diferentes compuestos antioxidantes, y cada uno con una capacidad diferente, lo que dificulta la tarea.

Hay una necesidad de adquirir métodos unificados estandarizados que permitan servir de protocolo para una correcta aplicación del ensayo, comparar los resultados entre alimentos o productos comerciales, su aplicación útil como herramienta en el control de calidad, así como proveer de estándares para la regulación y las declaraciones de efectos en la salud [122]. De manera adicional, debe exigirse el cumplimiento de otros requisitos como pueden ser la utilización de un radical biológicamente relevante, capacidad de medición de antioxidantes lipofílicos e hidrofóbicos, utilidad para el control de calidad de rutina de un volumen amplio de muestras, presentación de un punto final de ensayo definido con mecanismo conocido, instrumentación fácilmente accesible, alta sensibilidad, alta reproducibilidad, simplicidad, rapidez y bajo coste, entre otros.

Las elevadas exigencias requeridas constituyen el principal motivo por el cual, de manera generalizada, ningún método o ensayo exprese con precisión, por sí sólo, la capacidad antioxidante total de una muestra, puesto que este parámetro deberá expresar la capacidad de antioxidantes lipofílicos e hidrofóbicos, reflejar y diferenciar los diferentes mecanismos antioxidantes y evaluar la reactividad del antioxidante frente a diferentes especies reactivas, hechos que a día de hoy imposibilitan la existencia de métodos mundialmente unificados para tal propósito. Con el fin de esclarecer en toda su extensión la capacidad antioxidante, tratando de esta manera facilitar la comparación e interpretación de los resultados, se opta por la planificación de diseños que involucren diferentes metodologías,[123] permitiendo minimizar la problemática ocasionada por la

disparidad en la condiciones experimentales de éstas, la alta complejidad de los sistemas estudiados (presencia de AO con dependencia de la zona de muestra analizada, amplio número y variedad de estructuras químicas antioxidantes y existencia de posibles efectos sinérgicos), los procesos de oxidación y la diversidad de matrices que requieren ser evaluadas.

1.3.5.1. Reacciones SET y reacciones HAT

Los ensayos para determinar la capacidad antioxidante in vitro se pueden clasificar, en dos categorías sobre la base de las reacciones químicas implicadas: ensayos basados en reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT, del inglés Hydrogen Atom Transfer) y ensayos basados en reacciones de transferencia de electrones (SET, del inglés Single Electron Transfer) [122, 124].

En las reacciones SET se da la transferencia de un electrón para reducir un compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales. La reactividad relativa de un antioxidante que involucra este tipo de reacciones está basada fundamentalmente en la desprotonación y, por consiguiente, está gobernada por el potencial de ionización (PI), [125] de manera que los valores disminuyen con el aumento del pH, reflejando un incremento en la capacidad electrodonador con la desprotonación.

Las reacciones HAT miden la capacidad de un antioxidante para estabilizar un RL mediante la transferencia de átomos de hidrógeno. La reactividad depende de la energía de disociación del enlace del grupo que contiene el hidrógeno a transferir. Ciertos aspectos estructurales como la presencia de un grupo hidroxilo en posición orto o la posible formación de enlaces intermoleculares entre distintos sustituyentes, pueden contribuir a reducir la entalpía de disociación facilitando la formación de un radical estable. Estas reacciones son rápidas e independientes del pH y del disolvente, pero son sensibles a la presencia de metales y agentes reductores, pudiendo generar una aparente mayor reactividad del antioxidante. El disolvente puede ejercer una marcada influencia en métodos como el ORAC y el ABTS [126].

<u>Reacciones Implicadas</u>	<u>Método o Ensayo</u>	<u>Siglas</u>
SET	Poder de Reducción Antioxidante del Hierro	FRAP
	Capacidad Antioxidante Reductor de Ión Cúprico	CUPRAC
	N,N-dimetil-p-fenilendiamina	DMPD
HAT	Capacidad de Absorción del Radical Oxígeno	ORAC

	Parámetro Antioxidante de Captura de Radicales	TRAP
	Oxidación de la Crocina	CBA
	Especies Reactivas del Ácido Tiobarbitúrico	TBARS
	Capacidad de Eliminación Total de Oxi-radicales	TOSC
	Inhibición de la Oxidación de los Lípidos de Baja Densidad	LDL's
	Desoxirribosa	-
	Xantina Oxidasa	-
SET y HAT	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico	ABTS
	Capacidad Antioxidante Equivalente en Trolox	TEAC
	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo	DPPH

Tabla 2. Clasificación de los ensayos de actividad antioxidante.

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

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

1.3.5.1.1. Métodos antioxidantes que utilizan mecanismos SET

1.3.5.1.1.1. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Metodología basada en la reducción del complejo de la tripiridiltriazina (TPTZ) férrica al complejo ferroso por la acción de un antioxidante en medio ácido.[127] La reacción provoca un cambio de intensidad de color proporcional a la actividad reductora de la muestra antioxidante que se monitoriza midiendo la absorbancia a 595 nm durante 30 minutos.[128] Los resultados se expresan en equivalente de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico) ($\mu\text{mol Trolox/g}$ o $\mu\text{mol Trolox/L}$), análogo hidrosoluble de la vitamina E, tras previa realización de la curva de calibrado del mismo.

La reducida aplicación del método responde a diversas críticas, entre las que destacan el pH no fisiológico al que se realiza [124], el valor sobreestimado por la presencia de cualquier compuesto donador de electrones, incluso sin propiedades antioxidantes, con potencial redox inferior al del complejo Fe(III)-TPTZ a Fe(II)-TPTZ ($E_{\text{Red}} = 0.77 \text{ V}$),[124] o bien, que exista absorción a 573 nm por parte de compuestos antioxidantes como la bilirrubina oxidada.[129] Asimismo, hay compuestos como el ácido ascórbico que, además de reducir el ion férrico a ferroso, pueden reaccionar con éste último para generar nuevos radicales libres.[129]

Finalmente, dado que el FRAP se define como una medida del poder antioxidante total, incluye indistintamente sustancias reductoras y antioxidantes. Sin embargo, dicho ensayo no implica a ningún oxidante ni a ningún sustrato oxidable. De igual forma que ciertos reductores que transforman el ión Fe(II) a ión Fe(III) no son antioxidantes, hay antioxidantes que no pueden llevar a cabo esta reacción, como el glutatión (GSH), un importante antioxidante natural que da resultados negativos en el ensayo FRAP.[130]

1.3.5.1.1.2. CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity)

El método CUPRAC es una variante del FRAP usando cobre en lugar de hierro [131]. El ensayo se basa en la reducción de Cu(II) a Cu(I) por la acción combinada de los antioxidantes presentes en la muestra. La molécula neocuproína forma un complejo con el Cu(I), el cual absorbe a 450 nm. La medida de absorbancia de la muestra antioxidante analizada se convierte a equivalentes de ácido úrico o de Trolox mediante curvas de calibrado con estándares. El potencial redox del cobre es más bajo que el del hierro, lo que se traduce en reacciones más selectivas: azúcares y ácidos cítricos, que interfieren en el ensayo FRAP, no son oxidados en el ensayo CUPRAC. No obstante, para potenciales redox bajos se incrementa el ciclo redox, así que la reducción de cobre puede ser un indicador incluso más sensible del potencial de la actividad oxidante de los antioxidantes [122].

Capítulo 1

1.3.5.1.1.3. DMPD (*N,N*-Dimethylphenylenediamine Dihydrochloride)

Requiere de un radical libre, DMPD^+ , generado a partir de diclorhidrato de *N,N*-dimetilfenilendiamina (DMPD) que, en presencia de una disolución oxidante de cloruro férrico y a pH ácido, se convierte en un radical catiónico coloreado y estable, el cual presenta un máximo de absorbancia a 505 nm. La monitorización del descenso de la absorbancia durante 10 minutos tras la adición sobre la disolución del radical de una determinada muestra antioxidante, y tras comparación con la de un blanco, es indicativa de la actividad antioxidante del mismo, expresándose los resultados en equivalentes de Trolox.[132]

1.3.5.1.2. Métodos antioxidantes que utilizan mecanismos HAT

1.3.5.1.2.1. ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

Se determina la capacidad de captación del radical peroxilo, generado a partir de la molécula orgánica dihidrocloruro de 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (AAPH). El radical ataca a la molécula de fluoresceína oxidándola; la molécula oxidada no emite fluorescencia y, por consiguiente, se observa un descenso de la misma. Los antioxidantes reaccionan con los radicales peroxilo, y la capacidad antioxidante se obtiene comparando el descenso en la fluorescencia producido en presencia y ausencia del antioxidante [133]. La cinética de la reacción puede sufrir variaciones en función de la concentración de antioxidante, hecho que limita su aplicación.

1.3.5.1.2.2. TRAP (*Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*)

El ensayo TRAP, al igual que sucede el ORAC, determina la captación del radical peroxilo, en este caso generado a partir de la molécula 2,2'-azo-bis-(2amidipropropano) (ABAP). En una etapa inicial, la oxidación es inhibida por el antioxidante durante un cierto periodo de tiempo (periodo de inducción). La capacidad de captación se mide comparando la duración de dicho periodo en la muestra y en el Trolox utilizado como referencia [134]. Su aplicación también se ve limitada por inconvenientes como la existencia de distintos puntos finales de medida establecidos por distintos autores, dificultándose la comparación de resultados, y el hecho de que no todos los antioxidantes poseen un periodo de inducción claramente establecido [124, 135].

1.3.5.1.2.3. CBA (*Crocin Bleaching Assay*)

Consiste en la oxidación (decoloración) de la crocina, un derivado natural de carotenoides, por radicales peroxilo generados a partir del AAPH. La actividad antioxidante se obtiene de la medida de la tasa de decoloración de la crocina en

presencia y en ausencia de antioxidantes a 443 nm. Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox [136].

Al igual con los ensayos anteriores, se han planteado diversas críticas del método [129, 122, 124]. La crocina es una mezcla de pigmentos naturales extraídos del azafrán que presenta una gran variabilidad entre distintos lotes, lo que limita su aplicación a gran escala. La coincidencia de la longitud de onda a la que se mide con la de muchos pigmentos alimentarios como los propios carotenoides, así como la alta variabilidad de los mecanismos de reacción entre la crocina y los diferentes antioxidantes, dificulta en exceso la interpretación de los resultados, aunque se ha propuesto una estandarización del método [136].

1.3.5.1.2.4. TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substances)

Se mide la absorbancia a 532 nm de un complejo formado entre el ácido tiobarbitúrico (TBA) y el ácido malondialdehído (MDA), siendo éste último un producto secundario de la oxidación lipídica. La presencia de antioxidantes con elevada actividad se asocia con una menor cantidad generada de MDA y, por consiguiente, con una menor absorbancia [137]. El MDA puede reaccionar con otros compuestos presentes en la muestra provocando interferencias en la medida de absorbancia asociada a los compuestos antioxidantes [138].

1.3.5.1.2.5. TOSC (Total Oxyradical Scavenging Capacity)

Se basa en la oxidación del ácido α -ceto- γ -metilbutírico (KMBA) a etileno por la acción de radicales hidroxilo, peroxilo y peroxinitrito generados a partir del 2,2'-azobis(2-amidopropane) o ABAP. Se analiza la formación de etileno por cromatografía de gases y se cuantifica el área bajo la curva que define la inhibición de la formación de etileno por la presencia de antioxidantes en función del tiempo, comparada con la obtenida para un patrón, que puede ser Trolox [139, 140]. No obstante, existen dificultades a la hora de establecer comparaciones entre los resultados debido a que cinética de la reacción no tiene una relación dosis-respuesta establecida entre la cantidad de antioxidante utilizada y el porcentaje de inhibición.

1.3.5.1.2.6. LDL's (Low Density Lipoprotein)

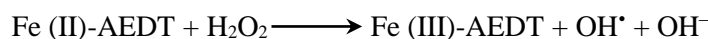
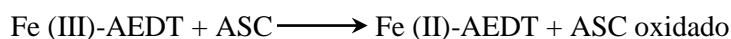
La oxidación de las lipoproteínas LDL por los RL es un proceso que ocurre en los seres vivos, que constituye una de las primeras etapas de la aterosclerosis. En este método se induce la oxidación de LDL aisladas de distintos individuos mediante diferentes especies como Cu(II) o AAPH, midiéndose la absorbancia a la longitud de onda 234 nm a la cual absorben los dienos conjugados generados durante el proceso [141]. La

Capítulo 1

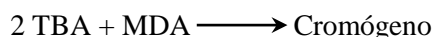
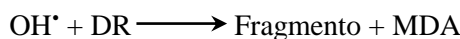
modificación de la absorbancia con el tiempo está constituida por un periodo de inducción, en la que los dienos no se han comenzado a formar por la presencia de antioxidantes en la muestra y la absorbancia no varía, una fase de propagación, en la que la absorbancia aumenta de manera exponencial por la formación de dienos, y una fase final de descomposición, en la que la absorbancia tiende a bajar lentamente. Los resultados del ensayo se pueden expresar a través de varios parámetros de medida, desde la comparación de la duración del periodo de inducción entre un blanco y la muestra antioxidante, la cantidad inicial de dienos conjugados, su cantidad máxima [142] o el parámetro CLT50, que mide la cantidad de antioxidante necesaria para aumentar el periodo de inducción en un 50 % respecto al control [143].

1.3.5.1.2.7. Ensayo de la Desoxirribosa

Se determina la capacidad de captura de radicales hidroxilo, generados por reacción de peróxido de hidrógeno con un complejo de hierro(II)-AEDT, previamente obtenido del complejo de hierro(III) por reducción con ácido ascórbico:



La desoxirribosa (DR) capta el radical generado para formar un cromógeno rosa, tras el calentamiento con ácido tiobarbitúrico a pH bajo.



Los antioxidantes que actúan como “atrapadores” (“scavengers”) de radicales, compiten con la desoxirribosa por los radicales hidroxilo, disminuyendo la formación de cromógeno y por tanto, la absorbancia a $\lambda=533$ nm [144]. Se sugiere que el ensayo de la desoxirribosa es una alternativa sencilla y barata para la determinación de constantes de velocidad, aplicable en la mayoría de las moléculas biológicas susceptibles de interaccionar con radicales hidroxilo.

1.3.5.1.2.8. Ensayo de la Xantina Oxidasa

La xantina oxidasa es una de las principales fuentes de ROS en los seres vivos. Es una deshidrogenasa que transfiere el electrón al NAD (nicotinamida adenina dinucleótido), oxidando la xantina o la hipoxantina a ácido úrico [145]. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo se transforma en una oxidasa por proteólisis limitada reaccionando en este caso con el oxígeno, en lugar de con el NAD, y produciendo superóxido y peróxido de hidrógeno. La capacidad de captura del ion superóxido que presentan

muchos antioxidantes, se mide a partir de la inhibición de este radical a través del sistema hipoxantina/xantina [146], expresando los resultados en porcentaje de inhibición de la actividad enzimática, a partir de los cambios producidos en la absorbancia a $\lambda=295$ nm, tras la adición de la muestra de antioxidante y comparados con los producidos en presencia de un blanco.

Recientemente, se han desarrollado modificaciones del método en las que la reacción no se monitoriza mediante la medida de cambios en la absorbancia, sino por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) [147], o bien, determinándose la evolución en la formación de ácido úrico [148].

1.3.5.1.3. Métodos antioxidantes que utilizan mecanismos SET y HAT

1.3.5.1.3.1. ABTS (2,2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulphonic Acid - Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico)

El ABTS se utiliza comúnmente como sustrato con peróxido de hidrógeno para una enzima peroxidasa (como la peroxidasa de rábano picante) o con enzimas multi-cobre oxidasa (como la bilirrubina oxidasa). Su uso permite el estudio de la cinética de reacción de las peroxidasas. Esto también nos permite utilizar el ABTS para seguir indirectamente la cinética de reacción de cualquier productor de peróxido de hidrógeno o simplemente para cuantificar la cantidad de peróxido de hidrógeno que hay en una muestra.

Los potenciales de reducción del ABTS son lo suficientemente altos como para que actúe como un donador de electrones en la reducción de especies como oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, especialmente a valores de pH menos extremos, donde se dan las catálisis biológicas.

1.3.5.1.3.2. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity - Capacidad Antioxidante Equivalente en Trolox)

En el ensayo TEAC está basado en la capacidad de los antioxidantes para capturar el catión radical ABTS. El ABTS se convierte a su catión radical mediante la adición de persulfato de sodio. Este radical posee una coloración azul/verdosa, con un máximo de absorción a $\lambda=415$ nm y una serie de máximos secundarios a $\lambda=645, 660, 734, 815$ y 820 nm [143]. El catión radical $ABTS^{\bullet+}$ es reactivo frente a la mayoría de los antioxidantes fenólicos, incluyendo tioles y vitamina C. Durante esta reacción, el catión radical, de color azul, pasa a convertirse de nuevo a su forma neutra, incoloro. La reacción es monitorizada por espectrofotometría. La reactividad de los diversos antioxidantes se compara con la del Trolox, que es un análogo de la Vitamina E, soluble en agua.

Capítulo 1

Dependiendo de la variante del método TEAC que se utilice, se emplean distintas longitudes de onda, siendo las más frecuentes 415 nm y 734 nm [118]. En el desarrollo del método se suelen emplear dos estrategias: inhibición y decoloración.

En la inhibición, los antioxidantes se añaden previamente a la generación del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ y lo que se determina es la inhibición de la formación del radical, que se traduce en un retraso en la aparición de la coloración azul verdoso.

En la segunda decoloración, los antioxidantes se añaden una vez se ha formado el $\text{ABTS}^{\bullet+}$ y se determina entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir, la decoloración de éste.

El ensayo TEAC presenta además variaciones en el modo mediante el cual se genera el radical catión $\text{ABTS}^{\bullet+}$, que puede ser: de manera enzimática (con mioglobina o peroxidasa de rábano), químicamente (con MnO_2 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ o radical peróxido $\text{O}_2^{\bullet-}$), o bien, electroquímicamente [149].

En el método original [150] se generaba el radical directamente en presencia del antioxidante, con metamioglobina y peróxido de hidrógeno que oxidaba a la metamioglobina, y esta a su vez oxidaba el ABTS. Sin embargo, se observó que determinados polifenoles como la quercetina podían interaccionar con los reactivos impidiendo la formación del radical y dando un valor de capacidad antioxidante sobreestimado, por lo que se pasó a generar el radical antes de la adición del antioxidante [151]. El descenso producido por el Trolox, empleado como patrón, es comparado con el producido en el mismo periodo de tiempo por el antioxidante analizando [149].

Aun así, se han planteado ciertas críticas a esta modificación, en el sentido de que los polifenoles, además de reaccionar con el radical para dar lugar a la molécula original, pueden dar lugar a otros compuestos, generando de esta forma problemas a la hora de determinar la estequiometría de la reacción entre el ABTS y el antioxidante, o bien, relaciones de estructura-actividad, puesto que el cálculo no se podría basar en los moles de molécula no radicalica [152, 153]. También puede ocurrir que los compuestos polifenólicos formen aductos con el radical, por lo que no toda la pérdida de absorbancia se debería a que el radical volviera a su forma inicial, lo que se ha observado al someter a este tipo de ensayo la catequina [153].

1.3.5.1.3.3. DPPH (1,1-Difenil-2-Picrilhidrazilo)

En el año 1958, Marsden Blois demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH^{\bullet} para aceptar un átomo de hidrógeno proveniente de una molécula de cisteína [154]. En la actualidad, se emplea principalmente el protocolo de ensayo propuesto en el año 1995 por Williams y sus colaboradores [155].

El 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH^{*}), es una molécula comercial de origen sintético y uno de los pocos radicales orgánicos con átomos de nitrógeno en su estructura, que presenta estabilidad, la cual es debida a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula, y por tanto, a diferencia de la mayoría de los radicales libres, no sufre proceso de dimerización. La deslocalización del electrón, provoca además una intensificación en el ya de por sí intenso color violáceo característico del radical, que disuelto en medio metanólico, absorbe a una $\lambda=515$ nm. En presencia de un antioxidante que puede donar o transferirle un átomo de hidrógeno, oxidándose y reduciendo de esta forma el DPPH^{*}, la coloración violácea de la disolución se atenúa, dando paso a su forma reducida (DPPH-H) de color amarillento.

En un principio, se creyó que este ensayo involucraba una reacción HAT, sin embargo, tras investigarse el mecanismo de reacción, se ha visto que la reacción que tiene lugar se corresponde con un mecanismo SET [156]. Se ha determinado que el proceso de reacción del DPPH^{*} con antioxidantes polifenólicos, ocurre en dos etapas:

- En una primera etapa, se da una transferencia electrónica de un anión fenóxido al DPPH^{*}. Es un proceso rápido, y es la etapa determinante de la velocidad de la reacción.
- En una segunda etapa, el radical nitrogenado sustrae el átomo de hidrógeno al antioxidante fenólico. Es un proceso que se da más despacio en disolventes con enlaces fuertes, capaces de aceptar hidrógenos, como son el etanol y el metanol, siendo este último, el disolvente que se suele emplear en los ensayos.

Además, los autores indicaron que la aparición de ácidos o bases presentes como contaminantes en el disolvente, pueden influenciar drásticamente el equilibrio de ionización de fenoles, alterando así los valores de la constante de velocidad de la reacción [157]. Es por esto que la reacción de estabilización del radical transcurre principalmente mediante un mecanismo SET, con un ligero aporte de un mecanismo HAT con metanol como disolvente [129].

En este ensayo, un simple seguimiento de la disminución de absorbancia asociado al proceso de interacción entre el antioxidante y el radical DPPH^{*} permite evaluar eficazmente la actividad antioxidante del mismo. Pese a que existen diversas propuestas a la hora de presentar los resultados, la mayoría de los estudios coinciden en el uso del parámetro “EC₅₀” o “Concentración Efectiva”, y cuyo significado se corresponde con la cantidad de antioxidante requerida para disminuir en un 50% la concentración inicial del radical en el estado estacionario. Para simplificar los términos, es preferible expresar los datos como “1/EC₅₀” o “Poder Antirradical” (ARP, del inglés Anti-Radical Power).

Las ventajas principales que presenta este método, son la simplicidad y disponibilidad instrumental, características determinantes que establecen este método como prueba habitual en la determinación de la eficacia antirradicálica de multitud de compuestos

Capítulo 1

aislados y extractos de naturaleza y origen variado (vinos, zumos, compuestos polifenólicos, etc.).

Sin embargo, el ensayo DPPH[•] presenta algunas desventajas que limitan, en cierta manera, su aplicación. Los altos potenciales que poseen los monómeros de la anilina y del pirrol, se relacionan con una mayor dificultad para interaccionar con radicales DPPH[•] [158], lo que significa que dicho ensayo es válido sólo para compuestos termodinámicamente capaces de reaccionar con él, es decir, aquellos que poseen un potencial de oxidación inferior al potencial formal de reducción del radical DPPH[•] (0,340 V frente al electrodo de Ag/AgCl a pH 7.0). Sin embargo, otros radicales menos estables y de interés biológico, como el radical peroxilo o hidroxilo, muestran potenciales formales de reducción superiores [159] y pueden reaccionar normalmente con un mecanismo de reacción diferente, con especies que presenten potenciales de oxidación bajos, impidiendo de este modo la viabilidad del ensayo.

La diferencia de estabilidad entre el radical DPPH[•] y el radical ROO[•], altamente reactivo frente a antioxidantes, se refleja en la cinética lenta de la interacción, de manera que algunos antioxidantes concretos resultan inertes frente al DPPH[•]. Existen algunos métodos acertados para el estudio de ROS, tales como el ensayo fluorimétrico para el H₂O₂, los métodos RSE/RPE (resonancia de spin electrónico y resonancia paramagnética electrónica respectivamente), etc. [160-164]

Además, como la longitud de onda utilizada en este método, se encuentra próxima a la región visible, la capacidad antioxidante de la muestra puede ser subestimada debido a la interferencia de compuestos como los carotenoides u otros compuestos presentes en la muestra que también absorben en la región próxima del radical [122].

Otras desventajas adicionales son el impedimento estérico en las moléculas con mayor peso molecular [165], y la relación no lineal existente entre la concentración de antioxidante y la cinética de reacción asociada a la interacción con el DPPH[•] [166], por lo que resulta un tanto arbitrario medir la capacidad antioxidante mediante el uso del parámetro EC₅₀.

Finalmente, hay que tener en cuenta casos como el del isoeugenol y fenoles con una estructura similar (o-metoxifenoles), que reaccionan de forma reversible con el DPPH[•] [167], ocasionando lecturas de capacidad antioxidante bajas en aquellas muestras que los contienen, restando validez a dichos resultados.

1.3.5.1.4. Técnicas Electroquímicas

En los últimos años, los métodos espectrofotométricos han adquirido cierta repercusión en el análisis in vitro de la capacidad antioxidante de muestras biológicas y extractos vegetales. La sencillez y el bajo coste asociado al ensayo de captura radical DPPH[•] lo

destaca como una de las metodologías más empleadas en este campo. Sin embargo, de manera aún más reciente, el empleo de diversas técnicas electroquímicas ha demostrado ser una alternativa válida para llevar a cabo la evaluación del poder antioxidante de diferentes muestras con similares ventajas al ensayo DPPH^{*} en cuanto a sencillez y bajo coste de los análisis, pero extremadamente más rápidas [168]. En general, los compuestos antioxidantes actúan como agentes reductores y, en disolución, tienden a ser fácilmente oxidados sobre la superficie de un electrodo. En base a este hecho, se establece una relación intrínseca entre el comportamiento electroquímico del compuesto antioxidante y su consiguiente actividad antioxidante [168, 169].

Se han propuesto métodos directos e indirectos para evaluar la actividad antioxidante de productos naturales [161]. Las medidas electroquímicas son una prueba rápida para estimar la capacidad antioxidante de un gran número de moléculas orgánicas [168-172], posibilitándose así el análisis de la interacción entre el antioxidante y las ROS. Los análisis electroquímicos permiten correlacionar potenciales de oxidación, intensidad de corriente u otros parámetros electroquímicos como el potencial de onda media, con la capacidad antioxidante, mostrándose más selectivos y sensibles que los métodos espectrométricos [168, 171] y más reproducibles que los análisis biológicos para la evaluación del poder antioxidante. La sensibilidad, selectividad y reproducibilidad del método varía en cuanto a los distintos tipos de electrodos que pueden ser empleados en los análisis. En algunos casos, la gran capacidad de adsorción de las especies objeto de estudio, puede llegar a comprometer la respuesta del electrodo de trabajo empleado.

Recientemente se ha utilizado la voltametría cíclica para la evaluación de la actividad antioxidante [169, 173-175]. Resulta una técnica acertada en el estudio de compuestos antioxidantes de manera individualizada, pero cuando se aplica a mezclas complejas no permite la determinación específica de cada compuesto, sino que aporta información valiosa en cuanto a la cantidad de grupos funcionales diferentes responsables de cada pico registrado [168, 172]

Se han utilizado los potenciales de oxidación de los picos obtenidos en voltametría cíclica para comparar actividades antioxidantes de diversos compuestos tales como ácidos fenólicos, flavonoides, ácidos cinámicos, etc. [175,176] empleando electrodos de carbón vitrificado (GCE). La voltametría cíclica resulta especialmente adecuada debido a su simplicidad instrumental y de preparación de muestras, rapidez y, fundamentalmente, a la posibilidad tanto de analizar capacidades antioxidantes en mezclas sin necesidad de medir la actividad específica de cada componente, como de poder ser utilizado directamente sobre muestras biológicas [93, 94, 177], siempre con sensibilidades superiores a las requeridas para las concentraciones de antioxidantes fisiológicas. Una limitación de la técnica es que requiere que el antioxidante sea inactivo en el rango de potenciales donde ocurre la reducción del oxígeno en las condiciones experimentales utilizadas [178]. Además, cuando hay antioxidantes cuyos potenciales

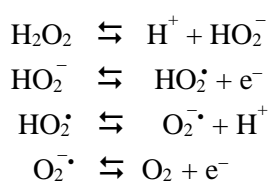
Capítulo 1

de oxidación difieren en más de 80-120 mV (dependiendo de la reversibilidad de los procesos) aparecen dos o más señales, por lo que es muy arbitraria la asignación de carácter antioxidante. No obstante, es una buena aproximación a la capacidad antioxidante de compuestos individuales [166].

El estudio electroquímico de la capacidad antioxidante de distintas especies se ha desarrollado ampliamente utilizando electrodos de mercurio [179, 180]. La reacción de oxidación anódica del peróxido de hidrógeno se usa como fuente de ROS, y se emplea para la evaluación de la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos, vinos, bebidas alcohólicas fuertes o cervezas [181-186]. La ventaja que presenta este método es que el H_2O_2 es muy estable en células, en comparación con otros ROS que necesitan ser producidos "in vivo". El uso de la polarografía para la electrooxidación de peróxido de hidrógeno, con la consiguiente formación de radicales peróxido, permite registrar la corriente de oxidación de dicha reacción [183]. La disminución de la corriente de oxidación en presencia de un antioxidante se utiliza para determinar la capacidad antioxidante.

Sužnjević y sus colaboradores, utilizaron la intensidad de pico de un máximo polarográfico para medir la corriente de oxidación [183-186]. El origen del máximo se debe a menudo al aumento en el transporte de las especies electroactivas hacia el electrodo por movimientos en la disolución, de modo que la intensidad de pico depende de las condiciones hidrodinámicas. Como resultado, la cantidad de especies electroactivas que alcanzan el electrodo es mayor que la transportada por difusión. Desafortunadamente, la intensidad del máximo se modifica por la presencia de especies superficialmente activas, como ciertos disolventes orgánicos. De hecho, el electrodo de Hg es muy sensible a cambios en la concentración de disolventes orgánicos, los cuales se utilizan en muchos casos para eliminar los máximos polarográficos debido a procesos que ocurren en la fase adsorbida.

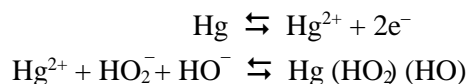
Algunos antioxidantes estudiados mediante oxidación polarográfica y voltamétrica del peróxido de hidrógeno sobre electrodos de mercurio han sido: la 3-hidroxycumarina, el carvacrol, la vainillina y el ácido gálico. El mecanismo ocurre por formación de los radicales superóxidos e hidroperóxido:



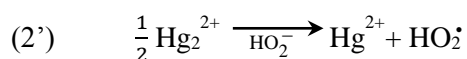
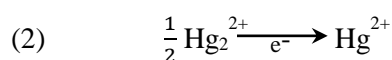
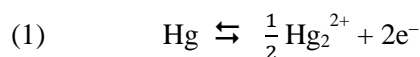
Para la interacción entre los radicales formados y los antioxidantes, los resultados experimentales concuerdan con las predicciones teóricas, por lo que se propuso un

parámetro cinético para evaluar la actividad de captación de radicales por parte de los antioxidantes [179].

Por otro lado Kituchi y Murayama [187] propusieron en 1976 que la onda anódica se debe a la oxidación de Hg a Hg^{2+} con la posterior formación de un complejo mixto con iones HO_2^- y OH^- :



El mecanismo fue revisado por Sužnjević, quien lo verificó por valoración con HgCl_2 [181, 183]. Pero si estas reacciones fuesen los únicos procesos que se diesen en el electrodo, la adición de un antioxidante no tendría ningún efecto sobre la onda de oxidación, ya que éstos no reaccionan con el ion Hg^{2+} en ausencia de peróxido de hidrógeno [180]. Además, tampoco se da la reacción de los antioxidantes con los iones HO_2^- y OH^- , por lo que hay que considerar reacciones adicionales:



En ausencia de antioxidantes, la reacción (2') tiene solo lugar a nivel de trazas. Cuando se añade un atrapador de radicales, reacciona con el radical hidroperóxido producido en la reacción (2') y disminuye la concentración disponible de Hg (I), disminuyendo a su vez la concentración de Hg (II), por lo que la corriente anódica disminuye [180]. El radical hidroperóxido formado reacciona de forma diferente con los distintos antioxidantes, y esto permite proponer un parámetro relacionado con la capacidad de reacción entre los distintos antioxidantes y los radicales libres; dicho parámetro estará relacionado con la disminución del área de pico de oxidación en voltametría de pulso diferencial [188].

1.4. Técnicas Cromatográficas en el estudio de la composición de extractos de tés, infusiones y especias: componentes principales y antioxidantes

El té es la segunda bebida más consumida en el mundo, sobrepasando su popularidad tan sólo el agua [189]. Este hecho, ha llevado a una amplia investigación en cuanto a su composición y sus propiedades, determinándose que los principales compuestos que se encuentran en los extractos son: catequinas, ácidos oxiaromáticos, flavonoles,

Capítulo 1

teaflavinas, teagallinas, terubiginas, pigmentos, alcaloides, azúcares, aminoácidos, vitaminas, ácidos dibásicos, lignanos y saponinas triterpenoides [190]. De entre todos ellos, hay que destacar el conjunto de polifenoles totales, el ácido gálico y la cafeína (o teína), como los principales componentes de los extractos que se obtienen de cualquier tipo de té, por ejemplo [191]:

Tipo de Té	Contenido mg/g de té seco		
	Polifenoles Totales	Ácido Gálico	Cafeína
<i>Té Verde Meifoo</i>	112.50	0.74	26.8
<i>Té Oolong Fujian</i>	40.89	1.42	7.44
<i>Té Negro Fujian</i>	15.31	2.06	21.60
<i>Té Pu-erh</i>	12.78	5.53	22.40

En el estudio de las composiciones se han empleado diversos tipos de técnicas cromatográficas, así como diferentes métodos de extracción [190-192] y tipos de extractantes [193] siendo el más común el agua. También se han realizado estudios en cuanto a la composición de aceites esenciales de té [194] y otros tipos de hierbas.

En la actualidad, se está prestando especial atención a la capacidad antioxidante de los alimentos y a la relación con su composición, y por supuesto, dada la extensión del consumo de té, este es uno de los principales objetivos de estudio [193, 195-197]. La mayor parte de estas investigaciones, se centran en el alto contenido en polifenoles que presentan los tés, siendo los más característicos las epicatequinas, los epicatequin-galatos, las epigalocatequinas y los epigalocatequin-galatos [198, 199], empleándose técnicas como HPLC con detector de fotodiodos para muestras homogenizadas en nitrógeno líquido y liofilizadas para después realizar una extracción con metanol o HPLC acoplada a espectrometría de masas.

Las infusiones, son bebidas cuya preparación consiste en añadir una serie de hojas, flores, frutos o semillas de diversas hierbas y/o plantas a agua cercana al punto de ebullición, para llevar a cabo la extracción de sus nutrientes, e ingerirlos así. Son un tipo de bebidas cuyo consumo también se encuentra muy extendido en el mundo debido a su gran variedad y las diferentes propiedades de cada una de ellas.

De este tipo de plantas, sin embargo, al contrario que con el té, el formato más estudiado es el de aceites esenciales. En este caso, los compuestos más representativos para las infusiones que se han estudiado como aceites esenciales, han sido:

- Para la Manzanilla [200, 201]: β -Farneseno (1.23%), Epatulenol (1.32 %), Óxido de Bisabolol B (6.57%), Óxido de Bisabolol A (53.59%), Óxido de Bisabolona (29.86%), Chamazuleno (2.27%).

- Para la Menta [202]: cis-epóxido de piperitona (7.8-77.6%), óxido de piperitenona (1.5-49.1%), carvona (0.0-21.5%), pulegona (0.3-5.4%), mentona (0.0-16,6%), timol (1.5-4.2%), β-tuyona (0.2-3.2%), carvacrol (0.0-2.7%), y (E)-cariofileno (0.9-2.5%), mirceno (0.3-2.5%), carvacrol (0.0-2.7%), borneol (0.9-1.8%), y p cimeno (0.2-1.9%).

- Para el Rooibos [203]: 99 compuestos están presentes en el aceite volátil del té de rooibos. Los componentes principales son: guayacol (24.0%), 6-metil-3,5-heptadien-2-un isómero (5.2%), damascenona (5.0%), geranilacetona (4.2%), alcohol β-feniletilo (4.1%) y 6-metil-5-hepten-2-ona (4.0%).

- Para la Salvia [204]: α-tujona (18-43%), β-tujona (3-8.5%), alcanfor (4.5-24.5%), 1,8-cineol (5.5-13%), humeleno (0-12%), α- pineno (1-6.5%), canfeno (1.5-7%), limoneno (0.5-3%), linalool (libre y esterificado (1% como máximo)) y acetato de bornilo (2.5% como máximo).

- Para la Tila [205]: las flores contienen polisacáridos mucilaginosos (3%), taninos (2%) y flavonoides (1%), siendo el principal flavonoide, la isoquercitrina. Las flores frescas (con un rendimiento aproximado de 0.2 mg/g de aceite esencial) contienen alcanos (52.1-59.9%), 2-feniletil-alcohol y sus ésteres (1.0-7.4%), geraniol (0.5-5.9%), eugenol (1.0-2.5%), y cis-trans farnesol (0.3-1.6%).

Los métodos de estudio se han adaptado al carácter oleaginoso de las muestras, empleándose extracción con CO₂ supercrítico [206], cromatografía líquida bidimensional [207] y cromatografía en fase reversa [208].

También se han estudiado estos aceites por sus propiedades antibacterianas [209], antimicrobiales [210], insecticidas [211], antifúngicas [212] y por su capacidad antioxidante (de especial interés en este trabajo), la cual varía incluso dentro del mismo tipo de plantas [213-215]:

Capacidad Antioxidante DPPH IV₅₀ (mg/mL)	
Mentha Piperita chocolate mint	54.75
Mentha Piperita grapefruit mint	36.60
Mentha Aquatica lavender mint	6.75
Mentha Canadensis Japanese mint	3.31
Mentha Spicata mentol mint	1.25
Mentha Australis	44.78

Sin embargo, estos aceites se corresponden con una fracción apolar, que dista mucho del extracto en agua que se realiza de estas plantas cuando se preparan las bebidas conocidas propiamente como infusiones, así los valores obtenidos no nos dan idea de los nutrientes ni de la capacidad antioxidante de estas bebidas que ingerimos en la dieta.

Capítulo 1

Algo similar a lo que ocurre con las plantas utilizadas para la preparación de infusiones, podemos observar con la gran mayoría de especias y condimentos, lo más estudiado son los aceites esenciales y los extractos en metanol y/o etanol, así como diferentes disolventes apolares [216-224]. En este caso, también debido a la gran cantidad de tipos que existen, no es fácil comparar compuestos comunes, observándose de nuevo variabilidad en la composición incluso dentro del mismo tipo de especia o condimento, en función de su origen, método de extracción, época de recolección, etc. [223]. También para las especias se han estudiado las diferentes propiedades de estos aceites esenciales, bien como agentes antifúngicos [218], antimicrobiológicos [219-221], antibacteriana [224, 225] y su capacidad antioxidante [209, 217, 222] (que es para lo que en ocasiones, se emplean los extractos acuosos).

Para este grupo de muestras, estudiadas también como aceites esenciales, los compuestos más representativos que se han estudiado han sido:

- Albahaca [226]: el linalool es el componente más abundante (56.7-60.6%), seguido del epi- α -cadinol (8.6-11.4%), α -bergamoteno (7.4-9.2%) y γ -cadineno (3.2-5.4%). Las muestras recogidas en invierno son más ricas en monoterpenos oxigenados (68.9%), mientras que las recogidas en verano contenían una mayor cantidad de hidrocarburos sesquiterpénicos (24.3%).
- Canela [227, 228]: para la *Cinnamomum zeylanicum* Blume de Sri Lanka, se ha determinado que el componente básico del aceite es el eugenol (74.9-79.8%), seguido de β -cariofileno (4.1%), benzoato de bencilo (3.0%), linalool (0.14-2.5%), acetato de eugenol (2.1%) y cinamil acetato (1.8%), safrol (1.3%), α -pineno (1.2%) y cinamaldehído (1.1-16.25%). Mientras que para la *Cinnamomum Burmanni*, la diferencia más llamativa en cuanto a la composición fue en el eugenol (17.62%) y el cinamaldehído (60.17%).
- Clavo [229]: eugenol (76.8%), β -cariofileno (17.4%), α -humeleno (2.1%), y acetato de eugenilo (1.2%) son los componentes principales del aceite esencial de clavo.
- Comino [230]: Cuminaldehído (36%), b-pineno (19.3%), p-cimeno (18.4%) y γ -terpineno (15.3%) forman la principal fracción del aceite esencial de esta especia.
- Cúrcuma [231]: se han estudiado los aceites esenciales de rizomas secos de *C. Aromatica* Salisb., *C. Longa* L. y *C. Sichuanensis* determinándose como principales compuestos para la *C. Aromatica* el curcumol (35.77%) y 1,8-cineol (12.22%), para la *C. Longa* la ar-turmerona (49.04%), el óxido de humuleno (16.59%) y el β -selineno (10.18%), y para la *C. Sichuanensis* la ar-turmerona (43.52%), el β -selineno (13.36%) y el δ -cadineno (13.22%).
- Jengibre [232]: el zingibereno (10.5-16.6%) es el principal constituyente de los aceites esenciales del jengibre. En la variedad Majhaulti, una de las que presenta mayor

contenido en este compuesto, encontramos también e-citral (12.0%), z-citral (8.8%), canfeno (7.6%) y ocimeno (6.5%).

- Nuez Moscada [233]: para el aceite esencial de nuez moscada, los componentes principales son la miristicina (13.57%), safrol (4.28%), el 4-terpineol (13.92%), terpinoleno (1.62%), α -terpineol (3.11%), linalool (0.75%), limoneno (5.57%) y α -pineno (10.23%).

- Orégano [234]: los compuestos más abundantes son el γ -terpineno (7.9-12.7%), p-cimeno (9.9%-10.1%), carvacrol (7.8%), y timol (63.3%-78%), que constituyen entre 93.7-96% del aceite.

- Romero [234]: el componente principal es el 1,8-cineol, que compone el 88.9% del aceite esencial, también se encuentran α -pineno (2.7%), p-cimeno (0.7%), ocimeno (0.7%), borneol (1.5%), α -terpineol (1.3%) y alcanfor (2.4%).

- Tomillo [234]: γ -terpineno (4.3%), p-cimeno (23.5%), carvacrol (2.2%) y timol (63.6%), que juntos componen el 93.6% del aceite esencial.

La importancia del estudio de la composición de los extractos acuosos así como en disolventes apolares, de las especias y condimentos, radica en que cuando se usan en la cocina y en alimentación, no se suelen emplear en forma de aceites esenciales, sino como hierbas aromáticas o en polvo, pudiendo extraerse diferentes compuestos en función de cómo estén preparados los platos, si tienen una base acuosa, oleaginosa o están cocinados con bebidas alcohólicas.

Capítulo 1

1.5. Bibliografía

- [1] J. F. Turrens, *J. Physiol.* 552 (2003) 335-344.
- [2] V. Adam-Vizi, C. Chinipoulos, *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (2006) 639-645.
- [3] M. P. Murphy, *Biochem. J.* 417 (2009) 1-13.
- [4] E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, O. Kalayci, *World Allergy Organ. J.* 5 (2012) 9-19.
- [5] M. L. Circu, T. Y. Aw, *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 749-762.
- [6] F. Facchinetti, V. L. Dawson, T. M. Dawson, *Cell. Mol. Neurobiol.* 18 (1998) 667-682.
- [7] C. Bailly, H. Ei-Maarouf-Bouteau, F. Corbineau, *C. R. Biol.* 331 (2008) 806-814.
- [8] K. Rahman, *Clin. Inter. Aging* 2 (2007) 219-236.
- [9] D. Closa, E. Folch-Puy, *IUBMB Life* 56 (2004) 185-191.
- [10] F. Weinberg, R. Hamanaka, W. W. Wheaton, S. Weinberg, J. Joseph, M. Lopez, B. Kalyanaraman, G. M. Multu, G. R. S. Budinger, N. S. Chandel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 8788-8793.
- [11] A. Ceriello, F. Mercuri, L. Quagliaro, R. Assaloni, E. Motz, L. Tonutti, C. Taboga, *Diabetologia* 44 (2001) 834-838.
- [12] M. Antolovich, P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards, *Analyst* 127 (2002) 183-198.
- [13] N. Woodcock, J. MacFie, *Nutrition* 18, (2002) 523-524.
- [14] K. T. Howitz, K. J. Bitterman, H.Y. Cohen, D.W. Lamming, S. Lavu, J.G. Wood, R.E. Zipkin, P. Chung, A. Kisielewski, L.L. Zhang, B. Scherer, D.A. Sinclair, *Nature* 425 (2003) 191-196.
- [15] F. Visioli, G. Bellomo, C. Galli, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247 (1998) 60-64.
- [16] R. C. O'Brien, M. Luo, N. Balazs, J. Mercuri, *Journal of Diabetes and its Complications* 14 (2000) 201-206.
- [17] H. Babich, F. Visioli, *Il Farmaco* 58 (2003) 403-407.
- [18] H. Mukhtar, N. Ahmad, *Toxicological Sciences* 52 (1999) 111-117.
- [19] D. E. Brash, P. A. Havre, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (2002) 13969-13971.
- [20] E. D. Owuor, A. N. T. Kong, *Biochemical Pharmacology* 64 (2002) 765-770.
- [21] M. C. Gomez-Cabrera, A. Martinez, G. Santangelo, F. V. Pallardo, J. Sastre, J. Vina, *Br. J. Nutr.* 96 (2006) 31-33.

- [22] V. I. Perez, A. Bokov, H. Van Remmen, J. Mele, Q. Ran, Y. Ikeno, A. Richardson, *Biochim. Biophys. Acta.* 1790 (2009) 1005-1014.
- [23] A. B. Salmon, A. Richardson, V. I. Perez, *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 642-655.
- [24] B. Halliwell, *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 1147-1150.
- [25] A. Barzilai, K. Yamamoto, *DNA Repair.* 3 (2004) 1109-1115.
- [26] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39 (2007) 44-84.
- [27] D. B. Kell, *BMC Med. Genomics.* 2 (2009) Art. 2.
- [28] V. Chauhan, A. Chauhan, *Pathophysiol.* 13 (2006) 195-208.
- [29] L. Tretter, I. Sipos, V. Adam-Vizi, *Neurochem. Res.* 29 (2004) 569-577.
- [30] M. Iborra, I. Moret, F. Rausell, G. Bastida, M. Aguas, E. Cerrillo, P. Nos, B. Beltrán, *Biochem. Soc. Trans.* 39 (2011) 1102-1106.
- [31] S. C. Gupta, D. Hevia, S. Patchva, B. Park, W. Koh, B. B. Aggarwal, *Antioxid. Redox. Signal.* 16 (2012) 1295-1322.
- [32] B. Halliwell, J. M. C. Gutterbridge, *Free radicals in biology and Medicine*, 4th edn, Clarendon Press, (2007) Oxford.
- [33] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, *Chem. Biol.* 160 (2006) 1-40.
- [34] F. Giacco, M. Brownlee, *Circ. Res.* 107 (2010) 1058-1070.
- [35] N. S. Dhalla, R. M. Temsah, T. Netticada, *J. Hypertens.* 18 (2000) 665-673.
- [36] U. Singh, I. Jialal, *J. Phathophysiol.* 13 (2006) 129-142.
- [37] C. A. Hitchon, S. El-Gabalawy, *Arthritis Res. Ther.* 6 (2004) 265-278.
- [38] H. Suzuki, T. Nishizawa, H. Tsugawa, S. Mogami, T. Hibi, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 50 (2012) 35-39.
- [39] O. D. Saugstad, *Semin. Neonatol.* 8 (2003) 39-49.
- [40] K. C. Kregel, H.J. Zhang, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp.* 292 (2007) 18-36.
- [41] J. M. Fernández, M. E. Da Silva-Grigoletto, I. Túnez-Fiñana, *Rev. Andal. Med. Deporte.* 2 (2009) 19-34.
- [42] V. T. Agustín, V. Yoryana, V. Rev. Cubana Invest. Biomed. 19 (2000) 206-212.
- [43] R. S. Sohal, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2002) 37-44.
- [44] R. L. Levine, E. R. Stadtman, *Exp. Gerontol.* 36 (2001) 1495-1502.
- [45] E. R. Stadtman, *Free Radic. Biol. Med.* 9 (1990) 315-325.
- [46] E. R. Stadtman, *Exp. Gerontol.* 23 (1988) 327-347.

Capítulo 1

- [47] E. R. Stadtman, P. E. Starke-Reed, C. N. Oliver, J. M. Carney, R. A. Floyd, Protein modification in aging. *Exs.* 62 (1992) 64-72.
- [48] B. Halliwell, S. Chirico, *Am. J. Clin. Nutr.* 57 (1993) 715-725.
- [49] T. J. Montine, M. D. Neely, J. F. Quinn, M. F. Beal, W. R. Markesbery, L. J. Roberts, J. D. Morrow, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2002) 620-626.
- [50] G. Davi, A. Falco, C. Patrono, *Antioxid. Redox Signal.* 7 (2005) 256-268.
- [51] A. B. López-Jaén, P. Codoñer-Franch, V. Valls-Bellés, *J. Pediatr. Biochem.* 3 (2013) 115-121.
- [52] M. Dizdaroglu, P. Jaruga, M. Birincioglu, H. Rodríguez, *Free Radic. Biol. Med.* 32 (2002) 1102-1115.
- [53] S. W. Ballinger, B. V. Houten, C. A. Conklin, G. F. Jin, B. F. Godley, *Exp. Eye Res.* 68 (1999) 765-772.
- [54] H. Kasai, *Mutat. Res.* 387 (1997) 147-163.
- [55] D. G. Vassilyev, K. Morikawa, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (1997) 103-109.
- [56] E. Roche, D. Romero-Alvira, *Med. Clin.* 106 (1996) 144-153.
- [57] B. Halliwell, *Am. J. Med.* 91 (1991) 145-225.
- [58] D. L. Gilbert, Fifty years of radical ideas. *Ann. N. Y. Academ. Sci.* 899 (2000) 1-14.
- [59] B. Halliwell, *Toxicol. Ind. Health.* 9 (1993) 1-21.
- [60] A. Cañizo, G. Eyler, G. Morales, J. Cerna, *J. Phys. Org. Chem.* 17 (2004) 215-220.
- [61] E. Marquina, Teoría de orbitales y oxígeno molecular: estructura electrónica del átomo de oxígeno y de las moléculas de oxígeno diatómicas. Ed. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados (2000). Valencia.
- [62] M. T. Mitjavila, D. López, M. P. Sáiz, *NCP Documenta.* 258 (2001) 5-11.
- [63] A. W. Boots, G. R. Haenen, A. Bast, *Eu J. Pharmacol.* 585 (2008) 325-337.
- [64] B. Halliwell, *Plant Physiol.* 141 (2006) 312-322.
- [65] R. Kohen, A. Nyska, *Toxicol. Pathol.* 30 (2002) 620-650.
- [66] N. S. Chandel, G. R. Budinger, *Free Radic. Biol. Med.* 42 (2007) 165-174.
- [67] R. D. Guzy, P. T. Schumacker, *Exp. Physiol.* 91 (2006) 807-819.
- [68] K. J. A. Davies, *Bio Chem. Soc. Symp.* 61 (1995) 1-31.
- [69] J. S. Zigler, J. D. Goosey, *Photochem. Photobiol.* 33 (1981) 869-874.
- [70] R. H. Six, C. S. Paschall, *Photochem. Photobiol.* 38 (1983) 411-415.
- [71] B. Bhandary, A. Marahatta, H. R. Kin, H. J. Chae, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 434-456.

- [72] D. Behar, G. Czaspski, J. Rabami, L. M. Dorfman, H. A. Schwarz, *J. Phys. Chem.* 74 (1979) 3209-3215.
- [73] M. Korycka-Dahi, T. Richardson, *J. Dairy. Sci.* 63 (1981) 1181-1208.
- [74] B. Halliwell, M. Grootveld, *FEBS Lett.* 213 (1987) 9-14.
- [75] J. M. McCord, *Bibl. Nutr. Dieta* 43 (1989) 327-337.
- [76] B. N. Ames, M. K. Shigenaga, T. M. Hagen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 7915-7922.
- [77] M. Zhang, A. M. Shah, *Reactive oxygen species in heart failure – Acute heart failure*, cap. 12, Ed. Springer (2008) London.
- [78] B. Frei, *Am. J. Med.* 97 (1994) 55-135.
- [79] S. I. Liochev, I. Fridovich, *Free Radic. Biol. Chem.* 42 (2007) 1465-1469.
- [80] I. Fridovich, B. Freeman, *Annu. Rev. Physiol.* 48 (1986) 693-702.
- [81] T. K. Das, M. R. Wati, K. Fatima-Shad, *Arch. Neurosci.* 2 (2014) 1-8.
- [82] S. I. Liochev, I. Fridovich, *Free Rad. Biol. Med.* 16 (1994) 29-33.
- [83] J. Sastre, F. V. Pallardó, J. García de la Asunción, J. Viña, *Free Radic. Res.* 32 (2000) 189-198.
- [84] T. A. Dix, J. Aikens, *Chem. Res. Toxicol.* 6 (1993) 2-18.
- [85] B. P. Yu, *Physiol. Rev.* 74 (1994) 139-162.
- [86] J. Termini, *Reviews of Oxidative Stress and Aging.* 2 cap. 3 (2002) 39-53.
- [87] L. A. Pham-Huy, H. He, C. Pham-Huy, *Int. J. Biomed. Sci.* 4 (2008) 89-96.
- [88] W. A. Pryor, *Free Radic. Biol. Med.* 13 (1992) 659-676.
- [89] J. H. Doroshov, K. J. Davies, *Biochem. Pharmacol.* 32 (1983) 2935-2939.
- [90] C. Von Sonntag, *Int. J. Radiat. Biol.* 65 (1994) 19-26.
- [91] A. Reyrfeldt, G. Bannenberg, *Br. Med. Bull.* 49 (1993) 588-603.
- [92] J. Gruber, S. Schaffer, B. Halliwell, *Front Biosci.* 13 (2008) 6554-6579.
- [93] P. M. Tiidus, J. Pushkarenko, M. E. Houston, *Am. J. Physiol.* 271 (1996) 832-836.
- [94] D. Han, F. Antunes, R. Canali, D. Rettori, E. Cadenas, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 5557-5563.
- [95] E. C. Gomes, A. N. Silva, M. R. de Oliveira, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012 (2012) 1-12.
- [96] M. B. Hampton, S. Orrenius, *Toxicol. Lett.* 102-103 (1998) 355-358.
- [97] K. Dastmalchi, H. J. Damien Dorman, Kosar M., R. Hiltunen, *LWT - Food Science and Technology* 40 (2007) 239.
- [98] G. Singh, P. Marimuthu, H. S. Murali, A. S. Bawa, *Journal of Food Safety* 25 (2005) 130.

Capítulo 1

- [99] D. S. Arora, J. Kaur, *International Journal of Antimicrobial Agents* 12 (1999) 257.
- [100] P. Pacheco, J. Sierra, G. Schmeda-Hirschmann, C. W. Potter, B. M. Jones, M. Moshref, *Phytother. Res.* 7 (1993) 415.
- [101] J. M. C. Gutteridge, B. Halliwell. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. 899 (2000) 136-147.
- [102] H. J. D. Dorman, R. Hiltunen, *Food. Chem.* 88 (2004) 193-199.
- [103] M. Charchar, N. Sharma, Y. Joshi, M. P. Dobhal, *Pharmacogn. Rev.* 5 (2011) 1-12.
- [104] J.A. Vita, *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (2005) 292-297.
- [105] S. Arranz, G. Chiva—Blanch, P. Valderas-martinez, 4 (2012) 759-781.
- [106] G. E. Barreto, R. C. A. Guedes, *Nutr. Neurosci.* 15 (2012) 92-93.
- [107] D. Y. Choi, Y. J. Lee, J. T. Hong, H. T. Lee, *Brain Res. Bull.* 87 (2012) 144-153.
- [108] J. D. Lambert, J. Hong, G. Yang, J. Liao, C. S. Yang, *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (2005) 284-291.
- [109] I. Rahman, S. K. Bismas, P.A. Kirkham, *Biochem. Pharmacol.* 72 (2006) 1439-1452.
- [110] C. S. Yang, J. M. Landau, M-T. Huang, H. L. Newmark, *Annu. Rev. Nutr.* 21 (2001) 381-406.
- [111] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2005) 727-747.
- [112] K. Robards, P. D. Prentzler, G. Tucker, P. Swatsitang, W. Glover, *Food Chem.* 66 (1999) 401-436.
- [113] I. Martínez-Valverde, M. J. Periago, G. Ros, *Arch. Latinoam. Nutr.* 50 (2000) 5-18.
- [114] G. Duthie, A. Crozier, *Curr. Opin. Lipidol.* 11 (2000) 43-47.
- [115] A. Crozier, I. B. Jaganath, M. N. Clifford, *Nat. Prod. Rep.* 26 (2009) 965-1096.
- [116] A. Scalbert, G. Williamson, *J. Nutr.* 130 (2000) 2073-2085.
- [117] N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman, *Food Chem.* 99 (2006) 191-203.
- [118] G. G. Duthie, P. T. Gardner, J. A. M. Kyle, *Proc. Nutr. Soc.* 62 (2003) 599-603.
- [119] A. S. Pannala, T. S. Chan, P. Brien, C. Rice-Evans, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 282 (2001) 1161-1168.
- [120] P. Lorenz, M. Zeh, J. Martens-Lobenhoffer, H. Schmidt, G. Wolf, *Free Radic. Res.* 39 (2005) 535-545.
- [121] C. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 933-956.
- [122] R. Prior, X. Wu, K. Schaich, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 4290-4302.
- [123] E. Niki, *Free Rad. Biol. Med.* 49 (2010) 503-515.

- [124] A. Karadag, B. Ozcelik, S. Saner, *Food Anal. Meth.* 2 (2009) 41-60.
- [125] C. Siquet, F. Paiva-Martins, J. L. F. C. Lima, S. Reis, F. Borges, *Free Rad. Res.* 40 (2006) 433-442.
- [126] J. Pérez-Jiménez, F. Saura-Calixto, *Food Int. Res.* 39 (2006) 791-800.
- [127] I. F. F. Benzie, J. J. Strain, *Anal. Biochem.* 239 (1996) 70-76.
- [128] R. Pulido, L. Bravo, F. Saura-Calixto, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 3396-3402.
- [129] D. Huang, B. Ou, R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1841-1856.
- [130] R. L. Prior, G. Cao, *Free Rad. Biol. Med.* 27 (1999) 1173-1181.
- [131] R. Apak, K. Güçlü, M. Ozyürek, S. E. Karademir, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 7970-7981.
- [132] I. Gülçin, *J. Enzym. Inh. Med. Chem.* 23 (2008) 871-876.
- [133] B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4619-4626.
- [134] M. Serafini, J. A. Laranjinha, L. M. Almeida, G. Maiani, *J. Nutr. Biochem.* 11 (2000) 585-589.
- [135] L. M. Magalhaes, M. A. Segundo, S. Reis, J. F. L. C. Lima, *Anal. Chim. Acta.* 613 (2008) 1-19.
- [136] S. A. Ordoudi, M. Z. Tsimidou, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9347-9356.
- [137] L. T. Rael, G. W. Thomas, M. L. Craun, C. G. Curtis, R. Bar-Or, D. Bar-Or, *J. Biochem. Mol. Biol.* 37 (2004) 749-752.
- [138] D. M. Hodges, J. M. DeLong, C. F. Forney, R. K. Prange, *Planta.* 207 (1999) 604-611.
- [139] G. W. Winston, F. Regoli, A. J. Dugas, J. H. Fong, K. A. Blanchard, *Free Rad. Biol. Med.* 24 (1998) 480-493.
- [140] D. D. MacLean, P. Murr, J. R. DeEll, *Postharvest Biol. Technol.* 29 (2003) 183-194.
- [141] G. J. Handelman, G. Cao, M. F. Walter, Z. D. Nightingale, G. L. Paul, R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 4888-4893.
- [142] I. Hurtado, P. Caldú, A. Gonzalo, J. M. Ramón, S. Mínguez, C. Fiol, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1283-1289.
- [143] C. Sanchez-Moreno, *Food Sci. Tech. Int.* 8 (2002) 121-137.
- [144] B. Halliwell, J. M. Gutteridge, O. I. Aruoma, *Anal. Biochem.* 15 (1987) 215-219.
- [145] I. Fridovich, *Science.* 201 (1978) 875-880.
- [146] P. Valentão, E. Fernandes, F. Carvalho, P. B. Andrade, R. M. Seabra, M. L. Bastos, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 3476-3479.
- [147] R. W. Owen, W. Mier, A. Giacosa, W. E. Hull, B. Spiegelhalder, H. Bartsch, *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 647-659.

Capítulo 1

- [148] M. T. S. Trevisan, B. Pfundstein, R. Haubner, G. Würtele, B. Spieglehalder, H. Batsch, R. W. Owen, *Food Chem. Toxicol.* 44 (2006) 188-197.
- [149] D. Villaño, M. S. Fernández-Pachón, A. M. Troncoso, M. C. García-Parrilla, *Talanta*. 64 (2004) 601-609.
- [150] N. J. Miller, A. T. Diplock, C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner, *Clin. Sci.* 84 (1993) 407-412.
- [151] R. Re, N. Pellegrini, A. Preotegente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, *Free Rad. Biol. Med.* 26 (1999) 121-137.
- [152] M. Pinelo, L. Manzocco, M. J. Núñez, M. C. Nicoli, *Food Chem.* 88 (2004) 201-207.
- [153] A. M. Osman, K. K. Y. Wong, A. Fernyhough, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346 (2006) 321-329.
- [154] M. S. Blois, *Nature*. 181 (1958) 1199-1200.
- [155] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, *LWT - Food Sci. Technol.* 28 (1995) 25-30.
- [156] M. Foti, C. Daquino, C. Geraci, *J. Org. Chem.* 69 (2004) 2309-2314.
- [157] P. Molyneux, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26 (2004) 211-219.
- [158] Q. K. Zhuang, F. Scholz, F. Pragst, *Electrochem. Commun.* 1 (1990) 406-410.
- [159] M. Gizdavic-Nikolaidis, J. Travas-Sejdic, G. A. Bowmaker, R. P. Cooney, P. A. Kilmartin, *Synth. Metals*. 140 (2004) 225-232.
- [160] R. Rapoport, I. Hanukoglu, D. A. Sklan, *Anal. Biochem.* 218 (1994) 309-313.
- [161] A. Moure, H. Dominguez, J. C. Parajo, *Process Biochem.* 41 (2006) 447-456.
- [162] H. Guo, Y. Kouzuma, M. Yonekura, *Food Chem.* 113 (2009) 238-245.
- [163] K. Suetsuna, H. Ukeda, H. Ochi, *J. Nutr. Biochem.* 11 (2000) 128-131.
- [164] H. Ukeda, S. Maeda, T. Ishii, M. Sawamura, *Anal. Biochem.* 251 (1997) 206-209.
- [165] Arnao, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Technol.* 2000, 11, 419-421.
- [166] J. F. Arteaga, M. Ruiz-Montoya, A. Palma, G. Alonso-Garrido, S. Pintado, J. M. Rodríguez-Mellado, *Molecules* 17 (2012) 5126-5138.
- [167] V. Bondet, W. Brand-Williams, C. Berset, *LWT - Food Sci. Technol.* 30 (1997) 609-615.
- [168] L. Barros, S. Falcão, P. Baptista, C. Freire, M. Vilas-Boas, I. C. F. R. Ferreira, *Food Chem.* 111 (2008) 61-66.
- [169] P. Kilmartin, H. Zou, A. Waterhouse, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 1957-1965.
- [170] M. Ortíz, P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards, *Analyst*. 127 (2002) 183-198.

- [171] E. V. Dorozhko, E. I. Korotkova, *Pharm. Chem. J.* 44 (2011) 581-584.
- [172] M. S. Cosio, *Food Chem.* 97 (2006) 725-731.
- [173] E. I. Korotkova, Y. A. Karbainov, A. Shevchuk, *J. Electroanal. Chem.* 518 (2002) 56-60.
- [174] O. Iruzi, *Biochim. Biophys. Acta.* 1721 (2005) 174-184.
- [175] P. A. Kilmartin, H. Zou, A. L. Waterhouse, *Am. J. Enol. Vitic.* 53 (2002) 294-302.
- [176] R. Bortolomeazzi, N. Sebastianutto, R. Toniolo, A. Pizzariello, *Food Chem.* 100 (2007) 1481-1489.
- [177] A. A. Starkov, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1147 (2008) 37-52.
- [178] D. A. F. Maltos, J. S. Cortés, B. V. Urdiales, C. N. A. González, *Investigación y ciencia* 18 (2010) 20-25.
- [179] A. Palma, M. Ruiz Montoya, J. F. Arteaga, J. M. Rodríguez Mellado, *J. Electrochem. Soc.* 160 (4) (2013) 213 – 218.
- [180] A. Palma, M. R. Montoya, J. F. Arteaga, J. M. R. Mellado, *J. Agr. Food Chem.* 62(3) (2014) 582 – 589.
- [181] R. E. Brito, J. M. R. Mellado, A. Palma, M. R. Montoya, J. F. Arteaga, *J. Electrochem. Soc.* 161(12) (2014) H854 – H859.
- [182] L. A. Khanova, Yu. E. Evstefeeva, *Russ. J. Electrochem.* 42 (2006) 1079 – 1084.
- [183] D. Ž. Sužnjević, F. T. Pastor, S. Ž. Gorjanović, *Talanta* 85 (2006) 1398 – 1403.
- [184] S. Ž. Gorjanović, M. M. Novaković, N. I. Potkonjak, I. Leskošek-Čukalović, D. Ž. Sužnjević, *J. Agr. Food Chem.* 58 (2010) 744 – 751.
- [185] S. Ž. Gorjanović, M. M. Novaković, P. V. Vukosavljević, F. T. Pastor, V. V. Tešević, D. Ž. Sužnjević, *J. Agr. Food Chem.* 58 (2010) 8400 – 8406.
- [186] M. M. Novaković, S. M. Stevanović, S. Ž. Gorjanović, P. M. Jovanovic, V. V. Tešević, M. A. Janković, D. Ž. Sužnjević, *J. Food Sci.* 76 (2011) C663 – C668.
- [187] K. Kikuchi, T. Murayama, *B. Chem. Soc. Jpn.* 49 (1976) 1554 – 1556.
- [188] A. McKillop, D. W. Young, *Synthetic Commun.* 7 (1977) 467 – 474.
- [189] A. Macfarlane, I. Macfarlane, *The Empire of Tea*, The Overlook Press (2004) 32.
- [190] A. Ya Yashin, B. V. Nemzer, E. Combet, Y. I. Yashin, *Journal of Food Research* 4 (3) (2015) 56-88.
- [191] Y. Zuo, H. Chen, Y. Deng, *Talanta* 57 (2002) 307-316.
- [192] J. Lee, D. H. Chambers, E. Chambers, K. Adhikari, Y. Yoon, *Molecules* 18 (2013) 10024-10041.
- [193] N. Turkman, Y. S. Velioglu, F. Sari, G. Polot, *Molecules* 12 (2007) 484-496.
- [194] R. Kowalski, T. Baj, G. Kowalska, U. Pankiewicz, *PLoS One* 25 (2015) 10 (6).

Capítulo 1

- [195] L. Bramati, F. Aquilano, P. Pietta, *J. Agr. Food Chem.* 51 (2003) 7472-7474.
- [196] L. Manzocco, M. Anese, M. C. Nicoli, *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 31 (1998) 694-698.
- [197] A. Stewart, W. Mullen, A. Crozier, *Molecular Nutrition and Food Research* 49 (1) (2005) 52-60.
- [198] H. Sakakibara, Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida, K. Kanazawa, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 571-581.
- [199] C. T. Ho, Q. Chen, H. Shi, K.-Q. Zhang, R. T. Rosen, *Prev. Med.* 21 (1992) 520-525.
- [200] N. D. Ghasemi, G. Asghari, A. Mostajeran, A. M. Najafabadi, *J. Curr. Chem. Pharm.* 3(1) (2013) 54-59.
- [201] A. Pirzad, H. Alyari, M. R. Shakiba, S. Zehtab-Salmasi, A. Mohammadi, *Agron. J.* 5 (3) (2006) 451-455.
- [202] F. S. Sharopov, V. A. Sulaimonova, W. N. Setzer, *Journal of Medicinally Active Plants* 1 (2) (2012) 76-84.
- [203] D. L. McKay, J. B. Blumberg, *Phytother. Res.* 21 (2007) 1-16.
- [204] A. Raal, A. Orav, E. Arak, *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* 21 (5) (2007) 406-411.
- [205] P. A. G. M. De Smet, K. Keller, R. Hänsel, R. F. Chandler, *Adverse Effects of Herbal Drugs* 2 (1993) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 303-306.
- [206] E. Reverchon, F. Senatore, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1) (1994) 154-158.
- [207] T. Beelders, E. Joubert, K. M. Kalili, A. de Villiers, *J. Sep. Sci.* 35 (14) (2012) 1808-1820.
- [208] T. Beelders, G. O. Sigge, E. Joubert, D. de Beer, A. de Villiers, *J. Chromatogr. A* 1219 (2012) 128-139.
- [209] G. Akdemir Evrendilek, *Int. J. Food Microbiol.* 202 (2015) 35-41.
- [210] M. Kelen, B. Tepe, *Bioresource Technol.* 99 (2008) 4096-4104.
- [211] A. Kasrati, C. A. Jamali, K. Bekkouche, R. Spooner-Hart, D. Leach, A. Abbad, *Chem. Biodivers.* 12 (2015) 823-831.
- [212] M. Lis-Balchin, S. G. Deans, E. Eaglesham, *Flavour Frag. J.* (13) (1998) 98-104.
- [213] A. de Sousa Barros, S. Maia de Morais, P. A. Travassos Ferreira, Í. G. Pinto Vieira, A. Aragão Craveiro, R. Oliveira dos Santos Fontenelle, J. Eire Silva Alencar de Menezes, F. Walber Ferreira da Silva, H. Araújo de Sousa, *Ind. Crop. Prod.* 76 (2015) 557-564.
- [214] K. S.C. Tang, I. Konczak, J. Zhao, *Food Chemistry* 192 (2016) 698-705.
- [215] M. Mkaddem, J. Bouajila, M. Ennajar, A. Lebrihi, F. Mathieu, M. Romdhane, *J. Food Sci.* 74 (7) (2009) M358-M363.
- [216] A. Viña, E. Murillo, *J. Brazil. Chem. Soc.* 14 (5) (2003) 744-749.

- [217] P. Pripdeevech, W. Chumpolsri, P. Suttiarporn, S. Wongpornchai, J. Serb. Chem. Soc. 75 (11) (2010) 1503-1513.
- [218] M. Musa Özcan, J.-C. Chalchat, Int. J. Food Sci. Nutr. 59 (7-8) (2008) 691-698.
- [219] Y. Jiang, N. Wu, Y. J. Fu, W. Wang, M. Luo, C. J. Zhao, Y. G. Zu, X. L. Liu, Environ. Toxicol. Pharmacol. 32 (1) (2011) 63-68.
- [220] S. Singh, B. Sankar, S. Rajesh, K. Sahoo, E. Subudhi, S. Nayak, J. Essent. Oil Res. 23 (6) (2011) 11-18.
- [221] Ma. M. Ortega-Nieblas, Ma. R. Robles-Burgueño, E. Acedo-Félix, A. González-León, A. Morales-Trejo, L. Vázquez-Moreno, Rev. Fitotec. Mex. 34 (1) (2011) 11-17.
- [222] V. Exarchou, N. Nenadis, M. Tsimidou, I. P. Gerotheranassis, A. Troganis, D. Boskou, J. Agric. Food Chem. 50 (19) (2002) 5294-5299.
- [223] B. Shan, Y. Z. Cai, M. Sun, H. Corke, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 7749-7759.
- [224] B. Teixeira, A. Marques, C. Ramos, C. Serrano, O. Matos, N. R. Neng, J. M. F. Nogueira, J. A. Saraiva, M. L. Nunes, J. Sci. Food Agric. 93 (2013) 2707-2714.
- [225] M. Kozłowska, A. E. Laudy, J. Przybyl, M. Ziarno, E. Majewska, Acta Pol. Pharm. 72 (4) (2015) 757-767.
- [226] A. I. Hussain, F. Anwar, S. T. H. Sherazi, R. Przybylski, Food Chem. 108 (2008) 986-995.
- [227] R. Wang, R. Wang, B. Yang, Innovative Food Science and Emerging Technologies 10 (2009) 289-292.
- [228] E. Schmidt, L. Jirovetz, G. Buchbauer, G. A. Eller, I. Stoilova, A. Krastanov, A. Stoyanova, M. Geissler, Jeobp 9 (2) (2006) 170-182.
- [229] L. Jirovetz, G. Buchbauer, I. Stoilova, A. Stoyanova, A. Krastanov, E. Schmidt, J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 6303-6307.
- [230] L. Jirovetz, G. Buchbauer, A. S. Stoyanova, E. V. Georgiev, S. T. Damianova, Int. J. Food Sci. Tec. 40 (2005) 305-310.
- [231] S.-Y. Tsai, S.-J. Huang, C.-C. Chyau, C.-H. Tsai, C.-C. Weng, J.-L. Mau, Asian Journal of Arts and Sciences 2 (1) (2011) 57-66.
- [232] V. K. Raina, A. Kumar, K. K. Aggarwal, J. Essent. Oil Bear. Pl. 8 (2) (2005) 187-191.
- [233] Muchtaridi, A. Subarnas, A. Apriyantono, R. Mustarichie, Int. J. Mol. Sci. 11(11) (2010) 4771-4781.
- [234] D. J. Daferera, B. N. Ziogas, M. G. Polissiou, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 2576-2581.

Capítulo 1

Summary:

In our planet there is a large amount of oxygen and therefore in nature almost all materials are oxidized. These redox reactions are very important because living organisms obtain most of their energy from them, as in photosynthesis and aerobic metabolism.

Although oxygen is essential for life, it can also be a source of disease through uncontrolled production of free radicals among which are the reactive oxygen species or ROS, which damage macromolecules (lipids, proteins, carbohydrates and nucleic acids) and alter cellular processes (membrane function, production of enzymes, cellular respiration, gene induction, etc.). These ROS can be radical or non-radical species. In the radical species group can be found Superoxide ion, Hydroxyl, Hydroperoxyl, Alkoxy and Peroxyl. Non-radical ROS are Singlet Oxygen, Ozone and Hydrogen Peroxide.

ROS are very small molecules highly reactive due to their unpaired electrons. These species are formed naturally as by-product of the normal metabolism of oxygen and have important roles in cell signaling. The oxidative stress is the exposure to various sources of formation of free radicals that cause an alteration of the balance that must exist between species or oxidizing factors and antioxidant by mechanisms to control production and/or propagation of the radicals. This imbalance may be due to an abrupt increase of oxidizing substances (mainly ROS), to a lack of antioxidants, or a combination of both factors. In these circumstances, the cells are exposed to an oxidizing environment, which generate adverse effects on the cellular redox state, causing reversible or irreversible damage to all types of biomolecules, including proteins, lipids, carbohydrates, nucleic acids (DNA) and components of the extracellular matrix, and initiating a series of chemical reactions which can produce alterations in the structure/function of organs, systems or specialized cell groups relationship, which is directly associated with a growing number of syndromes of medical and social interest.

More than a hundred diseases are related to the redox imbalance: pathological processes such as-Chester Erdheim, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Crohn's disease, many types of cancer, diabetes mellitus, cardiovascular diseases, atherosclerosis, rheumatic processes, gastroenteric and bronchopulmonary diseases. Also physiological processes such as aging, the damage caused by strenuous physical exercise, etc.

Much of the ROS play physiological roles of vital importance, but also are involved in unwanted oxidation reactions, against which the body has developed certain antioxidants defenses. The endogenous production of certain amounts of ROS under normal conditions, without exceeding specific limits, is a normal and inevitable exempt from the slightest oxidative damage thanks to the provision by the cell, which is essential to the life of this cellular process to be a process involved in regulating

metabolic and energy production, activation or inactivation of biomolecules, etc. and has antioxidant mechanisms with which these combat cell damage. At the same time, a considerable increase in the rate of formation of ROS with respect to the normal conditions, generally result in a decrease in defense mechanisms, and in an imbalance between the (now larger) antioxidant and oxidizing species. This implies a significant oxidative damage on certain molecules reflected in their biological functions.

In contrast to ROS or free radicals, the antioxidants are substances, present in low concentrations, which delay or prevent oxidation significantly of a substrate. Depending on how they interact with the oxidizing agents, antioxidants may be:

- Primary antioxidants: they prevent the formation of free radicals, especially the ROS. Vitamin E, some polyphenols such as Resveratrol or antioxidant enzymes. Thereby indirectly they reduce DNA and membranes damage.
- Secondary antioxidants: they interrupt the propagation of free radicals (for example Ascorbic Acid) or displace ROS (for example Carotenoids and Glutathione), by inhibiting ROS generation, and preventing the metabolic activation of carcinogens. In this group are the antioxidants denominated "Scavengers".
- Tertiary antioxidants: they repair the damage caused by free radicals or eliminate molecules that have been damaged by modifying the redox potential to improve DNA repair. Examples are Vitamin C, some Polyphenols, Selenium and N-acetylcysteine.

In the human diet, there are numerous antioxidants of particular interest because of its possible protective action against free radicals produced by oxidative stress. The harmful effects of free radicals are controlled by a variety of antioxidants, such as endogenous or body's own antioxidants (Coenzyme Q, Glutathione, Albumin, Transferrin, Ceruloplasmin, Uric Acid, Thiocetic Acid, Bilirubin...), exogenous antioxidants or acquired through the diet (Vitamins E And C, Carotenoids, Flavonoids, Squalene, Selenium, Phenolics...), antioxidant enzymes (Superoxide Dismutase (SOD), Catalase, Glutathione Peroxidase, Lycopene...) and cofactors antioxidants (Copper, Magnesium, Manganese, Selenium...).

The food industry seeks customer satisfaction by applying technical modifications to consumer products, such as adding flavours and aromas that provide unique tastes and smells, appreciated by consumers. The addition of flavourings is under continuous observation and evaluation by the European Community (according to Council Directive 88/388 / EEC) to ensure that consumption do not danger humans. A main feature understudied in this "continuous observation" is the antioxidant capacity, an important feature in preventing many diseases.

There is great interest in product research and antioxidants of natural origin against those of synthetic origin. Some synthetic antioxidants are frequently used as food

Capítulo 1

additives in consumer products and are regulated by law, because of their possible toxic effects when consumed in excess. It has been established a relationship of condiments and spices with medical and physiological properties, highly interesting to society.

The determination of the antioxidant activity of pure compounds it is essential for the knowledge of the protection against oxidation or deterioration of food with these components. Antioxidants are usually found in different proportions, foods containing mixtures of different antioxidants, each of them having a different activity, this making the determination of the antioxidant activity a difficult task.

So, it is mandatory to acquire standardized unified methods that serve as a protocol for the proper application of the tests, and that be able to compare results between food or commercial products. It is required to comply with other requirements, the use of a biologically relevant radical, the possibility of measurement in lipophilic and hydrophilic media and a useful method for quality routine control of large volumes of samples. In addition, the instrumentation should be easily accessible, with high sensitivity, high reproducibility, simple, high speed and low cost, among others.

Actually, the most used methods for the antioxidant capacity determination are based on two reaction types: Hydrogen Atom Transfer (HAT) and Single Electron Transfer (SET). The SET methods are: Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) and N,N-Dimethylphenylenediamine Dihydrochloride (DMPD). The HAT methods are: Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC), Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter (TRAP), Crocin Bleaching Assay (CBA), Tiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS), Total Oxyradical Scavenging Capacity (TOSC), Low Density Lipoprotein (LDL's), Deoxyribose assay and Xanthine oxidase assay. There is another group more, where are combined the HAT and the SET reactions, and the methods are: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) and 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH).

In recent years, the spectrophotometric methods have gained some impact on the *in vitro* analysis of the antioxidant capacity of biological samples and plant extracts, with the main advantages of simplicity, low cost, high speed, in addition to that the results are similar to those obtained by the DPPH method.

In general, the antioxidants act as a reducing agents and, in solution, they tend to be easily oxidized on the surface of an electrode. Based on this fact, an intrinsic relationship between the electrochemical behaviour of the antioxidant activity of the compounds is established.

Glassy Carbon Electrodes (GCE) have been used to determinate the antioxidant capacity of many compounds using Cyclic Voltammetry. One limitation of the technique is that it requires that the antioxidant compound must be inactive in the range of potential

where oxygen reduction occurs. Furthermore there are antioxidants whose oxidation potentials differ by more than 80 to 120 mV, so two or more signals appear. However, it is a good approximation to the antioxidant capacity of individual compounds.

The electrochemical study of the antioxidant capacity of different species has been widely developed using mercury electrodes and Differential Pulse Voltammetry (DPV) for wines, hard liquors or beers samples. The advantage of this method is that H_2O_2 is stable in cells, compared to other ROS that need to be produced "in vivo". The use of polarography for the hydrogen peroxide electro-oxidation, with consequent formation of peroxide radicals, is useful to record the oxidation current of this reaction. The decreasing oxidation current in presence of an antioxidant is used to determine the antioxidant capacity.

It has been shown that it is very important to know the antioxidant capacity of foods and drinks, being also important the relation between this property and their composition. For this reason, in this Thesis it has been decided to study the extracts in aqueous and methanol media of some of the most popular teas, infusions and spices, using two of the most extended analytical technics: High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Gas Chromatography-Mass Spectrum (GC-MS).

CAPÍTULO II

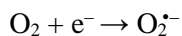
NUEVOS MÉTODOS DE
MEDIDA ELECTROQUÍMICA
DE CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE

2.1. Introducción

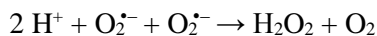
Los primeros organismos vivos sobre la tierra proliferaron bajo condiciones atmosféricas con poco oxígeno. Al aumentar la proporción de oxígeno, muchos de estos organismos murieron y otros comenzaron a evolucionar y a desarrollar un sistema de defensa antioxidante para proteger sus células contra la toxicidad del oxígeno, llegando incluso, algunos de ellos, a adaptar su biología y emplear algo de este oxígeno en producir energía celular.

Los seres vivos que dependen del oxígeno para obtener energía metabólica en forma de ATP, producen además especies moleculares oxidantes cuya reactividad y potencial citotóxico debe ser estrictamente controlado. Dicho control se lleva a cabo por moléculas conocidas como antioxidantes, algunas producidas por el organismo y otras adquiridas mediante la dieta. Una porción del oxígeno que respiramos se reduce, por una vía alternativa de la citocromo oxidasa, dando lugar a formas moleculares de oxígeno parcialmente reducidas conocidas como ROS (Reactive Oxygen Species o Especies Reactivas de Oxígeno).

La reducción del oxígeno molecular (O_2) produce el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y es el precursor de la mayoría de otras especies de oxígeno reactivo (ROS):



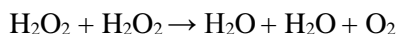
Dismutación del superóxido para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2):



El peróxido de hidrógeno puede ser parcialmente reducido a radical hidroxilo (OH^{\bullet}):



O puede reducirse completamente a agua y oxígeno molecular, comenzando así de nuevo el ciclo:



Hay muchas situaciones en las que la formación de ROS aumenta, como ocurre a causa de alteraciones nutricionales y metabólicas, en la exposición a contaminantes ambientales, durante procesos de sobrecarga física, o bien, en estados carenciales de las funciones orgánicas que provocan cáncer y envejecimiento. La reactividad de las ROS les permite interactuar con macromoléculas de diversa naturaleza, entre las que se incluyen los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, modificando su estructura y su función. Por ello se ha encontrado relación entre la formación de ROS y diversas

Capítulo 2

enfermedades, especialmente aquellas de carácter degenerativo [1]: Lesiones inflamatorias, deficiencias nutricionales, enfermedades autoinmunes, Parkinson, Alzheimer, infartos de miocardio, neurodegeneración, envejecimiento, neoplasias, aterosclerosis, diabetes, etc.

Para contrarrestar los efectos negativos de las ROS, las células han desarrollado a lo largo de su evolución mecanismos moleculares muy efectivos que implican especies con actividad antioxidante (antioxidantes) para proporcionar al organismo una cobertura defensiva muy eficaz. Un antioxidante es aquella molécula capaz de prevenir y/o evitar la oxidación de otra molécula, bien por interacción y estabilización de especies reactivas o bien por la transformación de éstas en configuraciones más estables y de reactividad reducida. Su función es de gran importancia, ya que mantienen a las especies reactivas por debajo de sus umbrales citotóxicos.

Los antioxidantes pueden ejercer su efecto mediante diferentes modos de acción. El que ocupa este capítulo está relacionado con el daño ocasionado por las especies oxidantes a los ácidos nucleicos. Los antioxidantes pueden impedir o reparar dicho daño.

2.2. Objetivos de este capítulo

Este capítulo, tiene como objetivo principal evaluar el daño que un productor de ROS provoca a moléculas de nucleósidos que simulan la estructura genética (ADN), y cómo un antioxidante interacciona con ese oxidante “protegiendo” los nucleósidos. Para ello, se lleva a cabo la inmovilización electroquímica de purinas, concretamente los nucleósidos adenosina y guanosina, sobre electrodos de carbón para desarrollar capas de bio-reconocimiento estables para la detección voltamétrica de la capacidad antioxidante de diversos compuestos. Se presta especial atención al estudio de la influencia de las condiciones experimentales sobre la capa inmovilizada, además de la electrooxidación de las purinas. Tales variables son: la concentración del compuesto inmovilizado, el tiempo de deposición, el pH y el potencial aplicado para la deposición de la purina en el electrodo de carbón.

La composición del sistema de detección electroquímico consiste en la capa de adenosina o guanosina sobre electrodos de carbón vitrificado (GCE) y de pasta de carbón (CPE), como objetivo para la oxidación. Se utiliza una reacción de tipo Fenton para generar radicales OH^\bullet , que interactúen con los nucleósidos.

En una segunda aproximación se utilizará un hidroperóxido sintético. El Hidroperóxido de cumeno, para generar electroquímicamente radicales aromáticos en lugar de los radicales OH^\bullet , con objeto de desarrollar un método de medida electroquímica de

actividad antioxidante, distinto de los propuestos en la bibliografía y comentados en el capítulo 1 de esta tesis.

2.3. Experimental

2.3.1. Instrumental

Para las pesadas de los reactivos y otras sustancias empleadas se utilizó una balanza Sartorius, que proporciona una precisión de ± 0.00001 g y una balanza analítica de precisión Mettler Toledo AB104, con una sensibilidad de 0.1 mg.

Las medidas de pH se realizaron con un pH metro Crison GLP 21, con una precisión de ± 0.01 unidades de pH, calibrado previamente con disoluciones tampón estandarizadas de pH 7.00 y 4.00.

Los registros electroquímicos en voltametría cíclica se llevaron a cabo con un sistema IJ Cambria, CH Instruments, CHI650A Electrochemical Workstation conectado a un PC con el software adecuado proporcionado por la casa.

2.3.2. Electroodos

Todas las medidas se llevaron a cabo en celdas de 25 mL de capacidad. Las celdas poseen entrada para los electrodos y el nitrógeno.

- Electroodos de trabajo:
 - Electrodo de carbón vitrificado de CH Instruments Inc modelo CHI104.
 - Electrodo de pasta de carbón de gran superficie (de síntesis en el laboratorio) de la casa Metrohm.
- Electrodo de referencia: Ag/AgCl/3M KCl de Metrohm modelo 6.0733.100
- Electrodo auxiliar: Pt de Metrohm modelo 6.0301.100

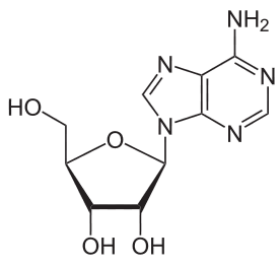
2.3.3. Reactivos y disoluciones

Los reactivos empleados fueron: ácido clorhídrico (HCl), ácido fosfórico (H₃PO₄), hidróxido de sodio (NaOH), Adenina y Ácido Ascórbico de Merck; Adenosina de Aldrich-Chem.; Guanina, Guanosina, Ácido Gálico e Hidroperóxido de Cumeno de Sigma-Aldrich.

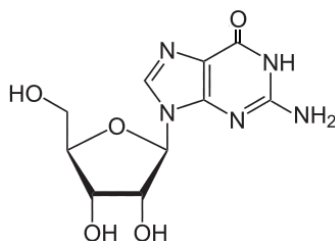
Capítulo 2

Para la preparación del electrodo de pasta de carbón, se emplearon: grafito de tamaño <20 micras (C) de Sigma-Aldrich y Parafina líquida de calidad espectroscópica, de Merck.

Para el Reactivo Fenton, se empleó: cloruro de hierro (II) (FeCl_2) de Sigma-Aldrich; peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de Merck.



Adenosina



Guanosina

2.3.4. Condiciones de trabajo

La temperatura de trabajo se mantuvo constante durante los experimentos, a un valor de $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

Para la limpieza del GCE, se realizaron etapas sucesivas de pulido mecánico: en primer lugar, se pulió con papel abrasivo de carburo de silicio durante dos minutos aproximadamente, después se utilizó pasta de diamante ($0.25\mu\text{m}$), y por último Alúminas A y B de 0.3 y $0.05\mu\text{m}$ respectivamente. Los residuos fueron eliminados de la superficie del electrodo en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos.

Antes de cada medida, se activó electroquímicamente el GCE. El acondicionamiento se llevó a cabo en una celda de 25 mL de capacidad con H_3PO_4 0.2 M, mediante la aplicación de un potencial de 1.7 V durante un tiempo de 300 segundos. A continuación se realizó una voltametría cíclica de 5 ciclos entre 0.2 y 1.5 V a una velocidad de barrido de 0.1 V/s.

Para la construcción del electrodo de pasta de carbón, se mezclaron 0.5 g de grafito (<20 micras) con 750 μL de parafina de alta pureza hasta formar una pasta densa. Se fue introduciendo, prensando continuamente, sobre la varilla de vidrio que conforma el electrodo.

Las disoluciones de los reactivos se realizaron con agua ultrapura, empleando un sistema Millipore MILLI Q, y se almacenaron a temperatura ambiente. Se comprobó

que las disoluciones no se alteraban con el tiempo al menos durante todo el tiempo que fueron utilizadas, siendo reproducibles los experimentos realizados a lo largo de varios días.

Las experiencias con hidroperóxido de cumeno (HPC) se realizaron a una concentración en célula de $1 \cdot 10^{-3}$ M, excepto en los casos en que se hicieron estudios con la concentración.

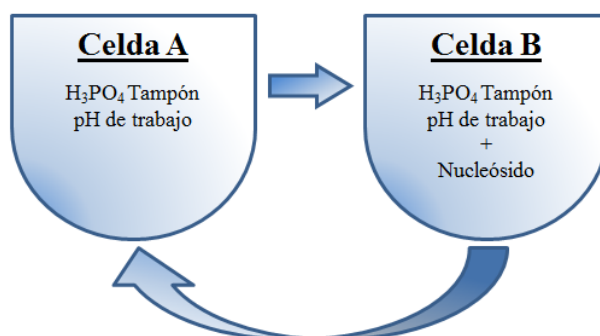
Las medidas se llevaron a cabo después de eliminar el oxígeno, para lo cual se pasó una corriente de nitrógeno durante 10 minutos.

La activación electroquímica, fue la única parte del proceso que se realizó sin agitación. La adsorción de los nucleósidos y las posteriores medidas voltamétricas, se llevaron a cabo con agitación (estado estacionario).

2.3.5. Procedimiento de trabajo en la simulación del daño a ácidos nucleicos

Para cada experiencia se utilizaron varias celdas de medida.

Las medidas para la optimización de variables para la inmovilización de los nucleósidos, se llevaron a cabo de la siguiente manera:



Paso 1: En la *celda A*, se realizó la activación electroquímica del electrodo mediante la aplicación de un potencial de 1.7 V durante 300 segundos. Posteriormente, se realizó una voltametría cíclica de 5 ciclos entre 0.2 y 1.5 V a una velocidad de barrido de 0.1 V/s, como parte de la activación electroquímica, con la que se comprobaba que la superficie del electrodo estaba completamente limpia, ya que no se debía obtener señal alguna. En caso de que se obtuviera alguna señal correspondiente al nucleósido o a cualquier otro compuesto en este voltagrama, se repetía el proceso de activación, y si aun así persistía la señal, se pasaba a repetir el pulido mecánico. En ninguna de las

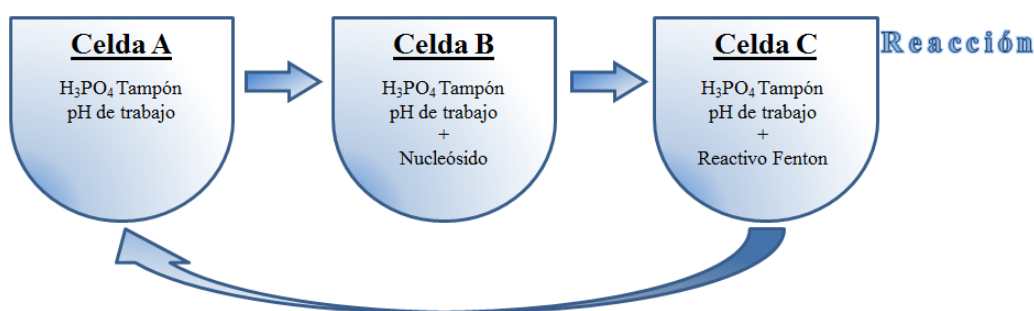
Capítulo 2

experiencias realizadas, se obtuvo señal al realizar el voltagrama de la activación electroquímica del electrodo. Después de esto, pasamos a la *celda B*.

Paso 2: En la *celda B*, se realizó una voltametría cíclica de 5 ciclos entre 0.2 y 1.5 V a una velocidad de barrido de 0.1 V/s, para comprobar que en esta celda sí se obtenía señal en el rango de potencial de trabajo, debido al nucleósido presente en la disolución. Una vez comprobado el voltagrama obtenido, se procedió a la inmovilización de dicho nucleósido en las condiciones que se establecieron para cada experiencia.

Paso 3: Por último, para la medida de la señal voltamétrica correspondiente al nucleósido inmovilizado, pasamos de nuevo el electrodo de trabajo a la *celda A*, y es en ésta donde realizamos la medida. Una vez obtenido el voltagrama, comenzamos de nuevo con la activación electroquímica (*Paso 1*).

Para la validación del sensor, se emplearon tres celdas:



Teniendo en cuenta esto, el proceso que se utilizó para las medidas de la actividad antioxidante, era muy parecido al utilizado para la inmovilización de los nucleósidos en el electrodo de trabajo:

Paso 1: En la *celda A*, se realizó la activación electroquímica del electrodo mediante la aplicación de un potencial de 1.7 V durante 300 segundos. Posteriormente, se realizó una voltametría cíclica de 5 ciclos entre 0.2 y 1.5 V a una velocidad de barrido de 0.1 V/s, como parte de la activación electroquímica, con la que se comprobaba que la superficie del electrodo estaba completamente limpia, ya que no se debía obtener señal alguna. En caso de que se obtuviera señal correspondiente al nucleósido o a cualquier otro compuesto en este voltagrama, se repetiría el proceso de activación, y si aun así persistiese la señal, se pasaría a repetir el pulido mecánico. En ninguna de las experiencias realizadas, se obtuvo señal al realizar el voltagrama de la activación electroquímica del electrodo. Después de esto, pasamos a la *celda B*.

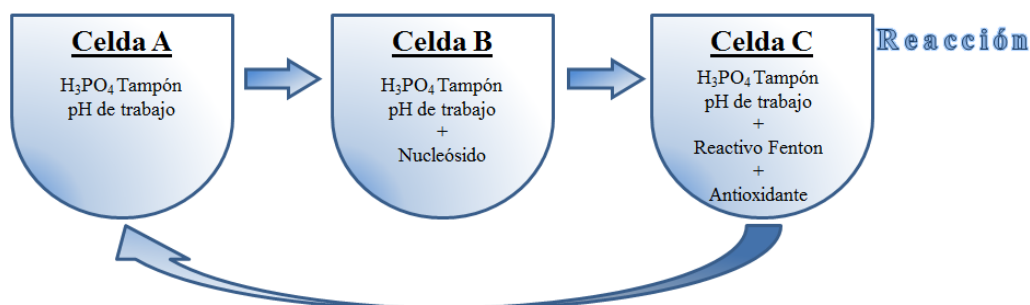
Paso 2: En la *celda B*, se realizó una voltametría cíclica de 5 ciclos entre 0.2 y 1.5 V a una velocidad de barrido de 0.1 V/s, para comprobar que en esta celda sí se obtenía

señal en el rango de potencial de trabajo, debido al nucleósido presente en la disolución. Una vez comprobado el voltagrama obtenido, se procedió a la inmovilización de dicho nucleósido en las condiciones que se establecieron como óptimas, con anterioridad.

Paso 3: En este paso, se llevó el electrodo de trabajo con el nucleósido ya inmovilizado, a la *celda C* donde se dejó reaccionar con el reactivo de Fenton durante un tiempo fijo, para que la reacción se desarrollase siempre en el mismo grado (simplemente introducir el electrodo en la *celda C*, y esperar el tiempo estipulado). Pasado este tiempo de reacción, se sacó el electrodo de trabajo y se introdujo de nuevo en la *celda A*.

Paso 4: Una vez hemos sacado el electrodo de trabajo de la *celda C* y lo pasamos a la *celda A*, se procedió a medir la señal correspondiente al nucleósido que quedaba inmovilizado en la superficie del electrodo de trabajo, después de haber reaccionado en la *celda C*. Se hizo de esta manera, para evitar que la reacción siguiese avanzando, ya que al cambiar el electrodo a la *celda A*, que carecía de reactivo Fenton, la reacción se paraba, y siempre después de un mismo tiempo de reacción. Además, la medida debía hacerse en la *celda A*, para asegurarnos de que ninguno de los reactivos interfiriese en la señal obtenida. Una vez se obtuvo la señal, pasamos a comenzar de nuevo el proceso para otra experiencia (*Paso 1*).

Para la validación del sensor utilizando un antioxidante, lo único que se modificaría es la *Celda C*, donde se añadiría dicho compuesto, siendo la manera de proceder, exactamente igual que se acaba de indicar, pero con el siguiente esquema de celdas:



2.4. Resultados y Discusión

2.4.1. Simulación del daño a ácidos nucleicos

2.4.1.1. Optimización de variables para la inmovilización de los nucleósidos Adenosina y Guanosina sobre GCE

Para la optimización de las diferentes variables, concentración, pH, potencial y tiempo de deposición, se han realizado experimentos consistentes en una serie de medidas de voltametría cíclica en disoluciones de adenosina de manera que de las cuatro variables se mantienen constantes tres de ellas y se varía la cuarta.

2.4.1.1.1. Adenosina

Para la *optimización del potencial de deposición* se han realizado medidas de voltametría cíclica en disoluciones de adenosina a concentración, pH y tiempo de deposición constantes. En la **Figura 2.1** se representan los voltagramas para los diferentes potenciales de deposición.

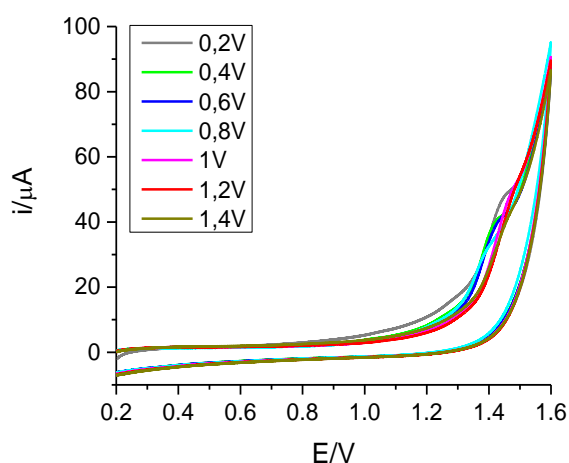


Figura 2.1. Voltagramas cíclicos para distintos valores de potencial de deposición a $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Concentración de adenosina: $1.68 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. pH 4.15. Tiempo de deposición: 180 s.

La **Figura 2.2** muestra la dependencia de las intensidades de pico, medidas extrapolando la intensidad del voltagrama a potenciales previos a la oxidación de la adenosina, en función del potencial aplicado.

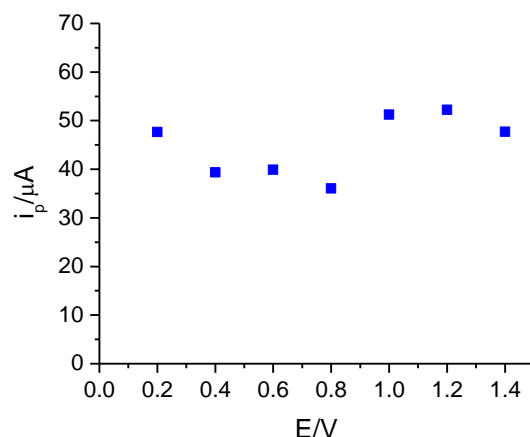


Figura 2.2. Representación de la intensidad de pico vs. potencial de deposición. Concentración de adenosina: $1.68 \cdot 10^{-5}$ M. pH 4.15. $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. Tiempo de deposición: 180 s.

Como puede apreciarse en la figura anterior, los potenciales de deposición a los cuales se obtienen las mayores intensidades son los más altos, aunque a partir de 1.2 V hay una disminución, probablemente debido a que comienza a darse la oxidación de la adenosina, por lo cual se concluye que el potencial óptimo de deposición es de 1.2 V. De todas formas, las señales medidas a potenciales de deposición en torno a 0.5 V son también suficientes para asegurar un buen recubrimiento del electrodo.

Para la *optimización del pH de deposición* se han realizado medidas de voltametría cíclica en disoluciones de adenosina a concentración, potencial y tiempo de deposición constantes.

El pico de oxidación se desplaza hacia potenciales menos positivos a medida que aumenta el pH del medio. Esto quiere decir que en el proceso de oxidación hay una reacción de disociación ácido-base que tiene lugar antes o en la etapa determinante de la velocidad del mecanismo de oxidación. Esto se aprecia en la **Figura 2.3**, en la que se representan los voltagramas para los diferentes valores de pH. En este caso se ha tenido que utilizar un potencial de deposición más bajo para garantizar que durante el tiempo de deposición no se generan productos de oxidación de la adenosina que puedan modificar la naturaleza de la capa adsorbida sobre el electrodo.

En la **Figura 2.4** se observan las intensidades de pico obtenidas para cada valor de pH. Como puede verse, los valores de pH a los cuales se obtienen las mayores intensidades son los más bajos. A partir de pH 5.0 hay una disminución muy importante, debida probablemente a que la molécula en medios ácidos se encuentra protonada (su pK es de

Capítulo 2

3.6 [2]) dando lugar a que en la disolución aparezca una especie cargada positivamente y cuya adsorción a los potenciales de trabajo (positivos), es más difícil que la de la especie no cargada. Por tanto se concluye que el pH óptimo de trabajo es de 5.0.

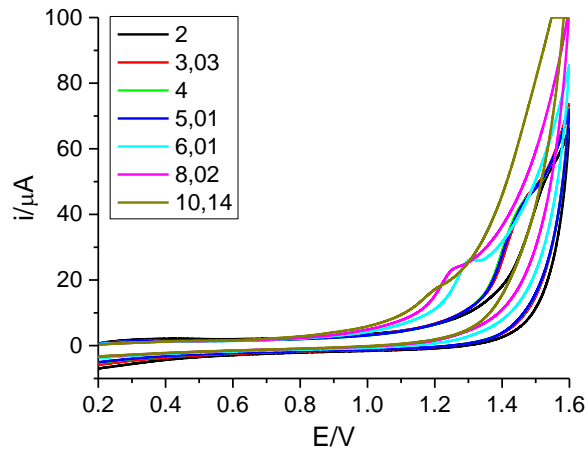


Figura 2.3. Voltagramas cíclicos para distintos valores de pH. $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Concentración de adenosina: $1.68 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Potencial de deposición: 0.4 V. Tiempo de deposición: 180 s.

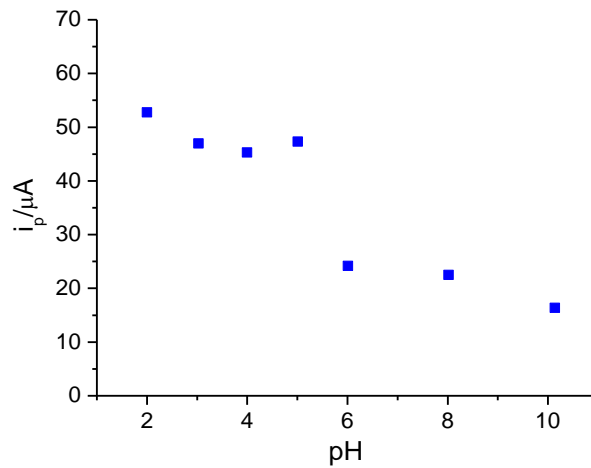


Figura 2.4. Representación de la intensidad de pico vs. pH. $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Concentración de adenosina: $1.68 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Potencial de deposición: 0.4 V. Tiempo de deposición: 180 s.

La *optimización del tiempo de deposición* es importante debido a que es una variable que condiciona la elaboración del electrodo que se utilizará posteriormente para medidas de capacidad antioxidante. Un tiempo de deposición grande implica un mayor

tiempo de medida en los experimentos globales. Interesa disminuir en lo posible este tiempo.

Se han realizado medidas de voltametría cíclica en disoluciones de adenosina a concentración, pH y potencial de deposición constantes.

En la **Figura 2.5** se representan los voltagramas para los diferentes valores de tiempo de deposición, mientras que en la **Figura 2.6** se pueden observar las intensidades de pico obtenidas para cada tiempo de deposición.

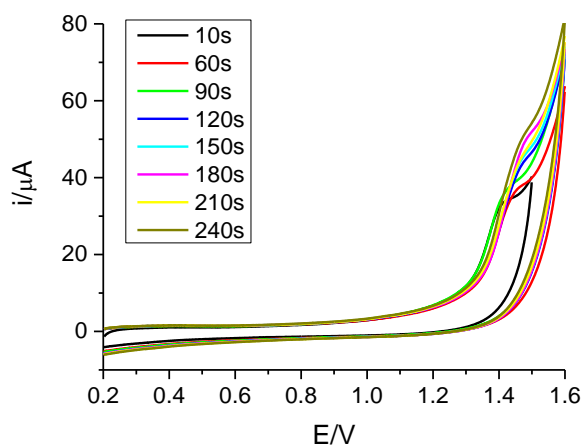


Figura 2.5. Voltagramas cíclicos para distintos tiempos de deposición. Concentración de adenosina: $1.68 \cdot 10^{-5}$ M. pH 4.7. Potencial de deposición: 0.4 V. $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

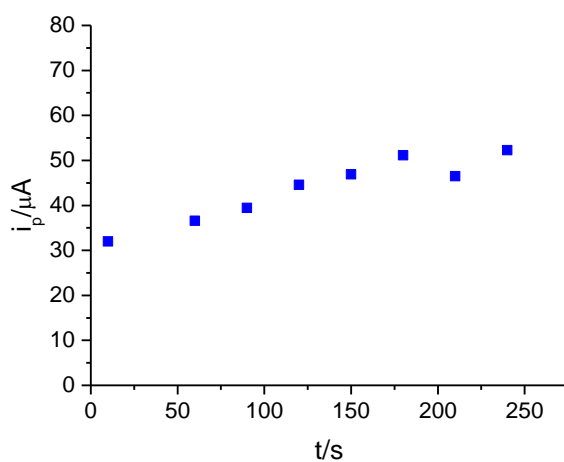


Figura 2.6. Representación de la intensidad de pico vs. tiempo de deposición. Concentración de adenosina: $1.68 \cdot 10^{-5}$ M. pH 4.7. Potencial de deposición: 0.4 V. $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

Como puede apreciarse en la figura anterior, la tendencia general de la intensidad máxima de pico es aumentar conforme aumenta el tiempo de deposición, lo cual es lógico, ya que a mayor tiempo de deposición, mayor cantidad de adenosina se depositará (hasta llegar a saturarse el electrodo), y por eso se obtiene una señal mayor. Los tiempos de deposición a los cuales se obtiene las mayores intensidades son 180 segundos y 240 segundos, fijándose como tiempo de deposición óptimo 180 segundos, ya que la mejora de la señal no compensa la espera. Uno de los objetivos de la optimización es reducir en lo posible el tiempo de preparación del electrodo.

Para la *optimización de la concentración de adenosina* se han realizado medidas de voltametría cíclica en disoluciones a pH, potencial y tiempo de deposición constantes.

En la **Figura 2.7** se representan los voltagramas para los diferentes valores de concentración, mientras que en la **Figura 2.8** se pueden observar las intensidades de pico máximas obtenidas para cada concentración.

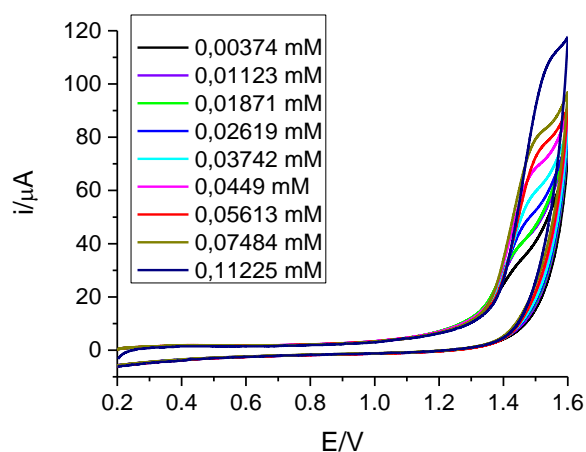


Figura 2.7. Voltagramas cíclicos para distintas concentraciones de Adenosina. pH 3.99. Potencial de deposición: 0.4 V. Tiempo de deposición: 180s. $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

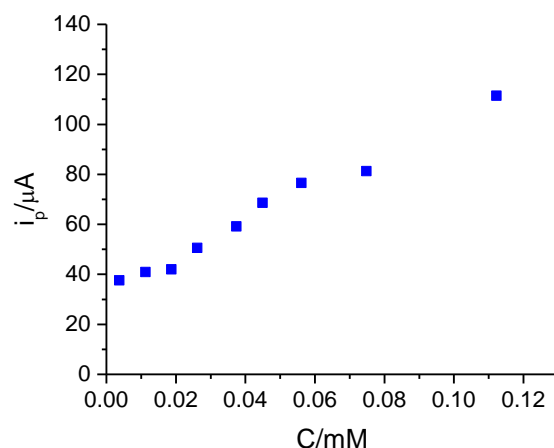


Figura 2.8. Representación gráfica de Intensidad de pico vs. concentración de Adenosina. pH 3.99. Potencial de deposición: 0.4 V. Tiempo de deposición: 180s. $v=0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

Como puede apreciarse, la concentración óptima es 0.056 mM, ya que a mayores concentraciones se obtiene una intensidad de pico algo mayor, pero se desplaza a potenciales mayores, con lo que la señal se solapa con la del electrolito soporte y se comete un mayor error en la medida de la intensidad.

En definitiva, las *condiciones óptimas de deposición de la adenosina sobre el GCE* son:

- Potencial Óptimo de Deposición: $E_{\text{óptimo}} = 1.2 \text{ V}$
- pH Óptimo de Deposición: $\text{pH}_{\text{óptimo}} = 5.0$
- Tiempo Óptimo de Deposición: $t_{\text{óptimo}} = 180 \text{ segundos}$
- Concentración Óptima en la celda B para la Deposición: [Adenosina] = **0.056 mM**

2.4.1.1.2. Guanosina

Como en el caso anterior, para la *optimización del potencial de deposición* se han realizado medidas de voltametría cíclica en disoluciones de guanosina a concentración, pH y tiempo de deposición constantes.

En la **Figura 2.9** se representan los voltagramas para los diferentes potenciales de deposición, mientras que en la **Figura 2.10** se pueden observar las intensidades de pico a cada potencial.

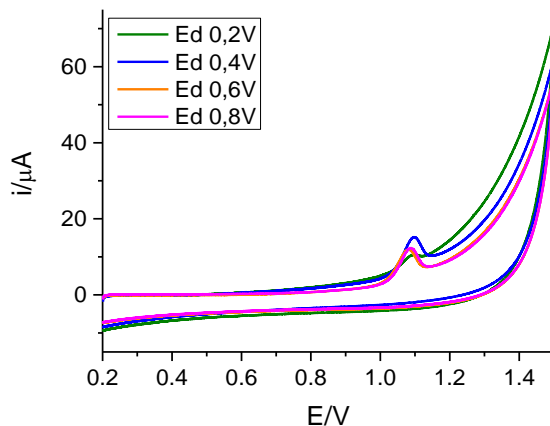


Figura 2.9. Voltagramas cíclicos a $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ para distintos valores de potencial de deposición. Concentración de guanosina: $1.7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. pH 4.15. Tiempo de deposición: 180 s.

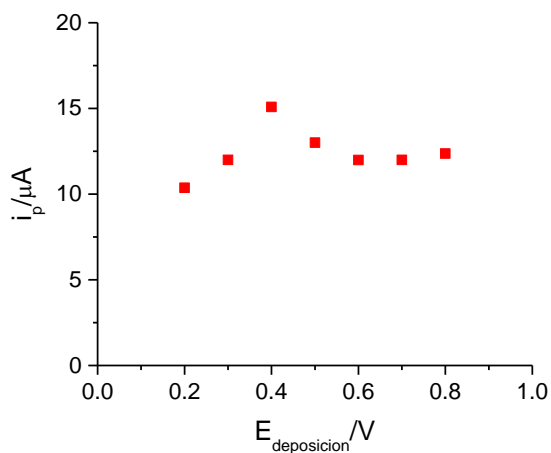


Figura 2.10. Representación de la intensidad de pico vs. potencial de deposición. $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. Concentración de guanosina: $1.7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. pH 4.15. Tiempo de deposición: 180 s.

El potencial de deposición al cual se obtiene la mayor intensidad es a 0.4 V, fijándose éste como potencial óptimo de deposición para la Guanosina.

Para la *optimización del pH de deposición* se han registrado voltagramas cíclicos a concentración, potencial y tiempo de deposición constantes.

Las **Figuras 2.11** y **2.12** recogen, respectivamente, los voltagramas para los diferentes valores de pH, y las intensidades de pico máximas a cada valor de pH.

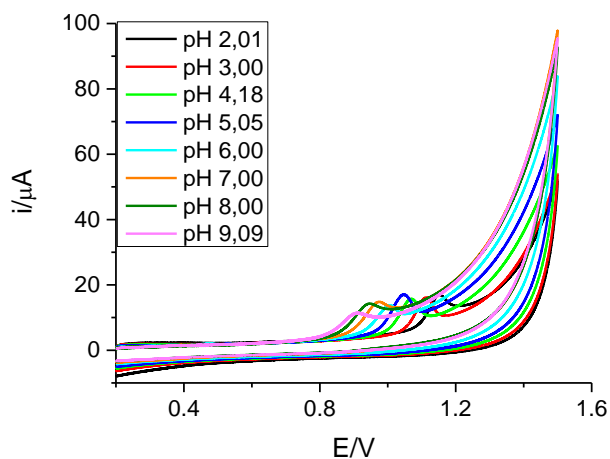


Figura 2.11. Voltagramas cíclicos para distintos valores de pH. $v=0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Concentración de guanosina: $1.7\cdot 10^{-5} \text{ M}$. Potencial de deposición: 0.4V. Tiempo de deposición: 180 s.

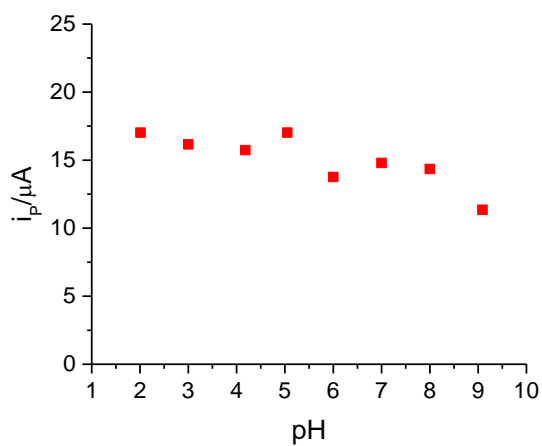


Figura 2.12. Representación de la intensidad de pico vs. pH. $v=0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Concentración de guanosina: $1.7\cdot 10^{-5} \text{ M}$. Potencial de deposición: 0.4 V. Tiempo de deposición: 180 s.

Los valores de pH a los cuales se obtienen las mayores intensidades son los más bajos, aunque a partir de 5.0 hay una disminución, por lo cual se concluye que el pH óptimo de trabajo es de 5.0.

Capítulo 2

Para la *optimización del tiempo de deposición* se han realizado medidas de voltimetría cíclica en disoluciones de guanosina a concentración, pH y potencial de deposición constantes.

En la **Figura 2.13** se representan los voltagramas para los diferentes valores de tiempo de deposición, mientras que en la **Figura 2.14** se pueden observar las intensidades de pico máximas obtenidas para cada tiempo de deposición.

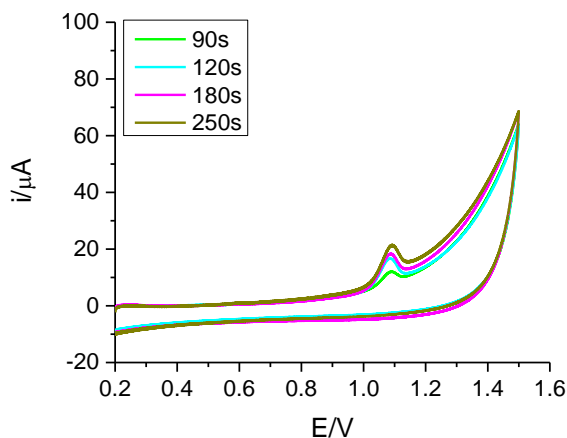


Figura 2.13. Voltagramas cíclicos para distintos tiempos de deposición. Concentración de guanosina: $1.7 \cdot 10^{-5}$ M. pH 4.21. Potencial de deposición: 0.4 V. $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

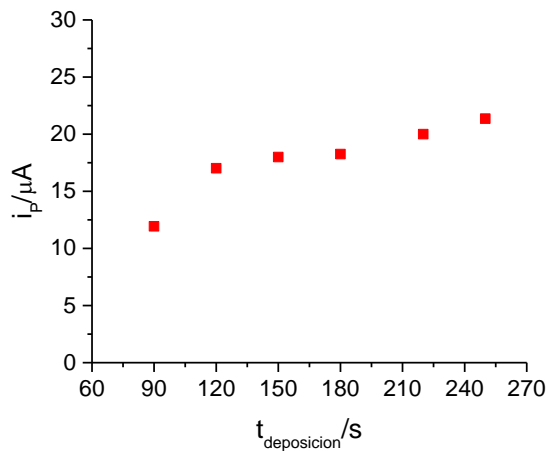


Figura 2.14. Representación de la intensidad de pico vs. tiempo de deposición. Concentración de guanosina: $1.7 \cdot 10^{-5}$ M. pH 4.21. Potencial de deposición: 0.4 V. $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

La tendencia general de la intensidad máxima de pico es aumentar conforme aumenta el tiempo de deposición, lo cual es lógico, ya que a mayor tiempo de deposición, mayor cantidad de guanosina se depositará (hasta llegar a saturarse el electrodo), y por eso se obtiene una señal mayor. Los tiempos de deposición a los que se obtienen las intensidades mayores son 180 segundos y 240 segundos, fijándose como tiempo de deposición óptimo 180 segundos, ya que la mejora de la señal no compensa la espera. Uno de los objetivos de la optimización es reducir en lo posible el tiempo de preparación del electrodo.

Para la *optimización de la concentración de guanosina* se han realizado medidas de voltametría cíclica en disoluciones a pH, potencial y tiempo de deposición constantes.

En la **Figura 2.15** se representan los voltagramas para los diferentes valores de concentración, mientras que en la **Figura 2.16** se pueden observar las intensidades de pico máximas obtenidas para cada concentración.

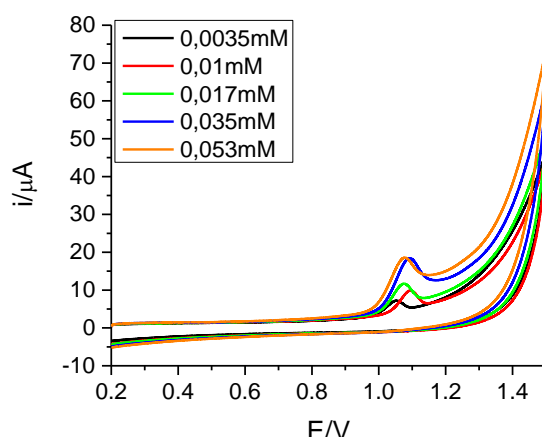


Figura 2.15. Voltamogramas cíclicos a $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ para distintos valores de concentración de Guanosina a pH 5.05. Potencial de deposición: 0.4 V. Tiempo de deposición: 180s.

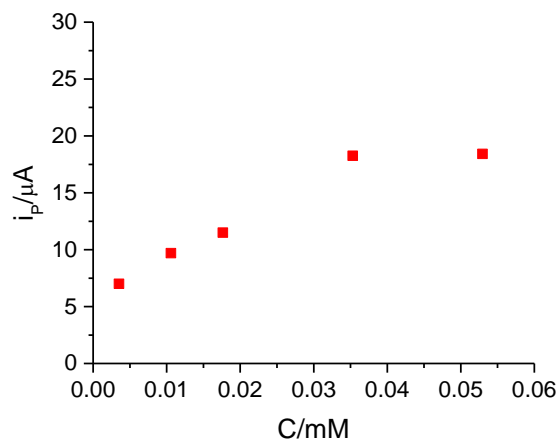


Figura 2.16. Representación de la intensidad de pico vs. concentración de Guanosina. pH 5.05. Potencial de deposición: 0.4 V. Tiempo de deposición: 180 s. $v=0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

Como puede apreciarse en la figura anterior, la concentración óptima es 0.035 mM, ya que a mayores concentraciones, apenas aumenta la intensidad, manteniéndose prácticamente constante.

En definitiva, las condiciones óptimas de deposición de la guanosina sobre el GCE son:

- Potencial Óptimo de Deposición: $E_{\text{óptimo}} = \mathbf{0.4 \text{ V}}$
- pH Óptimo de Deposición: $\text{pH}_{\text{óptimo}} = \mathbf{5.0}$
- Tiempo Óptimo de Deposición: $t_{\text{óptimo}} = \mathbf{180 \text{ segundos}}$
- Concentración Óptima en la celda B para la Deposición: $[\text{Guanosina}] = \mathbf{0.035 \text{ mM}}$

2.4.1.1.3. Adenosina + Guanosina

Para la medida por voltametría cíclica de la intensidad de señal, en función de la concentración de Guanosina y Adenosina en medidas conjuntas, se han realizado diferentes experiencias en las que se variaba la concentración de ambas en igual proporción.

En primer lugar, se realizaron medidas para las siguientes concentraciones (en cada uno de los componentes): 0.5, 3, 9, 15 y 21 p.p.m. (correspondientes a las concentraciones molares indicadas en la **Figura 2.17**).

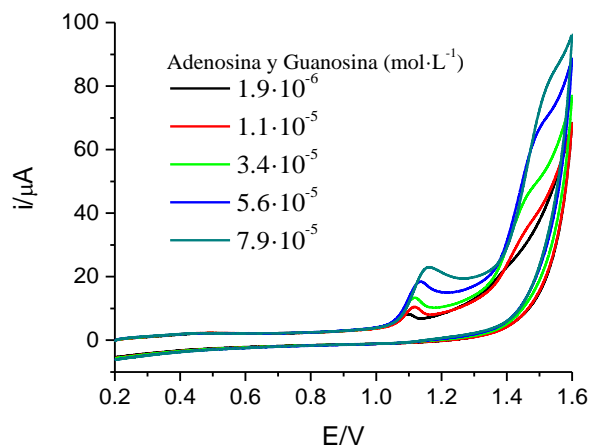


Figura 2.17. Voltagramas cíclicos para mezclas de Adenosina y Guanosina. pH 3.99. Potencial de deposición: 0.4 V. Tiempo de deposición: 240 s. $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

A continuación se realizaron medidas para las siguientes concentraciones (en cada uno de los componentes): 30, 40, 50, 60 y 100 p.p.m. (correspondientes a las concentraciones molares indicadas en la **Figura 2.18**).

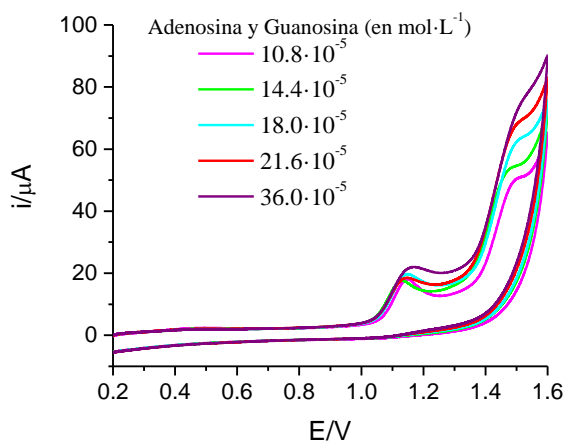


Figura 2.18. Voltagramas cíclicos para mezclas de Adenosina y Guanosina. pH 4.14. Potencial de deposición: 0.4 V. Tiempo de deposición: 240 s. $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

Finalmente, se llevó a cabo un barrido de medida entre las concentraciones mínimas y máximas que se habían realizado en las dos experiencias anteriores, registrando los voltagramas para las siguientes concentraciones (en cada uno de los componentes): 3,

Capítulo 2

12, 21, 42 y 84 p.p.m. (correspondientes a las concentraciones molares indicadas en la **Figura 2.19**).

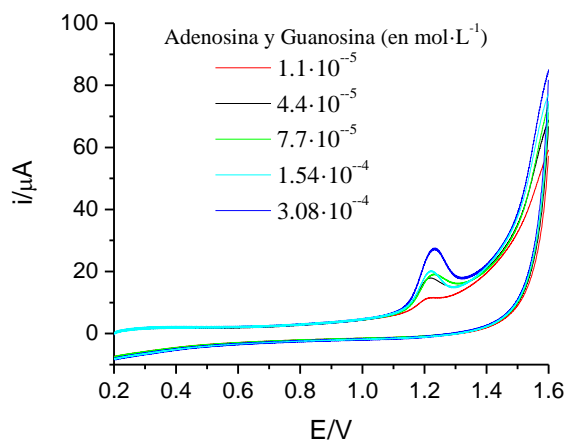


Figura 2.19. Voltagramas cíclicos para mezclas de Adenosina y Guanosina. pH 3.94. Potencial de deposición: 0.4 V. Tiempo de deposición: 240 s. $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

Como principal resultado se encontró que cuando se codepositan adenosina y guanosina conjuntamente, en ambos casos las señales disminuyen alrededor de un 20% con respecto a las obtenidas en las deposiciones de disoluciones monocomponentes. La superficie del electrodo se ocupa por igual por ambos componentes de manera que en la codeposición no se dan efectos sinérgicos ni tampoco inhibición de un nucleósido a otro, más allá del hecho de que el electrodo debe alcanzar antes la saturación y eso origina que la cantidad de material depositado para cada nucleósido sea algo menor que en ausencia del otro adsorbato.

2.4.1.2. Optimización de variables para la inmovilización de los nucleósidos Adenosina y Guanosina sobre CPE

En esta sección solamente se presentan resultados relevantes, específicos para el CPE. Los potenciales de deposición elegidos, tras los estudios experimentales fueron los mismos que para GCE y se analizan aquí solamente los tiempos de deposición y las concentraciones óptimas, los cuales variaron con respecto al GCE.

2.4.1.2.1. Guanosina

Para la *optimización del tiempo de deposición* se han realizado medidas de voltametría cíclica en disoluciones de guanosina a concentración, pH y potencial de deposición constantes.

En la **Figura 2.20** se representan los voltagramas para los diferentes valores de tiempo de deposición, mientras que en la **Figura 2.21** se pueden observar las intensidades de pico máximas obtenidas para cada tiempo de deposición.

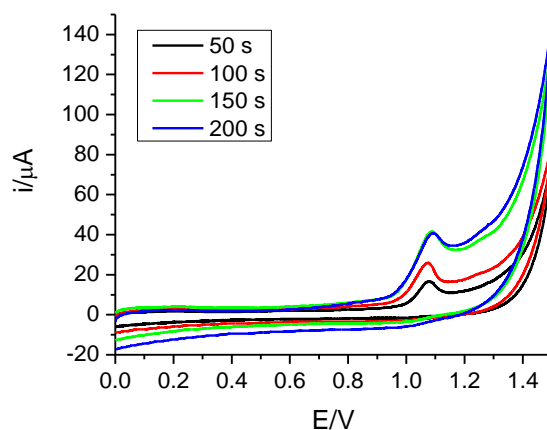


Figura 2.20. Voltagramas cíclicos a distintos tiempos de deposición a pH 5.04. Concentración de guanosina: $3 \cdot 10^{-4}$ M. Potencial de deposición: 0.4 V. $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

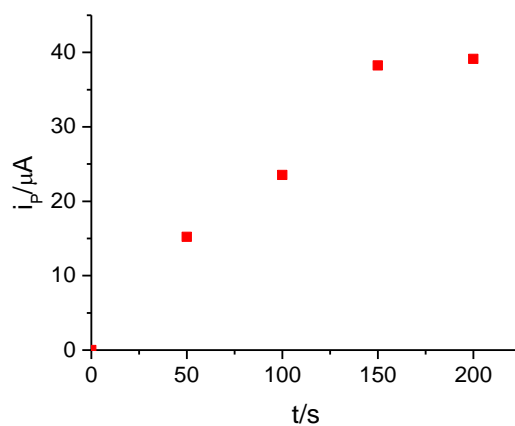


Figura 2.21. Representación de la intensidad de pico en función del tiempo de deposición a pH 5.04. Concentración de guanosina: $3 \cdot 10^{-4}$ M. Potencial de deposición: 0.4 V. $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

Capítulo 2

Como puede apreciarse, la tendencia general de la intensidad máxima de pico es a aumentar conforme aumenta el tiempo de deposición, lo cual es lógico, ya que a mayor tiempo de deposición, mayor cantidad de guanósina se depositará (hasta llegar a saturarse el electrodo), y por eso se obtiene una señal mayor. Los tiempos de deposición a los cuales se obtienen las mayores intensidades son 150 segundos y 200 segundos, fijándose como tiempo de deposición óptimo 150 segundos, ya que la mejora de la señal no compensa la espera. En el caso de la adenosina los resultados fueron similares.

Para la *optimización de la concentración de guanósina* se han realizado medidas de voltametría cíclica en disoluciones a pH, potencial y tiempo de deposición constantes.

En la **Figura 2.22** se representan los voltagramas para los diferentes valores de concentración, mientras que en la **Figura 2.23** se pueden observar las intensidades de pico máximas obtenidas para cada concentración.

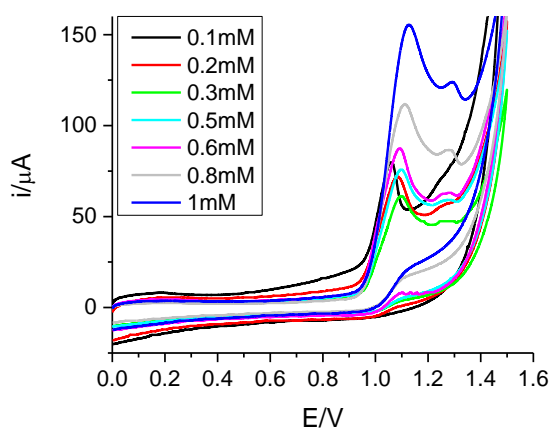


Figura 2.22. Voltagramas cíclicos para distintas concentraciones de Guanósina. pH 5.09. Potencial de deposición: 0.4 V. Tiempo de deposición: 150 s. $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

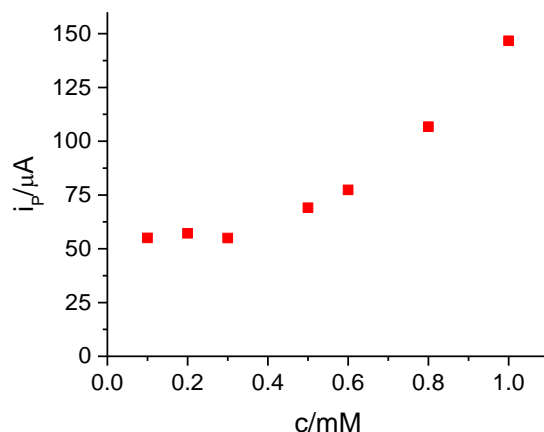


Figura 2.23. Representación de la intensidad de pico vs. concentración de Guanosina. pH 5.09. Potencial de deposición: 0.4 V. Tiempo de deposición: 150 s. $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

Como puede apreciarse, se alcanza una concentración de 1.0 mM sin llegar a saturar el electrodo. Se toma por tanto como concentración óptima 1.0 mM, ya que a mayores concentraciones, se requeriría el uso de mayores concentraciones de antioxidantes, lo que podría generar problemas de solubilidad.

En definitiva, las condiciones óptimas de deposición de la guanosina sobre el CPE son:

- Tiempo Óptimo de Deposición: $E_{\text{óptimo}} = \mathbf{150 \text{ segundos}}$
- Concentración Óptima en la celda B para la Deposición: $[\text{Guanosina}] = \mathbf{1.0 \text{ mM}}$

La variación más importante, en cuanto a la optimización de variables para la inmovilización en CPE frente a la optimización de variables realizada para el GCE, se encuentra en la concentración óptima en la celda B para llevar a cabo la deposición, debido a la diferencia de superficie del electrodo con el GCE. El resto de variables del proceso, serían las mismas a aplicar que con el GCE:

- Potencial Óptimo de Deposición: $E_{\text{óptimo}} = \mathbf{0.4 \text{ V}}$
- pH Óptimo de Deposición: $\text{pH}_{\text{óptimo}} = \mathbf{5.0}$

Capítulo 2

2.4.1.2.1. Adenosina

Para la optimización de la concentración de adenosina se han realizado medidas de voltametría cíclica en disoluciones a pH, potencial y tiempo de deposición constantes.

En la **Figura 2.24** se representan los voltagramas para los diferentes valores de concentración, mientras que en la **Figura 2.25** se pueden observar las intensidades de pico máximas obtenidas para cada concentración.

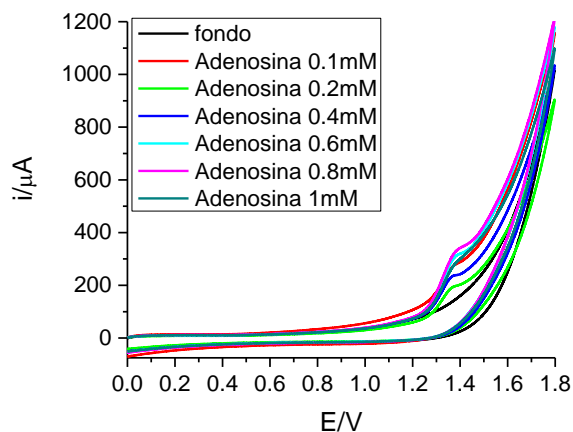


Figura 2.24. Voltagramas cíclicos para distintas concentraciones de Adenosina. pH 4.23.
Potencial de deposición: 0.4 V. Tiempo de deposición: 200 s. $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

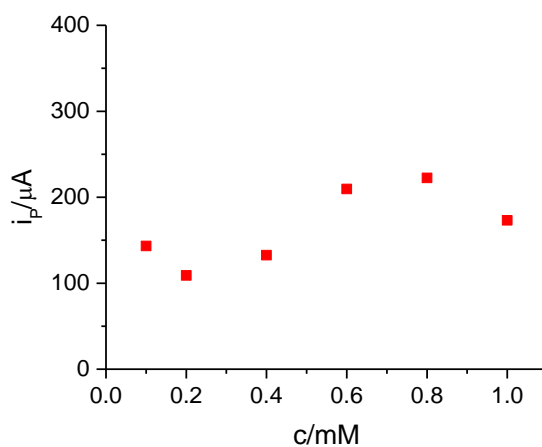


Figura 2.25. Representación de la intensidad de pico vs. concentración de Adenosina. pH 4.23.
Potencial de deposición: 0.4 V. Tiempo de deposición: 200 s. $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

La intensidad de pico aumenta hasta llegar a 0.6-0.8 mM (hay poca variación); luego, la intensidad disminuye. Se toma como valor de concentración óptimo 0.8 mM.

En definitiva, las condiciones óptimas de deposición de la adenosina sobre el CPE son:

- Concentración Óptima en la celda B para la Deposición: [Adenosina] = **0.8 mM**

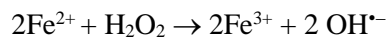
Al igual que ocurrió con la guanosina, para la adenosina la variación más importante en cuanto a la optimización de variables para la inmovilización en CPE frente a la optimización de variables realizada para el GCE, también la encontramos en la concentración óptima en la celda B para llevar a cabo la deposición, debido a la diferencia de superficie del electrodo con el GCE. El resto de variables del proceso, serían las mismas a aplicar que con el GCE:

- Potencial Óptimo de Deposición: $E_{\text{óptimo}} = 1.2 \text{ V}$
- pH Óptimo de Deposición: $\text{pH}_{\text{óptimo}} = 5.0$
- Tiempo Óptimo de Deposición: $E_{\text{óptimo}} = 180 \text{ segundos}$

2.4.1.3. Validación del sensor con GCE:

Todo el proceso descrito anteriormente, en busca de la optimización de las variables, tanto para Adenosina como para Guanosina, tenía como fin fabricar un sensor capaz de medir la capacidad antioxidante tipo daño a ácidos nucleicos. A continuación, se comprobará la acción del reactivo de Fenton (oxidante) sobre los nucleósidos inmovilizados en la superficie del GCE. Posteriormente, para poder medir la capacidad antioxidante de un compuesto, se medirá la pérdida de nucleósido inmovilizado en la superficie del electrodo, en presencia de dicha sustancia antioxidante y un oxidante (como por ejemplo el reactivo de Fenton).

El reactivo de Fenton se forma a partir de un compuesto capaz de suministrar iones Fe^{2+} en disolución, como el Cloruro de hierro (II) FeCl_2 . Al añadir H_2O_2 el Fe^{2+} reacciona con el H_2O_2 , liberando radicales OH^{\bullet} (proporcionalmente a la concentración de iones Fe^{2+}), que son los encargados de reaccionar con el nucleósido inmovilizado. Esto ocurre porque el Fe^{2+} se oxida pasando a Fe^{3+} , y el H_2O_2 se reduce, según la siguiente reacción:



A continuación, los radicales atacan al sustrato (en este caso el nucleósido o la mezcla de nucleósidos) el cual es oxidado por vía radicalica, la cual puede ser muy compleja:

Capítulo 2



Como resultado, hay una disminución de la concentración del/los nucleósido/s que se detecta por la disminución de la señal voltamétrica.

Este ataque a los nucleósidos sobre el electrodo es similar al que se produce cuando los mismos radicales reaccionan con ácidos nucleicos. El problema es que con los ácidos nucleicos hay además una serie de reacciones colaterales originadas sobre todo por cambios conformacionales al modificarse la distribución y naturaleza de las bases en la cadena, que no siempre quedan reflejados en las medidas experimentales. La idea es utilizar los nucleósidos depositados sobre los electrodos como una medida directa de la reacción de los radicales OH^{\bullet} con estas bases.

Para la *validación del sensor con guanosina* se han realizado medidas de voltametría cíclica en disoluciones de concentración de guanosina, pH, concentración H_2O_2 , tiempo de reacción, potencial y tiempo de deposición constantes, donde el factor determinante era la concentración de Fe^{2+} .

Teniendo en cuenta la reacción vista anteriormente, cabe esperar que cuanto mayor sea la concentración de Fe^{2+} añadida (siempre con una concentración de H_2O_2 constante y en exceso), mayor será la pérdida de la señal proporcionada por el nucleósido, ya que se generarán más radicales OH^{\bullet} que atacarán al nucleósido inmovilizado en la superficie del electrodo de trabajo.

La **Figura 2.26** recoge voltagramas para diferentes concentraciones de Fe^{2+} .

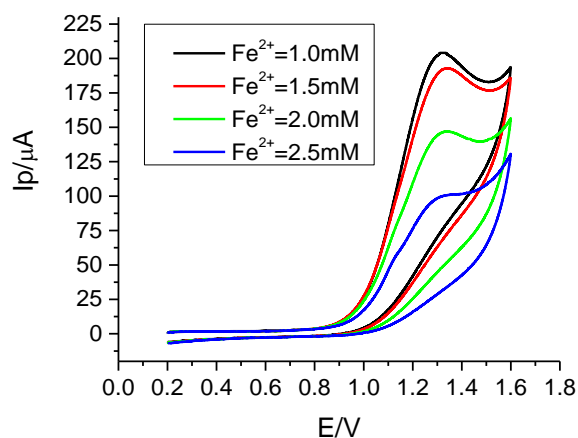


Figura 2.26. Voltagramas cíclicos a $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. para distintos valores de concentración de Fe^{2+} . pH 4.15. [Guanosina]=0.04 mM. [EDTA]=1.0 mM. [H_2O_2]=10 mM. $E_{\text{deposición}}$: 0.4 V. Tiempo de deposición: 180 s. Tiempo de reacción: 3 minutos.

Se puede apreciar que la señal disminuye conforme se añade Fe^{2+} . Si ahora se utiliza un antioxidante, como por ejemplo ácido ascórbico, la señal debería ir aumentando, ya que los radicales OH^{\cdot} reaccionarían antes (velocidad de reacción mayor) con el ácido ascórbico que con el nucleósido (guanosina en este caso). La recuperación de la señal se relaciona con el efecto protector del antioxidante.

Los resultados obtenidos se muestran en las **Figuras 2.27 y 2.28**. Las medidas se realizaron a concentración de guanosina, pH, concentración H_2O_2 , concentración de Fe^{2+} , tiempo de reacción, potencial y tiempo de deposición constantes, donde el factor determinante era la concentración de ácido ascórbico (AA).

As, can be seen, the presence of ascorbic acid protects the adsorbed guanosine from the action of the Fenton reagent, this protection being more effective at higher ascorbic acid concentrations. The problem arising from the evaluation of the antioxidant effect by using this strategy is the evident saturation effect shown in the inset of the figure. So, the maximum recovery is, evidently, 100%, and the linearity of the graph of recovery versus antioxidant dose is observed in a narrow range of concentrations.

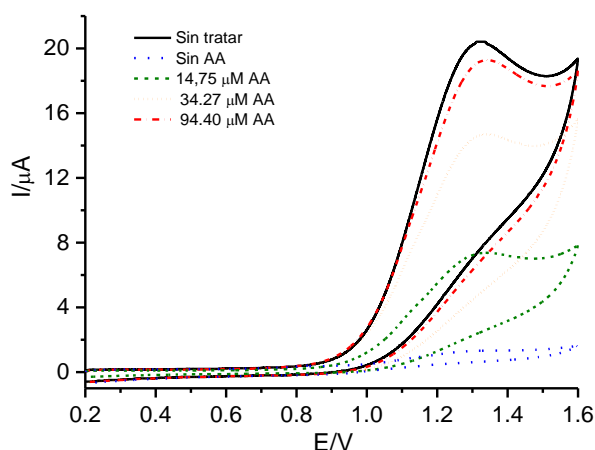


Figura 2.27. Voltagramas cíclicos para distintos valores de concentración de ácido ascórbico. pH 4.15. [Guanosina]=0.04 mM. [EDTA]=1.0 mM. [H_2O_2]=10 mM. $[\text{Fe}^{2+}]$ =0.25 mM. $E_{\text{deposición}}$: 0.4 V. Tiempo de deposición: 180 s. Tiempo de reacción: 3 minutos. $v=0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

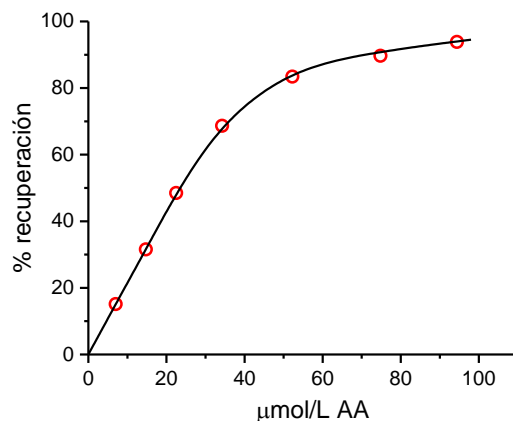


Figura 2.28. Porcentaje de recuperación de la señal en función de la concentración de ácido ascórbico. Mismas condiciones que en la figura 2.27

2.4.1.4. Validación del sensor con CPE:

Para la *validación del sensor con Guanosina* se han realizado medidas de voltametría cíclica en disoluciones de concentración de guanosina, pH, concentración H_2O_2 , tiempo de reacción, potencial y tiempo de deposición constantes, donde el factor determinante era la concentración de Fe^{2+} . Para el CPE, se utilizó la Voltametría de Pulso Diferencial.

En la **Figura 2.29** se representan los voltagramas para diferentes concentraciones de Fe^{2+} .

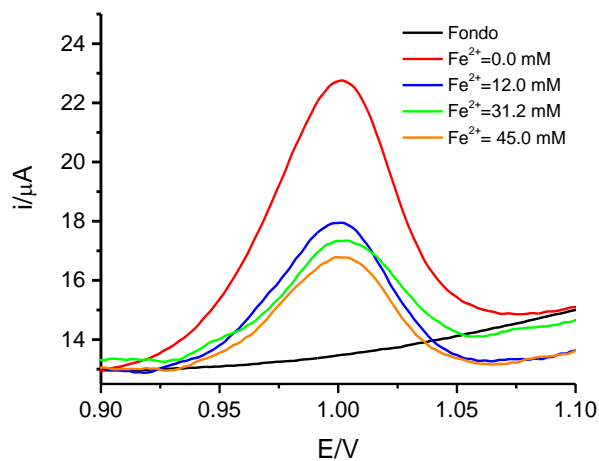


Figura 2.29. Voltagramas de Pulso Diferencial para distintos valores de concentración de Fe^{2+} . pH 4.23. [Guanosina]=0.04 mM. [EDTA]=1.0 mM. $[\text{H}_2\text{O}_2]=10$ mM. $E_{\text{deposición}}: 0.4$ V. Tiempo de deposición: 180 s. Tiempo de reacción: 3 minutos. $v= 0.01 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

En esta gráfica también se puede apreciar cómo disminuye la señal, al ir aumentando la concentración de Fe^{2+} . A continuación, se presenta la **Figura 4.30**, que corresponde a la representación gráfica obtenida cuando se añade un antioxidante, el ácido ascórbico.

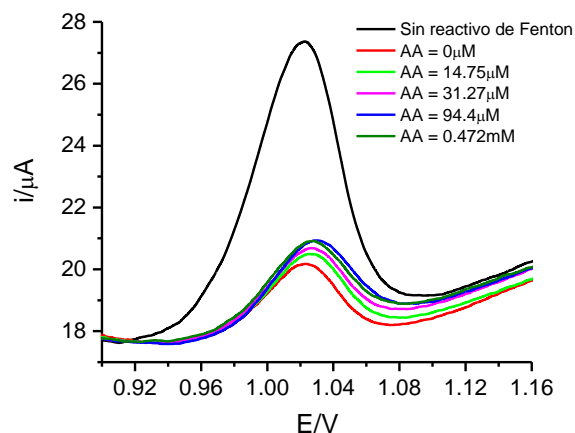


Figura 2.30. Voltagramas de Pulso Diferencial para distintos valores de concentración de Ácido Ascórbico. pH 4.23. [Guanosina]=0.04 mM. [EDTA]=1.0 mM. $[\text{H}_2\text{O}_2]=10$ mM. $[\text{Fe}^{2+}]=12$ mM. $E_{\text{deposición}}: 0.4$ V. Tiempo de deposición: 180 s. Tiempo de reacción: 3 minutos. $v = 0.01 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

Puede observarse, que la señal es mucho más intensa cuando no hay reactivo de Fenton. Dicha señal disminuye drásticamente cuando se hace expone el sensor a la acción del reactivo de Fenton, sin antioxidante en el medio. Por último, se aprecia como aumenta la intensidad de la señal cuando vamos aumentando la concentración de ácido ascórbico, que intercepta los radicales OH^{\bullet} y reacciona con ellos, en lugar del nucleósido inmovilizado en la superficie del CPE.

No obstante, la sensibilidad del CPE a la presencia del antioxidante es mucho menor que la del GCE.

2.4.2. Uso de un hidroperóxido sintético

Para cubrir los objetivos indicados al inicio del capítulo, esto es, utilizar hidroperóxido de cumeno para determinar capacidad antioxidante, es necesario asegurarse de que se producen radicales libres en el proceso electrodoico susceptibles de ataque por parte de los antioxidantes. Pero en la bibliografía no hay referencias acerca del proceso de electrooxidación del HPC, razón por la cual en primer lugar se realiza una caracterización electroquímica de dicho proceso.

Capítulo 2

La voltametría cíclica del HPC sobre electrodo de carbón vitrificado da lugar a un único pico de oxidación como se observa en la **Figura 2.31**.

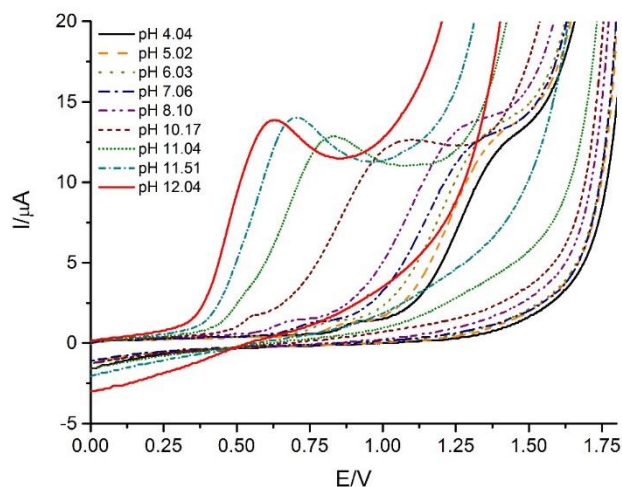


Figura 2.31. Voltagramas cíclicos de HPC $1 \cdot 10^{-3}$ M a diferentes valores de pH. $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

Los voltagramas registrados en medios muy ácidos no se han representado para evitar la confusión provocada por la acumulación de curvas en la figura. La ausencia de picos de reducción a potenciales cercanos a los de los picos de oxidación indica que el proceso total es irreversible.

El potencial de pico del pico de oxidación se desplaza hacia valores más negativos a medida que aumenta el pH, con una pendiente de -125 mV por unidad de pH, como se muestra en la **Figura 2.32**.

El valor de la constante de disociación ácida del HPC es 12.6 [3], lo cual significa que la forma presente en la disolución es el HPC no disociado incluso a valores de pH básicos. Por lo tanto, la dependencia de la señal de oxidación en voltametría con el pH se debe a la existencia de esta disociación ácida previa a la reacción de oxidación.

Además, a pH constante, el potencial de pico es independiente de la concentración de HPC, la intensidad de pico es independiente del pH y es proporcional a la concentración de HPC, a concentraciones por debajo de $2 \cdot 10^{-3}$ M (**Figuras 2.33** y **2.34**).

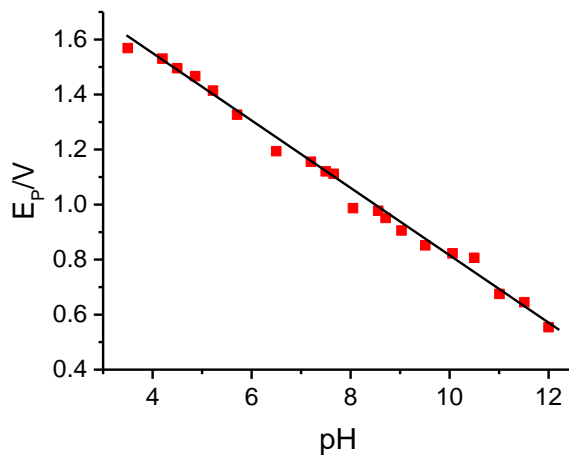


Figura 2.32. Dependencia con el pH del potencial de pico de oxidación del voltograma de CHP $1 \cdot 10^{-3}$ M. $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

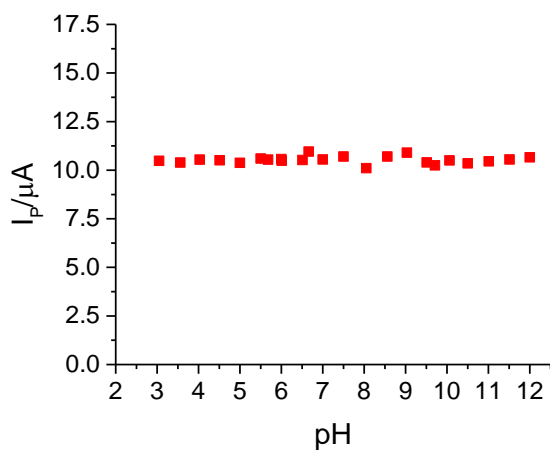


Figura 2.33. Dependencia con el pH de la intensidad de pico de oxidación del voltograma de HPC $1 \cdot 10^{-3}$ M. $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

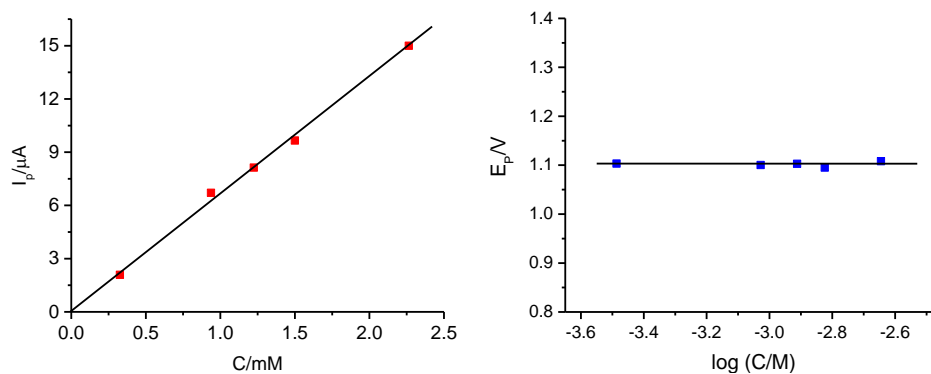


Figura 2.34. Dependencia del voltagrama de oxidación del HPC a pH 4.7. Izquierda: intensidad de pico. Derecha: Potencial de pico. $v=0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

Todos estos datos indican que el proceso electrodoico es de primer orden con respecto a la concentración de HPC, y consistente en una transferencia monoeléctronica irreversible seguida por etapas química y electroquímicas para dar lugar a los productos de oxidación.

Por último, la función de corriente $I_p/v^{1/2}$ es independiente de la velocidad de barrido, v , a bajos valores de v como se muestra en la **Figura 2.35**. Esto quiere decir que los procesos de adsorción, si los hay son débiles.

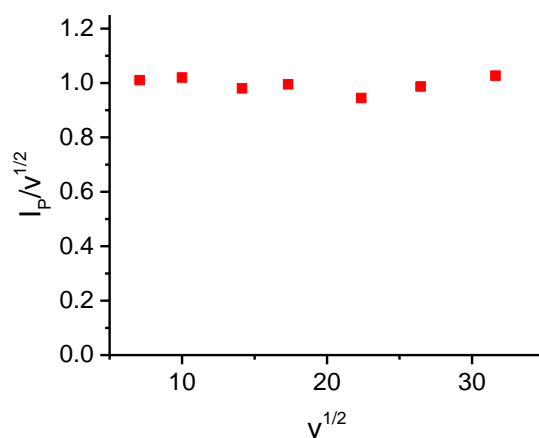


Figura 2.35. Dependencia de la función de corriente del voltagrama de oxidación del HPC con la velocidad de barrido. $C=1\cdot 10^{-3} \text{ M}$ a pH 4.75. (Intensidades en μA , velocidad de barrido en $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$).

Los productos finales de la reacción de descomposición catalizada por ácidos del HPC son fenol y acetona [4-6]. La acetona es inerte electroquímicamente en las condiciones experimentales de este trabajo. De hecho, se utiliza habitualmente como codisolvente para solubilizar especies apolares. Sin embargo, el fenol se oxida sobre electrodos de carbón para formar radicales fenóxido como intermedios y originando finalmente para-benzoquinona [7]. Este compuesto es estable en disolución y presenta en voltametría cíclica un par reversible de picos a potenciales menores que los correspondientes a la oxidación del HPC [8]. Por esa razón se han realizado experimentos en voltametría cíclica con barridos múltiples como se muestra en la **Figura 2.36**.

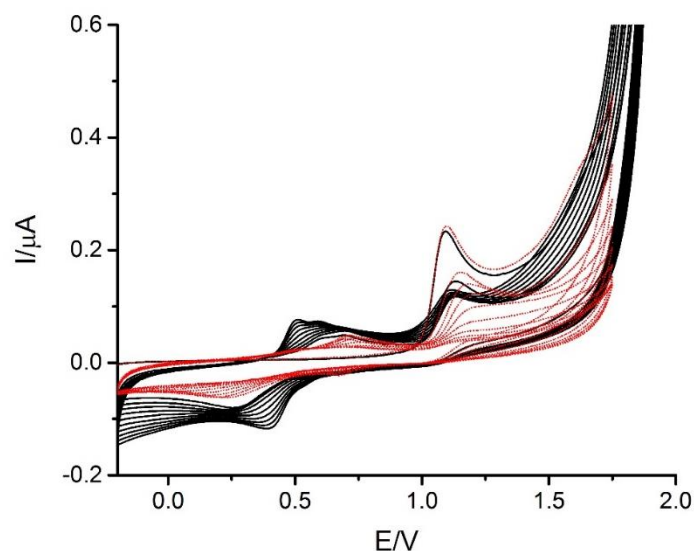


Figura 2.36. Voltagramas cíclicos de HPC $1 \cdot 10^{-3}$ M a pH=2.0, a $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ y potenciales de inversión del barrido 1.75V (línea roja punteada) y 1.90V (línea negra continua).

Cuando el potencial de inversión del barrido es suficientemente alto, aparece un par de picos rédox en la zona de potenciales correspondiente a la oxidación-reducción de la p-benzoquinona [8], como cabe esperar si el fenol, el producto final plausible de la oxidación, se oxida a estos potenciales.

A continuación, se aplicó un potencial constante a un valor mucho más positivo que el potencial de pico de oxidación del HPC, realizando una electrolisis a diferentes tiempos. Para cada uno de estos tiempos, se sacó el electrodo de la disolución de HPC, se introdujo en disolución tampón en ausencia de HPC y se registró el voltagrama cíclico en la zona de potenciales correspondiente a la oxidación-reducción de la p-benzoquinona. Los resultados se muestran en la **Figura 2.37**.

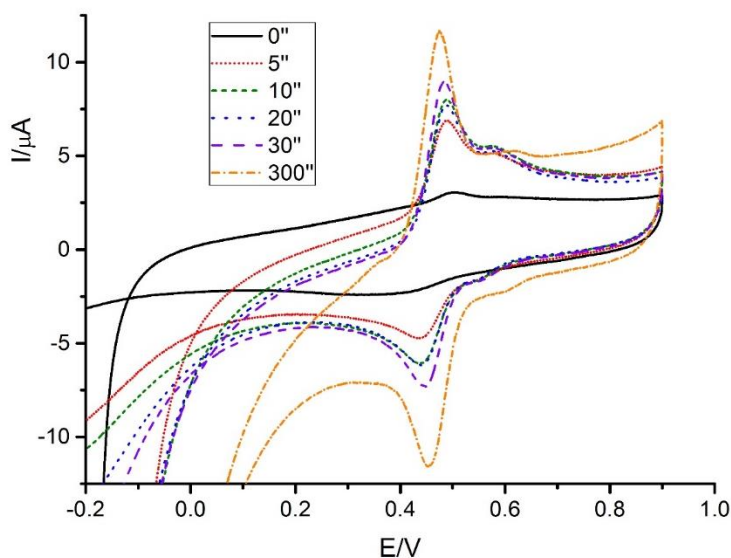
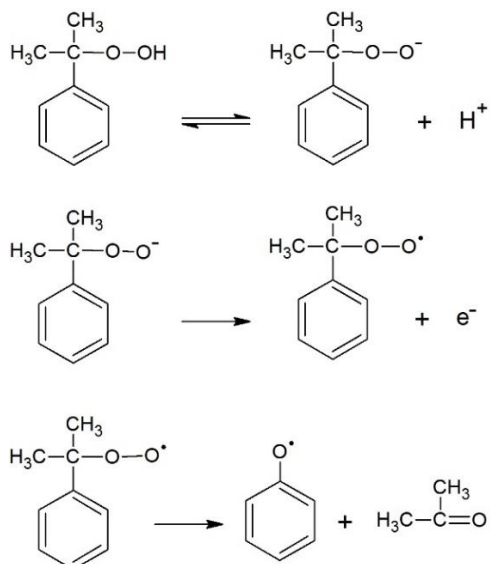


Figura 2.37. Deposición a 1.25V de HPC $1 \cdot 10^{-3}$ M a pH=7.0. Voltagramas cíclicos del electrodo en una disolución en ausencia de HPC en las mismas condiciones. En la figura se indican los tiempos de deposición. $v= 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

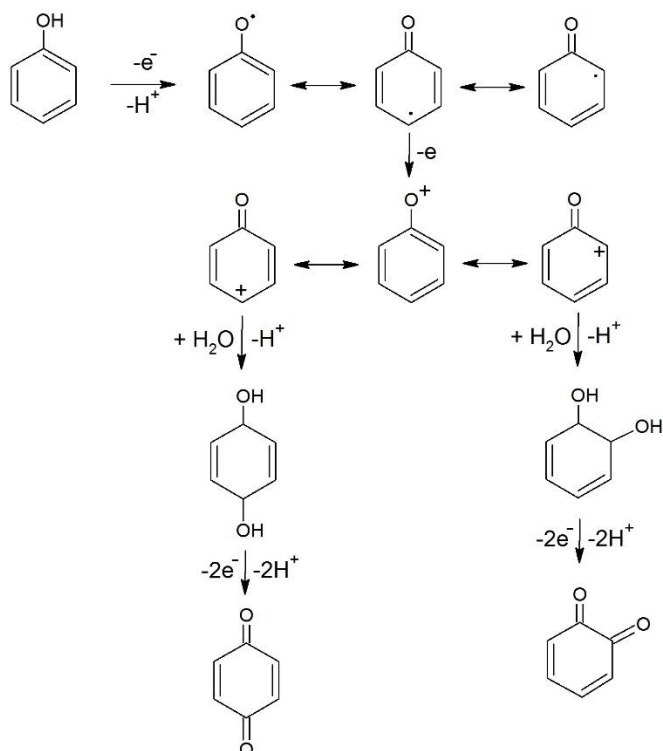
Como puede observarse, se obtiene un sistema de picos correspondiente a un par rédox, prácticamente reversible. Los picos del par aumentan en intensidad a medida que se aumenta el tiempo de electrolisis, alcanzando valores prácticamente constantes a los 150-200 s. Estos picos tienen las características del par rédox correspondiente a la oxidación-reducción de la p-benzoquinona, lo que indica que este es el producto de oxidación a los potenciales empleados en la electrolisis.

Teniendo en cuenta todos estos resultados y conclusiones, las primeras etapas de la oxidación del HPC se pueden representar con el esquema siguiente:



En la oxidación química del HPC se ha propuesto la formación del radical peróxido de cumilo que se muestra en el esquema y que aparece después de la primera transferencia electrónica [9]. Este radical se descompone en acetona (uno de los productos finales de la oxidación) y radical fenoxilo, el cual es precisamente el intermedio de reacción formado en la primera transferencia electrónica en la oxidación del fenol, como se muestra en el esquema siguiente. Este radical fenoxilo posteriormente da lugar a un ion fenoxonio que, tras reaccionar con agua, origina hidroquinona, la cual se oxida finalmente a orto- y para- benzoquinona [7]:

Capítulo 2



En la **Figura 2.37** se aprecia que hay un par rédox de intensidad mucho menor que la del par principal a potenciales unos 0.1V más positivos, lo que apoyaría el hecho de que haya trazas de o-benzoquinona, cuyo potencial formal es ligeramente mayor que el de la p-benzoquinona.

Así pues, se puede afirmar que en la oxidación electroquímica del HPC sobre electrodos de carbón vitrificado se originan radicales libres capaces de interactuar con antioxidantes.

Esta afirmación se ha comprobado realizando experimentos en presencia de un antioxidante como el ácido ascórbico. La **Figura 2.38** muestra voltagramas cíclicos del HPC en presencia de concentraciones crecientes de ácido ascórbico (AA).

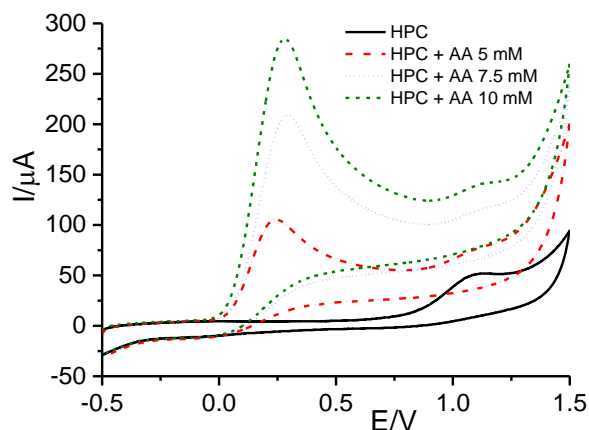


Figura 2.38. Voltagramas cíclicos de HPC $1 \cdot 10^{-3}$ M a pH=7.0 y $v= 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ en presencia de ácido ascórbico (AA) a las concentraciones indicadas en la figura.

Como puede verse, la oxidación del AA ocurre a potenciales más bajos que los del HPC, lo cual significa que el efecto de la presencia del antioxidante sobre el voltagrama del HPC es muy difícil (si no imposible) de cuantificar. Para resolver este problema se ha utilizado la voltametría de pulso diferencial [10] aprovechando que los potenciales de oxidación de AA y HPC están muy alejados (en torno a 0.8 V a pH 7). Esto se muestra en la **Figura 2.39**.

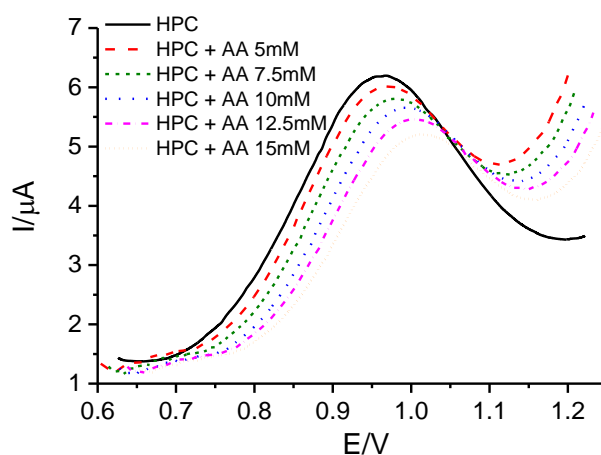


Figura 2.39. Voltagramas de pulso diferencial de HPC $1 \cdot 10^{-3}$ M a pH=7.0 y $v= 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ en presencia de ácido ascórbico (AA) a las concentraciones indicadas en la figura.

Capítulo 2

En este caso, las intensidades de los picos en VPD en presencia de AA ocurre a potenciales más bajos que los del HPC, disminuyen a medida que aumenta la concentración del antioxidante, con respecto al voltograma registrado en ausencia de AA. Esta disminución debe estar directamente relacionada con la actividad antioxidante del ácido ascórbico originada en la reacción de éste con los radicales (peroxilo y/o fenoxilo) que se forman en las primeras etapas de la oxidación electroquímica del HPC, disminuyendo sus concentraciones y, consecuentemente, disminuyendo la intensidad de la señal [11]. Cuanto mayor es la actividad antioxidante, mayor es esta disminución. En el caso de AA, la intensidad de pico del voltograma de pulso diferencial disminuye un 10% cuando la concentración de AA está en torno a $7.9 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Para confirmar estos resultados se ha utilizado otro antioxidante, el ácido gálico, AG. La **Figura 2.40** muestra los resultados obtenidos para la adición de AG a una disolución de HPC.

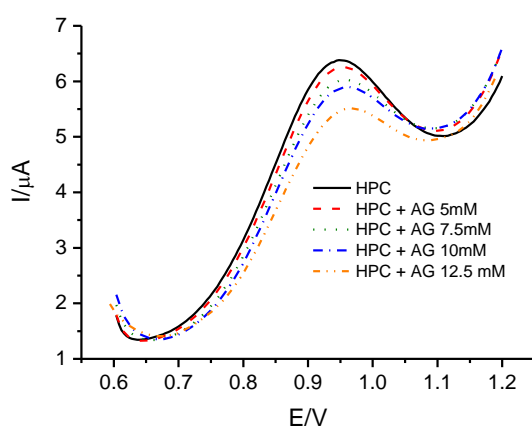


Figura 2.40. Voltogramas de pulso diferencial de HPC $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ a $\text{pH}=7.0$ y $v= 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ en presencia de ácido gálico (AG) a las concentraciones indicadas en la figura.

De nuevo se observa una disminución de la intensidad del pico en VPD, más acusada a mayores concentraciones de AG. En este caso, la disminución del 10% de intensidad se alcanza a una concentración en torno a $10.5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, lo cual indica que la actividad antioxidante del AG es menor que la del AA [10].

2.5. Bibliografía

- [1] J. M. C. Gutteridge, B. Halliwell, Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. 899 (2000) 136-147.
- [2] A. Albert, E.P. Serjeant, The Determination of Ionization Constants, Third Edition, Ed. Chapman and Hall (1984) London.
- [3] John Wiley and Sons, Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry, Ed. Advisory Board (2005) 38.
- [4] J. Vodnár, React. Kinet. Catal. Lett. 10 (3) (1979) 237-241.
- [5] R. J. Lewis, Hawley's Condensed Chemical Dictionary, New York: Van Nostrand Reinhold Co. (1993) 329.
- [6] D. H. R. Barton, N. C. Delanghe, Tetrahedron Lett 38 (1997) 6351-6354.
- [7] M. Gattrell, D.W. Kirk, Can. J. Chem. Eng. 68 (1990) 997-1003.
- [8] R. Estévez Brito, J.M. Rodríguez Mellado, P. Maldonado, M. Ruiz Montoya, A. Palma, E. Morales, J. Electrochem. Soc. 161 (2014) G27-G32.
- [9] S. Fukuzumi, Y. Ono, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 (1977) 622-625.
- [10] A. J. Blasco, A. González Crevillén, M. C. González, A. Escarpa, Electroanalysis 19 (22) (2007) 2275-2286.
- [11] A. Palma, M. Ruiz Montoya, J.F. Arteaga, J.M. Rodríguez Mellado, J. Agric. Food. Chem. 62 (2014) 582-589.

Summary:

The goals intended in this chapter deal with developing electrochemical methods to measure global antioxidant activity.

The first objective of this chapter was to assess the damage caused by ROS on nucleoside molecules, which mimic the genetic structure (DNA), and how an antioxidant can protect the nucleosides from this damage by the interaction with the oxidants. To do this, it was performed the electrochemical immobilization of purines, specifically Adenosine and Guanosine nucleosides, on carbon electrodes for developing bio-recognition layers stable enough for the voltammetric detection of the antioxidant capacity, which was tested with several compounds. The carbon electrodes used were Glassy Carbon Electrode (GCE) and Carbon Paste Electrode (CPE). Special attention to the study of the influence of experimental conditions on the immobilized layer, besides purine electrooxidation is provided. Such variables are: the concentration of the immobilized compound, deposition time, pH and potential applied for deposition of the purine in the carbon electrode. The biggest difference in the optimized variables for both electrodes, is the optimal concentration of nucleoside in the electrochemical cell, which is much higher for CPE than for GCE, due to the difference in active surface between the two electrodes. The GCE has a much smaller surface than the CPE.

To validate the sensor, consisting in an Adenosine or Guanosine layer covering the corresponding carbon electrode, it was used one source of OH[•] radicals (one of the most ROS common in the nature) to oxidize nucleosides, namely a Fenton-type reaction.

As a second objective, after verifying the effectiveness of the sensor, it was used Cumene Hydroperoxide (a synthetic hydroperoxide) to generate electrochemically aromatic radicals, instead of OH[•] radicals, in order to develop an electrochemical method for the measurement of antioxidant activity, different to those proposed in the literature. There is no information in the literature about the HPC electrooxidation process, and thus in this work it has been done an electrochemical characterization of such process. The experimental results show that the process is irreversible, the voltammogram consisting of a single oxidation peak, which shifts to more negative potentials as the pH increases. Taking into account that the acidic HPC dissociation constant is 12.6, it can be concluded that the HPC remains undissociated until fairly basic pH values. This means that the reaction responsible for the pH dependence of the oxidation potential must be the loss of an H⁺ ion. The peak potential is independent of the concentration of HPC at constant pH, the peak intensity being independent of pH and proportional to the concentration of HPC at concentrations below 2·10⁻³ M. All these results indicate that the process is first order with respect to the concentration of HPC, and that the one-electron transfer would be irreversible. The end products of the acid catalyzed decomposition of HPC are Phenol and Acetone. Acetone is inert electrochemically under the experimental conditions of this work, and Phenol is

oxidized on carbon electrodes to form p-benzoquinone (mainly) and o-benzoquinone, which can interact with molecules of antioxidants. This has been tested with Ascorbic Acid and Gallic Acid by differential pulse voltammetry (VPD), observing that the HPC peak decreased when the antioxidant concentration was increased. It was also confirmed that the decreasing of the HPC voltammetric peak is more pronounced when Ascorbic Acid is used instead of Gallic Acid, which indicates that the first has a higher antioxidant capacity than the second.

CAPÍTULO III

MECANISMOS DE OXIDACIÓN ELECTROQUÍMICA DE ANTIOXIDANTES

3.1. Introducción

Uno de los sistemas más estudiados para la investigación de los procesos de transferencia electrón-electrón, es el sistema quinona-hidroquinona, ya que se corresponde con una estructura muy común para muchos antioxidantes empleados actualmente [1]. El potencial redox de las quinonas depende de los sustituyentes que presenten, sus constantes de disociación, la concentración de protones y los efectos que pueden ejercer los disolventes. De esta forma a pH 7, las semiquinonas que tienen constantes de disociación entre 4 y 5, están en su forma aniónica y por tanto, participan en las reacciones de transferencia electrónica dando estabilidad a la hidroquinona. Sin embargo, el hecho de que estén protonadas a ese pH hace que se ralentice el proceso de transferencia de electrones [1, 2].

La capacidad antioxidante de un compuesto – especialmente los fenoles [3] –, puede deberse a la captura de los radicales libres y de las ROS, producidos normalmente por el metabolismo celular o como respuesta a factores externos que se inactivan [4], evitando o previniendo enfermedades degenerativas en el ser humano causadas por la oxidación de los ácidos nucleicos, proteínas o lípidos [5, 6].

Actualmente, los métodos utilizados para la evaluación de la capacidad antioxidante siguen el principio básico de que un antioxidante inhibe la oxidación de un sustrato, manteniendo las características principales de ese sustrato y haciendo una medida apropiada del punto final. Entre los diferentes ensayos que se emplean para medir la capacidad antioxidante de un compuesto, se encuentran, entre otros, el ensayo de estabilidad acelerado [7, 8], el uso de especies radicales como ABTS [2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] [9] y DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo) [9], espectrometría de resonancia del spin electrónico (ESR), o la medida del consumo de oxígeno en una emulsión agua/lípido con oxidación lipídica iniciada por la metamioglobina [10]. El sustrato se oxida en condiciones estándar, pudiendo medirse el grado de oxidación (punto final) a un tiempo fijo o sobre la base de una característica generada por los radicales libres, mediante medidas ópticas [11]. Algunos ejemplos de esta metodología son: FRAP (poder antioxidante para reducir el ión férrico), TEAC (capacidad antioxidante equivalente al Trolox), ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno), CUPRAC (CUPric Reducing Antioxidant Capacity) y TRAP (parámetro de captura total de radicales antioxidantes). Cada método tiene sus propias características, y existen diferencias en los sistemas de generación de radicales libres, diana molecular, punto final, tiempo de espera en el medio de reacción, etc. [12]. La interpretación y la comparación de sus resultados, es por lo tanto compleja. A todo esto, hay que añadir que estos métodos presentan una serie de inconvenientes,

Capítulo 3

como el empleo de reactivos específicos y difíciles de sintetizar, una larga y tediosa preparación de la muestra y/o análisis lentos.

La Electroquímica es una rama de la Química, que nos permite, entre otras muchas aplicaciones, estudiar la capacidad antioxidante [13] que presentan determinadas sustancias. Los potenciales de oxidación medidos por voltametría cíclica, se han empleado para comparar la fuerza antioxidante de compuestos como ácidos fenólicos, flavonoides, ácidos cinámicos, etc... [13-17], siendo el electrodo de carbón vítreo (Glassy-Carbon Electrode, GCE) el más empleado. Los bajos potenciales de oxidación están relacionados con una mayor facilidad para la donación de electrones y por tanto para que un compuesto sea antioxidante (se oxida fácilmente este compuesto, y reduce a los otros, impidiendo que estos últimos se oxiden).

3.2. Objetivos del capítulo

Los objetivos de este capítulo son:

- Establecer los mecanismos de oxidación de los antioxidantes sesamol y 2,5-dihidroxibenzaldehído para contribuir a una mejor comprensión de la actividad antioxidante de estas moléculas, sobre todo en lo que se refiere a su capacidad de atrapamiento de radicales (radical scavenging). Para ello se utilizarán técnicas electroquímicas relacionadas con la cinética electródica así como la identificación, directa o indirecta, de los productos de oxidación.
- Mostrar que el estado de disociación de los grupos hidroxilo de 2,4- y 2,5-dihidroxibenzaldehídos y el ácido gálico es un factor relevante a tener en cuenta en la interpretación de las actividades antioxidantes. Además, a partir de los espectros moleculares UV-Vis, obtenidos en un amplio rango de pH, se determinarán las constantes de disociación de ambos aldehídos. Se determinan las actividades antioxidantes a diferentes valores de pH y se comparan a la luz de los valores de las constantes de disociación.

3.3. Experimental

3.3.1. Instrumental

Para las pesadas de los reactivos y otras sustancias empleadas se utilizó una balanza Sartorius, que proporciona una precisión de ± 0.00001 g y una balanza analítica de precisión Mettler Toledo AB104, con una sensibilidad de 0.1 mg.

Para los registros espectrofotométricos de las experiencias en UV se ha empleado un espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo Lambda 750S, con cubetas de cuarzo Hellma de 1 cm de paso óptico.

Las medidas de pH se realizaron con un pH metro Crison GLP 21, con una precisión de ± 0.01 unidades de pH, calibrado previamente con disoluciones tampón.

Los registros electroquímicos, tanto en voltametría cíclica, voltametría de pulso diferencial como en cronoamperometría se llevaron a cabo con un sistema Autolab PGSTAT302N con NOVA 1.6 como software del mismo.

Los registros electroquímicos en voltametría de pulso diferencial para la determinación de actividad antioxidante se llevaron a cabo con un sistema IJ Cambria, CH Instruments, CHI650A Electrochemical Workstation conectado a un PC con el software adecuado proporcionado por la casa. Dicho sistema se acopló a un electrodo de mercurio de tamaño de gota controlado EF-1400 de la casa BAS en modo HDME. El área de la gota de mercurio fue $6.70 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$. El electrodo de referencia fue un electrodo de plata-cloruro de plata BAS MF-2052 y el contraelectrodo fue de platino BAS MW-1034. Los parámetros de la voltametría de pulso diferencial fueron amplitud de pulso 0.050V, anchura de pulso 0.05 s y duración del pulso 0.2 s.

Para los análisis de los productos de electrolisis se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2010 con una columna capilar de 30 m de longitud y 0.25 mm de diámetro HP-5MS (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) acoplado con un espectrómetro de masas de la misma casa operando en modo IE a 70 eV.

El cromatógrafo de gases estaba equipado con un sistema de inyección split/splitless y se trabajó en modo Splitless.

3.3.2. Células y electrodos

Todas las medidas se llevaron a cabo en células de 25 ml de capacidad provistas de camisas termostáticas. Las células poseen entrada para los electrodos, el termómetro y el nitrógeno.

- Electrodos de trabajo:
 - Electrodo de carbón vitrificado de CH Instruments Inc modelo CHI104.
 - Electrodo de pasta de carbón (de síntesis en el laboratorio) de la casa Metrohm.
- Electrodo de referencia: Ag/AgCl/3M KCl de Metrohm modelo 6.0733.100

Capítulo 3

- Electrodo auxiliar: Pt de Metrohm modelo 6.0301.100
- Para los experimentos de electrolisis a potencial constante, el electrodo de trabajo fue una barra de grafito de alta densidad de Aldrich (CAS: 7782-42-5 C) protegido con un tubo de silicona, lo que permitió el uso de un área de 75.4 mm². El contraelectrodo fue un cilindro de acero inoxidable.

3.3.3. *Reactivos y disoluciones*

Los reactivos empleados fueron: 3,4-metilendioxfenol (sesamol), de Aldrich; ácido acético (HAc), ácido fosfórico (H₃PO₄), bicarbonato sódico (NaHCO₃), hidróxido sódico (NaOH) y cloruro de sodio (NaCl), de Merk; 4-piridincarboxinamida (isonicotinamida), de Sigma. Ácido Gálico (AG), 2,4-Dihidroxibenzaldehído y 2,5-Dihidroxibenzaldehído, de calidad analítica de Sigma-Aldrich.

En el intervalo comprendido entre pH = 1.5 y pH = 8 se utilizó una disolución reguladora de HAc y H₃PO₄ 0.1 M en ambos componentes mientras que para pH > 8 se empleó una disolución reguladora de H₃PO₄ y NaHCO₃ en ambos componentes de 0.05 M. A continuación, se le ajustó con NaCl la fuerza iónica, a 0.2 M para el tampón ácido y 0.3 M para el tampón básico.

Para la determinación de la actividad antioxidante, se empleó Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) y Etanol (EtOH) con calidad analítica, de Merck.

3.3.4. *Condiciones de trabajo*

La temperatura de trabajo se mantuvo constante a 25 ± 0.1°C.

Para la limpieza del electrodo de carbón vitrificado, se realizaron etapas sucesivas de pulido mecánico; en primer lugar con pasta de diamante (Lam Plan 0.25 micras) en un paño suave, en segundo lugar, empleando un paño más grueso al anterior (Microcloth de Buehler en ambos casos) con una suspensión de alúmina de 0.3 μm (alúmina A) y, por último, una tercera etapa empleando el mismo tipo de paño que la etapa anterior pero usando una alúmina de 0.05 μm (alúmina B). A continuación, se colocó en un baño de ultrasonidos durante diez minutos, eliminando así los posibles residuos que pudieran persistir de la etapa anterior. Finalmente, se procedió a una limpieza electroquímica, mediante voltametría cíclica de barrido lineal con una disolución saturada de NaCl (-0.4 hasta 1.4 V, 100 mV/s, 5 ciclos).

Para los experimentos de electrolisis a potencial controlado se utilizaron como electrodos de trabajo barras de grafito de 6 mm de diámetro y de 99.995% de pureza de Sigma-Aldrich.

La concentración de trabajo para las medidas en el espectrofotómetro fue de 10^{-4} M y para el estudio electroquímico de 10^{-3} M a excepción de aquellos casos en que se estudió la influencia de esta variable sobre el proceso electródico. Debido a que el sesamol es muy insoluble en agua, se partió de una disolución madre a 0.1 M de sesamol en etanol puro.

Las disoluciones de los reactivos se realizaron con agua ultrapura, empleando un sistema Millipore MILLI Q, y se almacenaron a temperatura ambiente. Se comprobó que las disoluciones no se alteraban con el tiempo al menos durante todo el tiempo que fueron utilizadas, siendo reproducibles los experimentos realizados a lo largo de varios días.

La velocidad de barrido que se empleó fue de 100 mV/s a excepción de los casos en lo que se estudiaba la influencia de esta variable. Para la voltametría de pulso diferencial la velocidad fue de 10 mV/s.

Las medidas se llevaron a cabo después de eliminar la interferencia del oxígeno, para lo cual se pasó una corriente de nitrógeno durante 10 minutos.

Las medidas se realizaron en estado no estacionario en todo el proceso a excepción de la cronoamperometría que se llevó a cabo con agitación (estado estacionario).

Para la medida de la capacidad antioxidante por el método VPD sobre electrodo de mercurio, la concentración de peróxido de hidrógeno en célula fue de $5 \cdot 10^{-4}$ M y el porcentaje final de etanol en célula, un 30%. Debido a que el cambio del contenido de etanol modifica el área del pico VPD [18], las disoluciones se prepararon con una cantidad fija de electrolito soporte, 6.9 mL, 100 μ L de H_2O_2 0.05 M, volúmenes variables de disolución madre de antioxidante en etanol, V_{AO} , y completando el volumen total con $(3 - V_{AO})$ mL de etanol puro. De esta forma, se hizo necesario preparar una disolución diferente para cada concentración de antioxidante. Los 100 μ L de H_2O_2 se añadieron después del resto de los componentes de la disolución y tras haberla purgado con nitrógeno de alta pureza.

En los experimentos de electrolisis a potencial controlado, el electrodo de grafito se pulió con papel de sílice y a continuación con alúmina de 0.3 μ m. El residuo del pulido se eliminó por sonicación en agua ultrapura durante 20 min en un baño de ultrasonidos. Las electrolisis se realizaron con muestras de 5 mL de reactivo 1.2 a 1.5 mM, y registrando la carga que pasa a lo largo del experimento. Para seguir el curso de la

Capítulo 3

electrolisis se tomaron muestras de 200 μL tras el paso de diferentes carga, se añadieron a 1.5 mL de agua ultrapura y se registraron los espectros UV-Vis.

Las disoluciones electrolizadas se analizaron usando el método de microextracción en fase sólida mediante fibras recubiertas por un espesor de 65 μm de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (Supelco) que se insertaron en viales con 3 mL de la disolución electrolizada durante 30 min. Las fibras con los productos adsorbidos se insertaron en el cromatógrafo de gases a 230 $^{\circ}\text{C}$, dejándolas 3 min antes de la inyección para la desorción de los compuestos adsorbidos. La línea de transferencia entre el cromatógrafo de gases y el espectrómetro de masas se mantuvo a 280 $^{\circ}\text{C}$. El programa de temperaturas fue: temperatura inicial 35 $^{\circ}\text{C}$ (5 min), aumento hasta 220 $^{\circ}\text{C}$ a 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y posterior aumento hasta 270 $^{\circ}\text{C}$ a 50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, temperatura que se mantuvo durante 2 min. El espectrómetro de masas se operó en el rango de masas $m/z = 33\text{-}350$. La identificación de los productos se realizó utilizando la librería NIST 08. Cuando fue necesario se derivatizó con anhídrido trifluoroacético [19].

3.4. Resultados y Discusión

3.4.1. Oxidación electroquímica del sesamol

3.4.1.1. Determinación de la constante de disociación

Las reacciones de protonación/disociación ácido-base son especialmente importantes en la electroquímica orgánica. Por ello, es esencial conocer las constantes de disociación de las sustancias a estudiar, así como su estado de protonación en los diferentes medios. En la bibliografía no se encontró información sobre el sesamol, aunque en Scifinder Scholar se puede encontrar el valor de pK_a de 10.08 ± 0.20 calculado mediante un software científico [20]. En este trabajo se ha procedido a la determinación experimental de dicha constante. En la **Figura 3.1** se presentan los espectros de absorción UV-Vis en función del pH del medio. Se aprecia que en las curvas se presentan dos bandas en todo el intervalo de pH, con máximos de intensidades y posiciones variables alrededor de 241 y 311 nm.

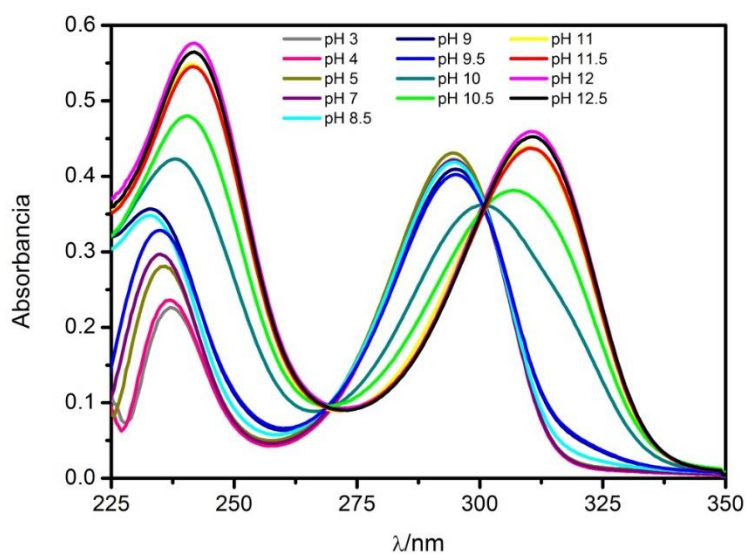
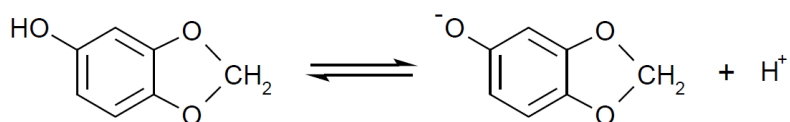


Figura 3.1. Espectros de absorción UV-Vis a distintos valores de pH. $C_{\text{sesamol}}: 10^{-4}$ mol/L. Blanco: tampón a pH dado en cada caso.

El hecho de que los espectros UV-Vis se modifiquen con el pH indica que dependen de la acidez del medio y, por tanto, la aparición de puntos isobésticos significa que hay especies químicas que están involucradas en reacciones ácido-base. El átomo de oxígeno del anillo bencénico se desprotona en medios básicos tal y como se presenta en el **Esquema 3.1**:



Esquema 3.1. Disociación del sesamol.

Los valores de pK de disociación pueden obtenerse a partir de la dependencia con el pH de las absorbancias máximas de las bandas, a 241 y 311 nm en este caso. Esta dependencia se muestra en la **Figura 3.2**:

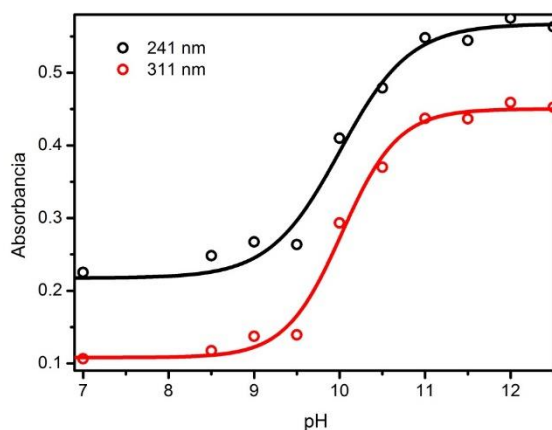


Figura 3.2. Variación de las absorbancias de las bandas espectrales con el pH.

En general, la variación de la absorbancia con el pH responde a la siguiente ecuación:

$$\log \frac{A - A_{\text{mín}}}{A_{\text{máx}} - A} = \text{pH} - \text{pK}_a \quad (3.1)$$

donde A , $A_{\text{máx}}$ y $A_{\text{mín}}$ son los valores de absorbancia independiente del pH que aparecen cuando $\text{pH} \ll \text{pK}_a$ y $\text{pH} \gg \text{pK}_a$ respectivamente. A partir de esta ecuación puede observarse que cuando la función del logaritmo sea cero nos encontraremos a un valor de pH que será el pK_a . Si representamos esta ecuación obtenemos una gráfica lineal, como se muestra en la **figura 3.3**.

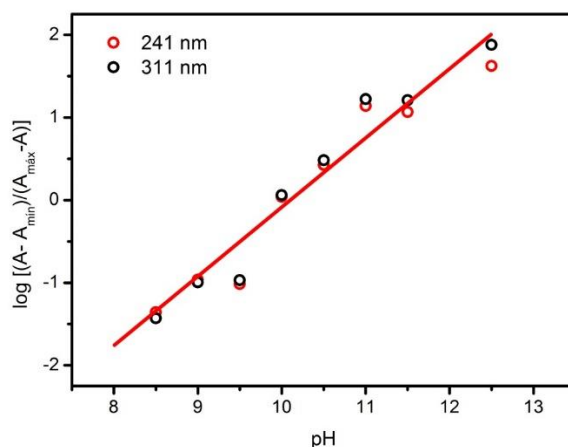
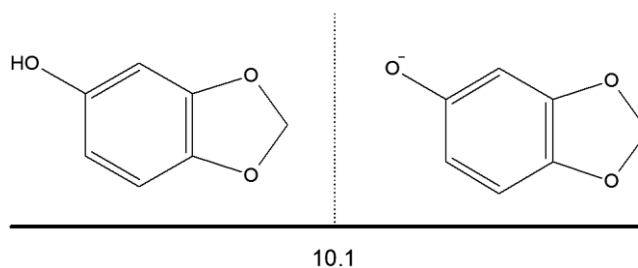


Figura 3.3. Representación de $\log [(A - A_{\min}) / (A_{\max} - A)]$ frente al pH para λ de 241 y 311 nm.

Como la pendiente de la recta que aparece en la figura es muy próxima a la unidad, se puede concluir que sólo existe un pK_a cuyo valor corresponde a 10.1 ± 0.1 , lo que confirma la validez del pK_a calculado [20]. Las especies en disolución serán las siguientes:



Esquema 3.2. Distribución de especies del sesamol en función del pH.

3.4.1.2. Mecanismo de oxidación sobre electrodo de carbón vitrificado

En voltametría cíclica de barrido lineal de potencial sobre GCE, el sesamol presenta hasta tres picos de oxidación y uno de reducción dependiendo del número de ciclos registrado como se muestra en la **figura 3.4**.

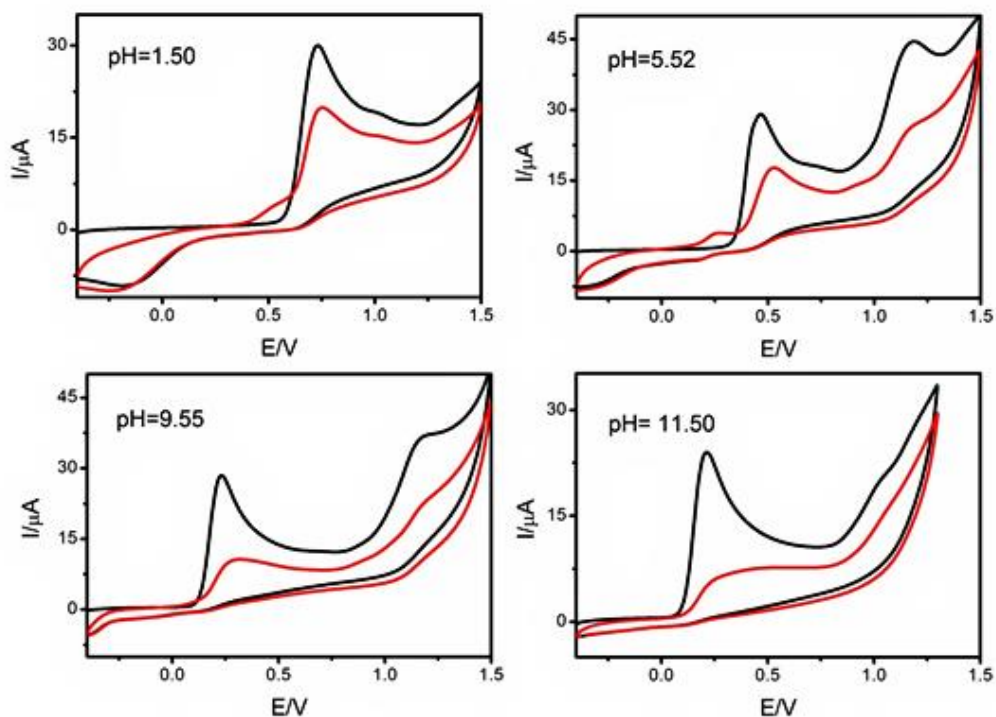


Figura 3.4. Voltagramas cíclicos de los primeros dos ciclos a distintos valores de pH. Sesamol $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L, v : 0.1 V/s. Negro: primer ciclo. Rojo: segundo ciclo

Como puede apreciarse en la **figura 3.5**, resumen de las anteriores, el primer ciclo del voltagrama muestra dos picos de oxidación, *Pico 1* y *Pico 2*, el segundo a potenciales más positivos que el primero, y un pico de reducción, *Pico 3'*, a potenciales menos positivos que el pico 1. En el segundo ciclo aparece un pico adicional de oxidación, *Pico 3*, a potenciales algo más positivos que el pico 3'.

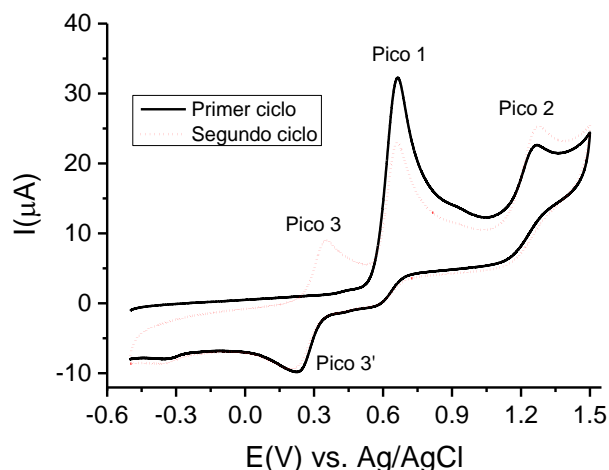


Figura 3.5. Voltagramas cíclicos de los primeros dos ciclos a de sesamol $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L, pH = 1.74, $v = 0.1$ V/s.

Los picos 1 y 2 aparecen en todo el rango de pH estudiado, mientras que los picos 3 y 3' no se observan en medios muy básicos a $\text{pH} > 10$.

Se registraron dos barridos en voltametría cíclica, en la secuencia oxidación-reducción, invirtiendo el barrido a un potencial localizado después del pico 1 y antes del comienzo del pico 2. En estas condiciones, el voltagrama correspondiente al sistema 3-3' en el segundo barrido es idéntico al obtenido cuando el barrido se invierte a un potencial posterior al pico 2, como en las **figuras 3.4 y 3.5**. Esto quiere decir que el sistema redox formado por los picos 3 y 3' está relacionado con el proceso que ocurre a los potenciales del pico 1 y no con los procesos que tienen lugar a los potenciales en que aparece el pico 2.

La especie que se oxida al potencial del pico 3, esto es, el producto de la reducción en el barrido de vuelta a los potenciales del pico 3', debe ser diferente al sesamol, puesto que aparece a un potencial más bajo que éste. Si fuese sesamol, no aparecería un nuevo pico. Para comprobar esta suposición se ha aplicado un potencial constante a un valor posterior al pico 1, durante tiempos de deposición t_d . A continuación, se han registrado voltagramas en la ventana de potenciales correspondientes al sistema 3-3', en el sentido reducción-oxidación. En la **figura 3.6**, se muestran resultados a diferentes tiempos de deposición.

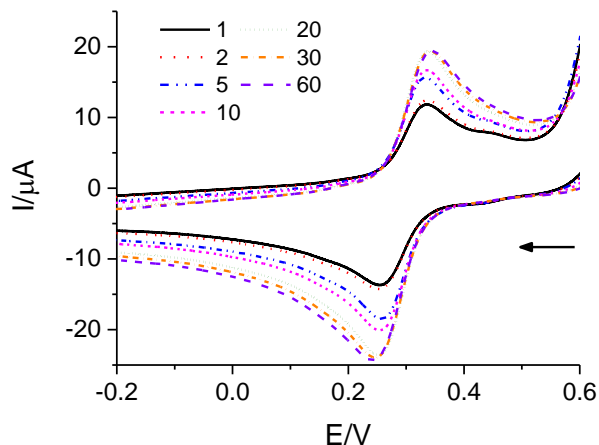


Figura 3.6. Voltagramas cíclicos del sistema 3-3' de sesamol $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L tras la deposición a 0.900 V y tiempos de deposición (en segundos) dados en la figura. Potencial de inicio del barrido 0.600 V. La flecha indica el sentido inicial del barrido. pH = 1.80, $v = 0.1$ V/s.

En otro conjunto de experimentos se obtuvieron voltagramas en las mismas condiciones, pero en la secuencia oxidación-reducción. En la **figura 3.7**, se muestran algunos resultados en función del tiempo de deposición.

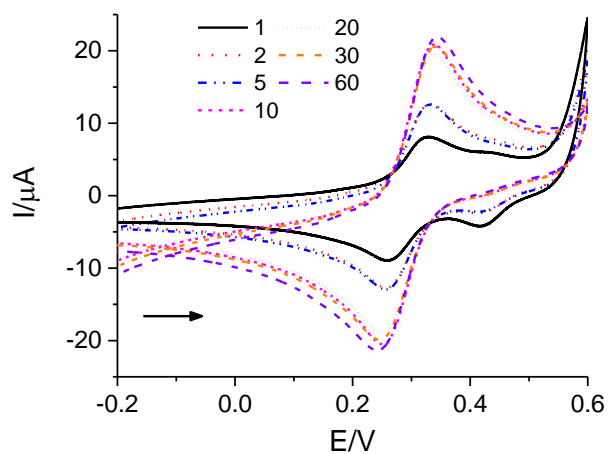
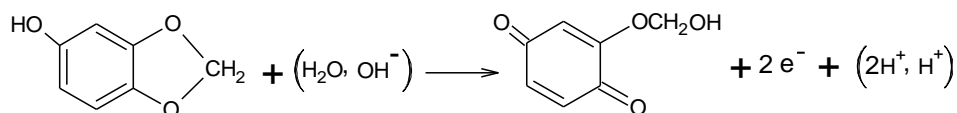


Figura 3.7. Voltagramas cíclicos del sistema 3-3' de sesamol $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L tras la deposición a 0.900 V y tiempos de deposición (en segundos) dados en la figura. Potencial de inicio del barrido -0.200 V. La flecha indica el sentido inicial del barrido. pH = 1.80, $v = 0.1$ V/s.

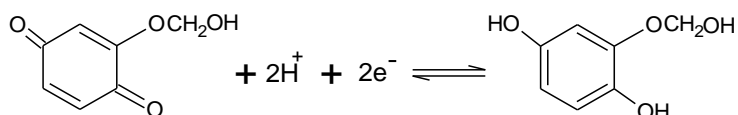
Los dos conjuntos de experimentos mostraron resultados muy similares: las intensidades de los picos permanecen constantes a $t_d \geq 20$ s, con la diferencia de que el cociente de intensidades de pico entre los picos 3 y 3' está próximo a la unidad en la secuencia de barrido reducción-oxidación, y es algo menor en la secuencia inversa.

Considérese ahora la estructura del sesamol. La reacción de oxidación más plausible que tiene lugar a los potenciales del pico 1 debe implicar la ruptura del anillo de cinco miembros para dar, o bien 1,3-benzoquinona, o bien 1,4-benzoquinona. Pero la 1,3-benzoquinona no existe, debido a que su estructura no sería plana y estaría altamente impedida estéricamente, por lo que la reacción global para el pico uno propuesta es:



Esquema 3.3. Reacción global en el pico 1

La 1,4-benzoquinona sustituida formada permanece en las proximidades del electrodo y puede reducirse en el barrido inverso a los potenciales correspondientes al pico 3', y la 1,4-dihidroquinona resultante se oxida en el ciclo siguiente a los potenciales del pico 3, menos positivos que el potencial de oxidación del sesamol:



Esquema 3.4. Reacción global en los picos 3'-3

Hay otras evidencias que apoyan los esquemas anteriores. En primer lugar, la dependencia de los potenciales de pico con el pH correspondiente al sistema 3-3' es compatible con el proceso rédox mostrado en el **esquema 3.4**. Se registraron voltagramas correspondientes al sistema 3-3' a diferentes valores de pH con $t_d=20$ s. Como puede verse en la **Figura 3.8**, los potenciales de pico de los picos de oxidación y de reducción se desplazaron en torno a -0.059 V por unidad de pH, valor que se corresponde con la intervención de dos iones H^+ para un proceso bielectrónico reversible, o cuasi-reversible, como es el caso de la 1,4-benzoquinona [21].

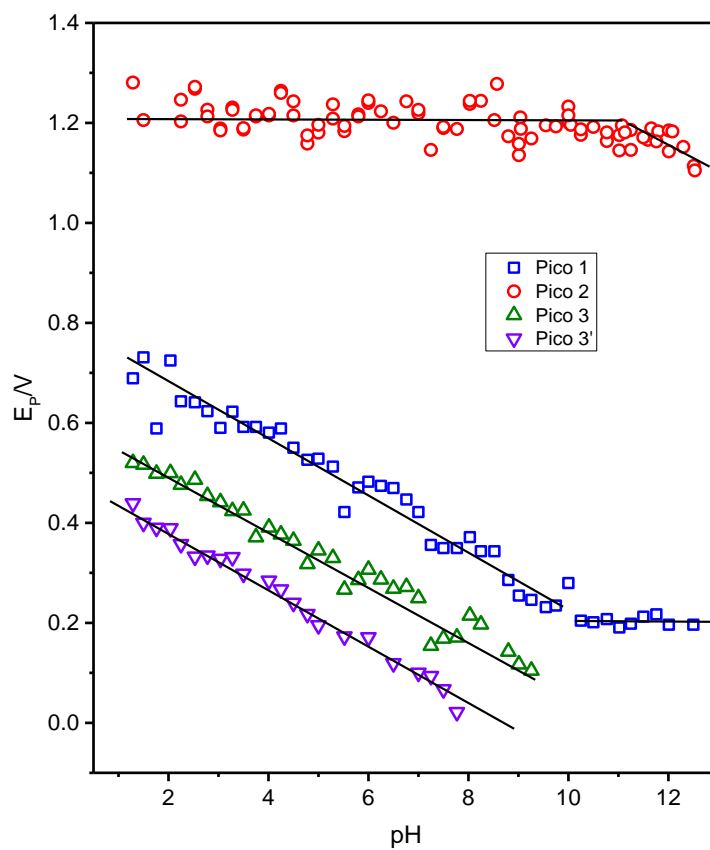


Figura 3.8. Dependencias de los potenciales de pico de los picos voltamétricos con el pH de la disolución para sesamol $1 \cdot 10^{-3}$ M. $v = 0.1$ V/s. Para el sistema 3-3': $t_d = 20$ s.

El número de electrones que intervienen en el proceso que ocurre a los potenciales del pico 1 puede obtenerse a partir de la comparación de los voltagramas con la señal obtenida para la 1,4-benzoquinona. Esto se muestra en la **Figura 3.9**.

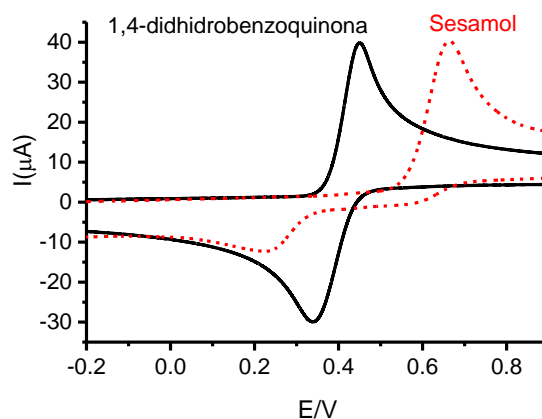


Figura 3.9. Voltagramas cíclicos de 1,4-dihidroquinona y sesamol, ambos $1 \cdot 10^{-3}$ M, a $\text{pH}=2.5$ y $v=0.1$ V/s.

Los picos de oxidación del sesamol y la 1,4-benzoquinona tienen intensidades muy similares. No obstante, la intensidad de pico en voltametría depende del mecanismo de la reacción rédox que se da sobre el electrodo y no puede utilizarse directamente para evaluar el número de electrones que intervienen, a menos que se tenga la certeza de que los mecanismos de los procesos comparados son idénticos.

Se ha utilizado la voltametría de convolución [22-27] para analizar los barridos de oxidación de los voltagramas calculando la integral:

$$J = \pi^{-1/2} \int_0^t \frac{I(v)}{(t-v)^{1/2}} dv$$

donde I es la corriente, J la intensidad convolucionada, v una variable de integración y t el tiempo, que se relaciona con el potencial a través de la velocidad de barrido. De esta manera se obtienen curvas en forma de S, con valores límite J_L , independientes del mecanismo de la reacción electródica y que vienen dados por:

$$J_L = nFAD^{1/2}c_0$$

donde n es el número de electrones implicados en el proceso, A el área del electrodo y D y c_0 son el coeficiente de difusión y la concentración del reactivo en la disolución, respectivamente.

La **Figura 3.10** muestra que las corrientes límite de los voltagramas convolucionados correspondientes al sesamol y a la 1,4-benzoquinona son muy parecidas. La pequeña

Capítulo 3

diferencia entre ambas es debida a la diferencia de coeficientes de difusión. En conclusión, a los potenciales del pico 1 se intercambian dos electrones en el proceso global.

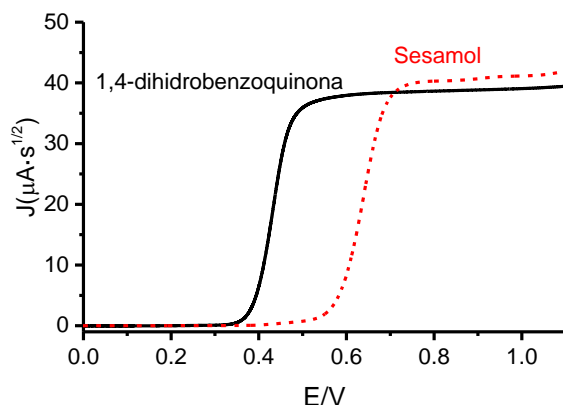


Figura 3.10. Voltagramas convolucionados de los picos de oxidación de sesamol y 1,4-dihidroquinona, ambos $1 \cdot 10^{-3}$ M, a pH=2.5 y $v=0.1$ V/s.

Para reforzar esta conclusión, se han realizado electrolisis a potenciales más positivos que el pico 1, pero antes de que comience el pico 2. En esos casos el color de la disolución cambia de prácticamente incoloro a naranja. La **Figura 3.11** muestra espectros obtenidos a lo largo de la electrolisis.

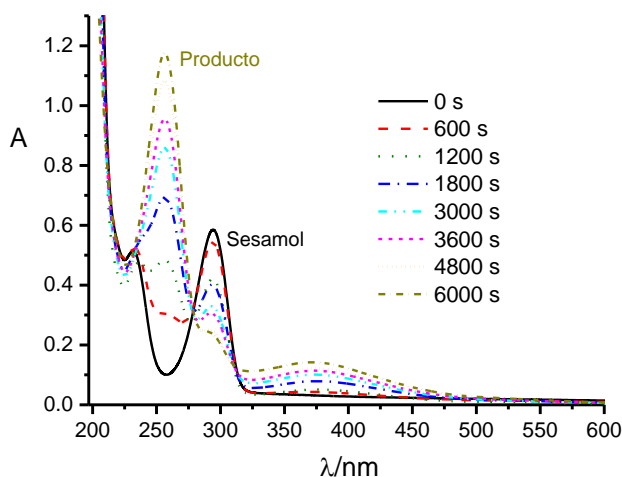


Figura 3.11. Espectros UV-Vis de la disolución de Sesamol $1.5 \cdot 10^{-3}$ M electrolizada a diferentes tiempos a pH 2.0. $E_{\text{electrolisis}}=0.900$ V.

El espectro UV-Vis al final de la electrolisis es muy diferente del registrado para el sesamol, y muestra las tres bandas características del anillo de 1,4-benzoquinona [28], centradas a 380 nm, 290 nm y 250 nm, en este caso.

El número de electrones que intervienen en el proceso de oxidación se obtuvo de la pendiente de la representación de la carga que pasa durante la electrolisis vs. los moles de sesamol oxidado. Esto se muestra en la **Figura 3.12**, para la cual la pendiente de la recta es de 2.02, por lo que se confirma que el proceso global es bielectrónico.

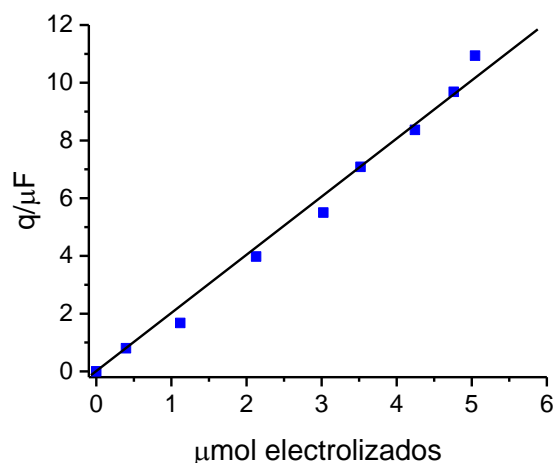


Figura 3.12. Dependencia de la carga con la cantidad de sesamol convertida en la electrolisis de sesamol $1.5 \cdot 10^{-3}$ M a pH 2.0. $E_{\text{electrolisis}}=0.900$ V.

Dado que son necesarios dos faradays por mol de sesamol electrolizado para obtener el producto de la oxidación, se realizó una electrolisis total de una disolución de sesamol, pasando la cantidad de carga correspondiente. La disolución resultante se analizó con microextracción en fase sólida y un sistema de cromatografía de gases-espectrometría de masas (ver materiales y métodos) y tras varios intentos cambiando las condiciones experimentales se llegó a la conclusión de que el punto de ebullición del producto sobrepasa la temperatura operativa del cromatógrafo. Por lo tanto, se llevó a cabo una derivatización con anhídrido trifluoroacético y se identificó un derivado fluorado de (hidroximetoxi)-1,4-benzoquinona.

En la **figura 3.9** se observa también que el pico de oxidación de la 1,4-dihidroquinona aparece a potenciales más positivos que el pico 1, esto es, la 1,4-dihidroquinona se oxida a potenciales menores que el sesamol. Además, el proceso rédox del sistema 3-3'

Capítulo 3

es muy parecido al correspondiente a la 1,4-dihidroquinona, como se aprecia en la **Figura 3.13**.

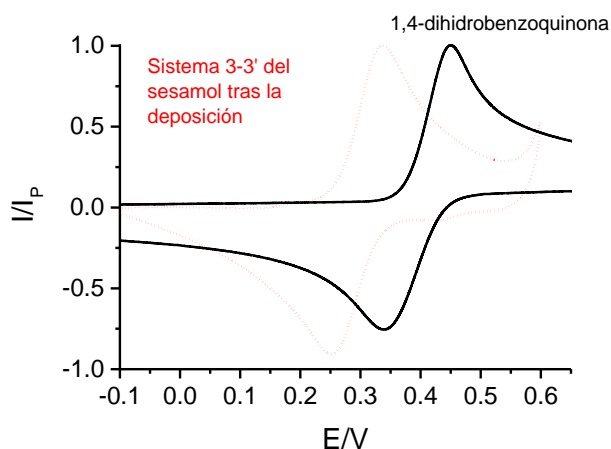


Figura 3.13. Voltamogramas cíclicos normalizados de 1,4-dihidroquinona y el sistema 3-3' del sesamol tras la deposición a un potencial de 0.900 V, a pH=2.5 y $v=0.1$ V/s.

Los menores potenciales encontrados para el sistema 3-3' pueden atribuirse a la presencia del sustituyente en posición 3. El grupo hidroximetoxilo es fuertemente activante debido al efecto resonante del átomo de oxígeno unido al anillo, y la carga negativa originada sobre el anillo facilita la oxidación con respecto al compuesto no sustituido.

Todos estos hechos y conclusiones indican que el mecanismo del proceso mostrado en el **esquema 3.4** debe ser muy similar, si no el mismo, al de la oxidación-reducción de la 1,4-dihidroquinona.

Se trata a continuación de caracterizar el mecanismo de oxidación del sesamol, a los potenciales del pico 1.

En la **Figura 3.14** se presentan los voltamogramas de sesamol a diferentes velocidades de barrido.

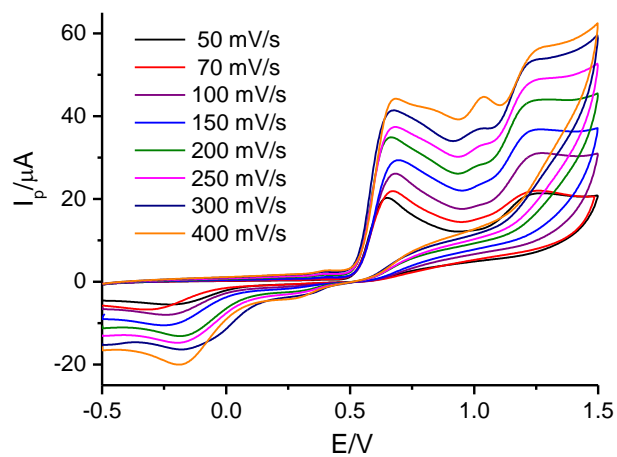


Figura 3.14. Voltagramas cíclicos del primer ciclo a diferentes velocidades de barrido. c_{sesamol} : 10^{-3} mol/L, pH: 2.50.

En la **Figura 3.15** se presenta la dependencia de las intensidades de pico (pico 1) con la velocidad de barrido.

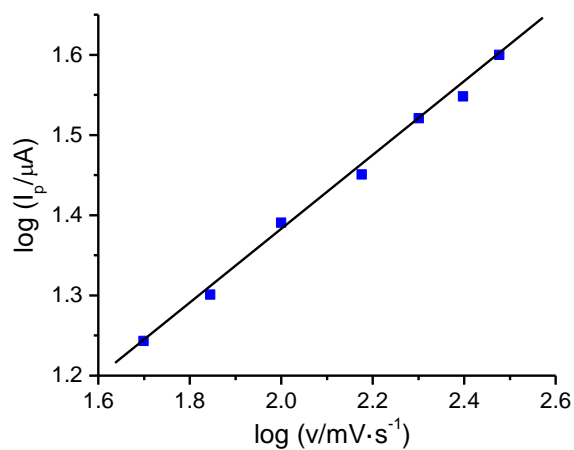


Figura 3.14. Voltametría cíclica (primer ciclo) de sesamol 10^{-3} M a pH: 2.50. Representación de $\log I_p$ frente a $\log v$.

Capítulo 3

La pendiente de la recta es 0.48, próxima al valor de 0.5 que caracteriza los procesos controlados por difusión, lo cual sugiere que la adsorción sobre el electrodo, de haberla, es débil.

Por otro lado, en la **Figura 3.15** se presenta la dependencia del potencial de pico con la velocidad de barrido. Las pendientes de las representaciones del potencial de pico frente al logaritmo de la velocidad de barrido son de 13 y 15 mV, para los picos 1 y 2 respectivamente.

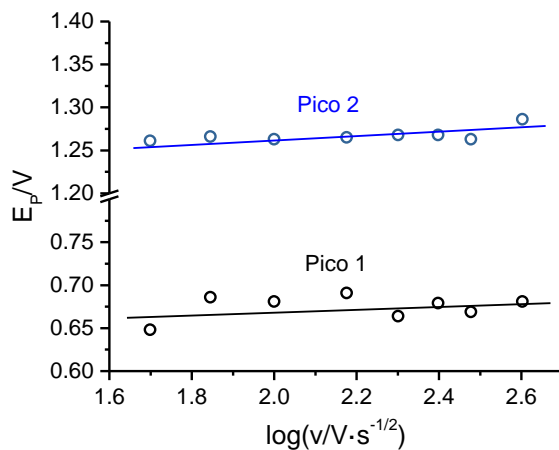


Figura 3.15. Voltametría cíclica (primer ciclo) de sesamol 10^{-3} M a pH: 2.50. Representación de E_p frente a $\log v$.

Las intensidades de pico son independientes del pH del medio, salvo en medios fuertemente ácidos, donde aumenta muy ligeramente, lo que quiere decir que no hay en principio cambios de mecanismo al modificarse la acidez del medio.

En la **Figura 3.16** se presentan voltagramas cíclicos a pH 1.30 y diferentes valores de concentración.

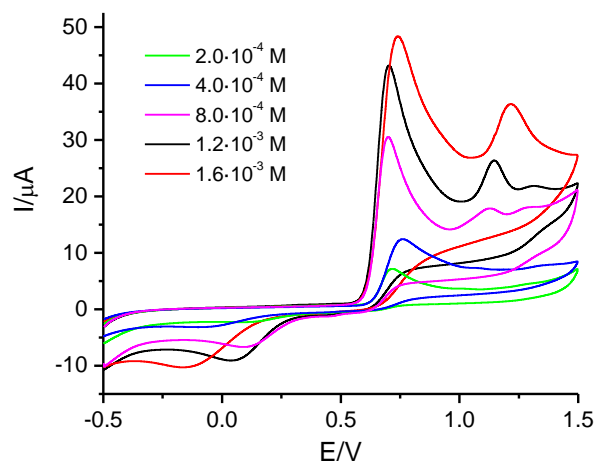


Figura 3.16. Voltagramas cíclicos del primer ciclo a diferentes concentraciones de sesamol a pH 1.30 y 0.1 V/s.

A concentraciones bajas se aprecia solamente el pico 1 de oxidación del sesamol mientras que a concentraciones más altas va apareciendo un pico cuya morfología puede verse de manera más detallada en la **Figura 3.17**.

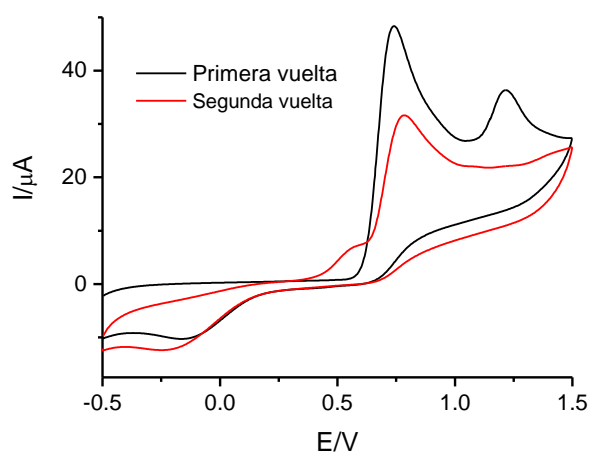


Figura 3.17. Voltagramas cíclicos del primer y segundo ciclos de sesamol $1.6 \cdot 10^{-3}$ M a pH 1.30 y 0.1 V/s.

Capítulo 3

Este pico no se observa a bajas concentraciones, pero crece a medida que se aumenta la concentración. Además, su forma es simétrica, no asimétrica como cabría esperar para un voltograma correspondiente a un proceso de oxidación donde el transporte de las especies que participan en la reacción redox se realiza fundamentalmente por difusión. Además, este pico aparece en el primer ciclo, pero desaparece en el segundo y siguientes. Todo ello indica que este pico corresponde a un proceso de adsorción sobre el electrodo [29].

La representación la intensidad de pico frente a la concentración es lineal, mientras que no hay variación en el potencial de pico con esta variable.

En la **Figura 3.18** se muestran voltagramas convolucionados en diferentes condiciones experimentales.

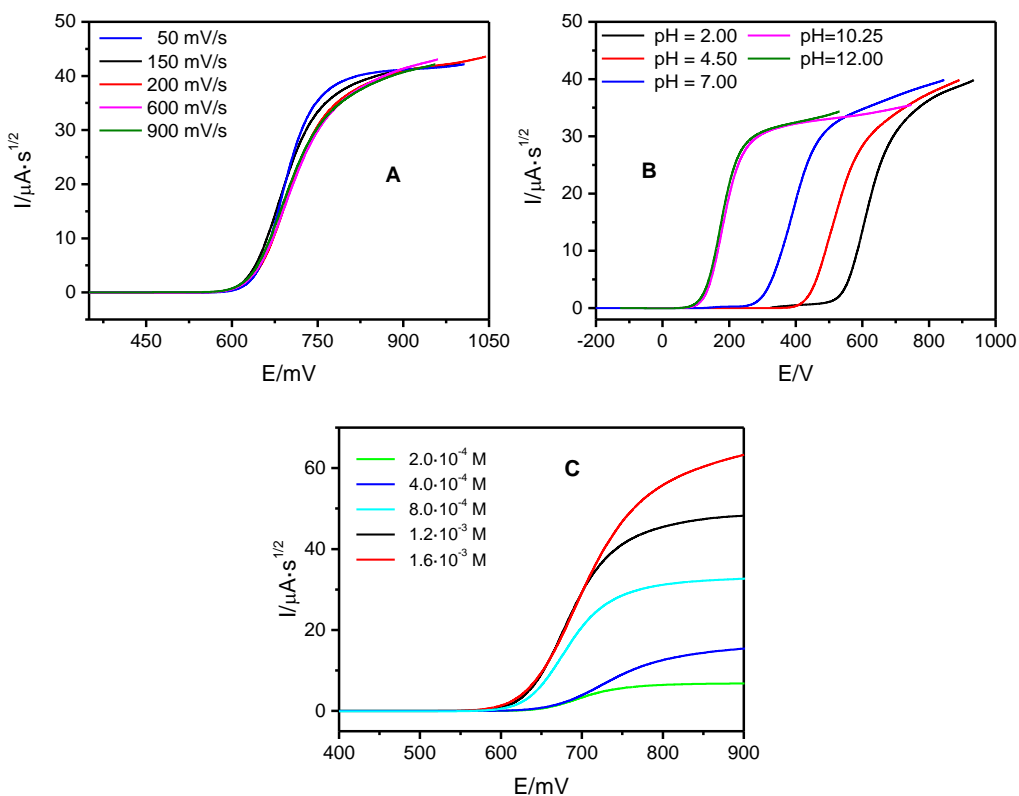


Figura 3.18. Voltagramas convolucionados del primer pico de oxidación del sesamol. A) $\text{pH} = 2.00$; $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. B) $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $v = 0.1 \text{ V/s}$. C) $\text{pH} = 2.00$; $v = 0.1 \text{ V/s}$.

Como puede observarse, la intensidad límite convolucionada es independiente de la velocidad de barrido, como cabe esperar si los procesos están controlados por difusión, lo cual sugiere, como ya se ha apuntado, que la adsorción sobre el electrodo, de haberla, es débil.

Además, la intensidad límite convolucionada varía linealmente con la concentración de sesamol como se aprecia en la **Figura 3.19**.

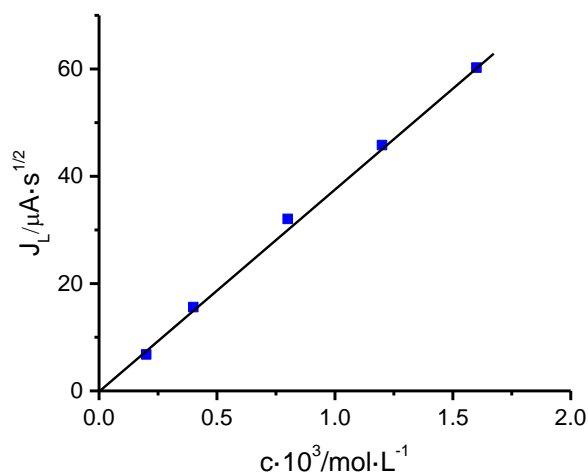


Figura 3.19. Dependencia de la la intensidad límite convolucionada con la concentración de sesamol. pH = 2.00; $v = 0.1 \text{ V/s}$.

Todos estos datos indican que el proceso de oxidación debe ser de primer orden con respecto a la concentración de sesamol.

Se pueden establecer criterios de diagnóstico para los diferentes procesos electroquímicos utilizando análisis logarítmicos basados en la ecuación [22-27]:

$$E = E_{1/2} + b \ln[f(I, J)]$$

donde $f(I, J)$, $E_{1/2}$ y b dependen del mecanismo concreto de la reacción electródica, como se muestra en la **Tabla 3.1**.

Proceso	$f(I, J)$	$E_{1/2}$	b
Reversible (E_r)	$\frac{J}{J_L - J}$	E'_0	$\frac{RT}{nF}$
Irreversible (E_i)	$\frac{I}{J_L - J}$	$E'_0 + \frac{RT}{\alpha nF} \ln \frac{k_f^0}{D^{1/2}}$	$\frac{RT}{\alpha nF}$
Reacción química tras un proceso E_r ($E_r C_i$)	$\frac{I}{J_L - J}$	$E'_0 + \frac{RT}{2nF} \ln k$	$\frac{RT}{nF}$

Tabla 3.1. Valores de los parámetros del análisis de convolución para diferentes mecanismos.

Los barridos directos de los voltagramas se analizaron utilizando la función correspondiente a un proceso reversible y los resultados se muestran en la **Figura 3.20**. Los análisis logarítmicos del pico 3 son muy parecidos a los correspondientes al pico de oxidación de la 1,4-dihidroquinona.

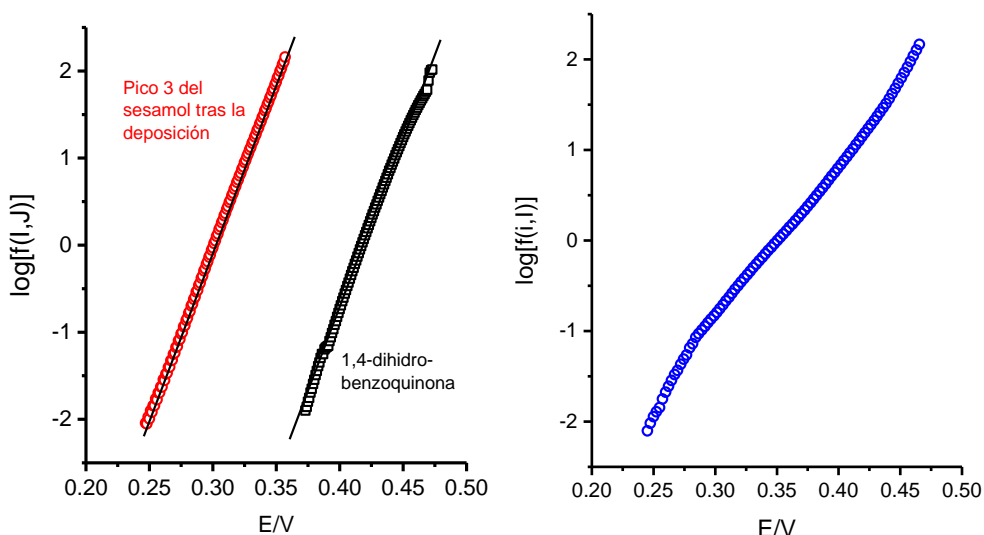


Figura 3.20. Análisis de convolución de los barridos de oxidación con la función para procesos $E_i/E_r C_i$ a $v = 0.1$ V/s, $c = 1 \cdot 10^{-3}$ M. Izquierda: pH = 2.50. Derecha pH= 7.00

Los análisis logarítmicos del pico 3 son muy parecidos a los correspondientes a la oxidación de la 1,4-dihidroquinona, lo cual reafirma la conclusión de que los mecanismos en ambos casos deben ser los mismos.

Sin embargo, para el pico 1 estos análisis no fueron lineales, probablemente debido a procesos de adsorción débil, aunque los tramos a menores sobrepotenciales presentaron pendientes en todos los casos del orden de 45 mV a $\text{pH} < \text{pK}_a$, lo que indica que la segunda transferencia electrónica irreversible es la etapa determinante de la velocidad (e.d.v.) del proceso de oxidación [30, 31]. En medios básicos los análisis de convolución resultaron aún menos lineales que a $\text{pH} < 10$, lo que plantea una cierta incertidumbre a la hora de establecer el mecanismo de oxidación.

Por ello se han analizado también las curvas intensidad-potencial a los potenciales correspondientes a los pies de las ondas, en los cuales la contribución del transporte es mínima y se pueden obtener las curvas de Tafel y los órdenes electroquímicos de reacción.

La **Figura 3.21** muestra algunas representaciones de Tafel en función del pH en las dos zonas de pH observadas. Las pendientes de los tramos lineales a $\text{pH} < \text{pK}_a$ fueron de 43-45 mV, mientras que a $\text{pH} > \text{pK}_a$ fueron más bajas, cercanas a 32 mV. Para $\text{pH} < \text{pK}_a$ los valores de pendiente coinciden con los correspondientes a los análisis logarítmicos de convolución, lo que confirma que la e.d.v. del proceso de oxidación debe ser la segunda transferencia electrónica, irreversible. Sin embargo, a $\text{pH} > \text{pK}_a$, la pendiente próxima a 30 mV es compatible con dos transferencias electrónicas reversibles. Puesto que no hay un pico de reducción a potenciales muy próximos al de oxidación (menos de 60 mV), en este rango de pH el proceso debe ser EC, siendo la e.d.v. una etapa química posterior a las transferencias electrónicas.

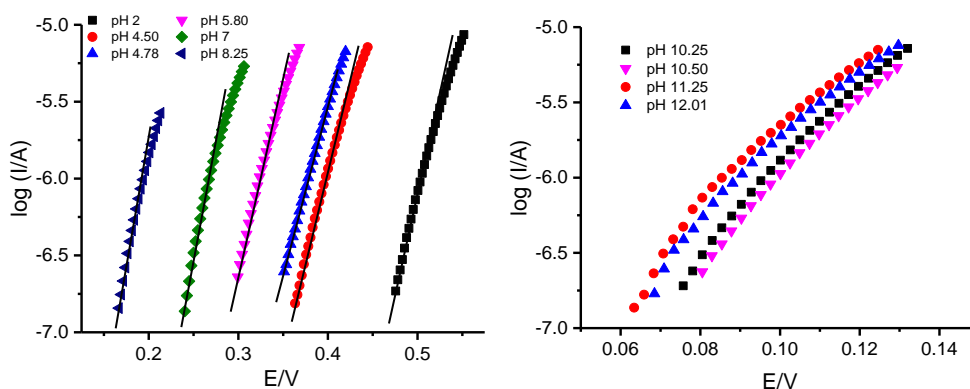


Figura 3.21. Representaciones $\log I$ vs. E a los potenciales correspondientes al pie del voltograma convolucionado del primer pico de oxidación del sesamol a $v = 0.1$ V/s y $c = 1 \cdot 10^{-3}$ M.

Capítulo 3

Utilizando estas representaciones se pueden obtener los órdenes electroquímicos de reacción con respecto al ion H^+ a partir de la pendiente de $\log I$ vs. pH a potencial constante. En el caso de $pH < pK_a$, el desplazamiento de las curvas es grande y el orden puede obtenerse de la pendiente de E vs. pH , a intensidad constante, dividida por el valor de la pendiente de Tafel. Las representaciones correspondientes se muestran en la **Figura 3.22**.

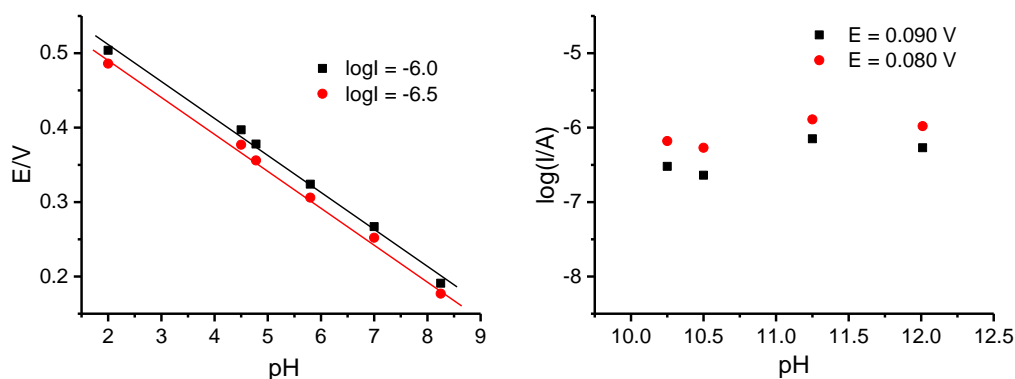


Figura 3.22. Representaciones de E vs. pH a intensidad constante (izquierda) y de $\log I$ vs. pH , a potencial constante (derecha) para los potenciales correspondientes al pie del voltograma convolucionado del primer pico de oxidación del sesamol a $v = 0.1 V/s$ y $c = 1 \cdot 10^{-3} M$.

A partir de estas representaciones, los órdenes electroquímicos de reacción con respecto al ion H^+ fueron -1.1 y 0 en las zonas de pH comentadas.

Aunque hay una fuerte evidencia de que el proceso de oxidación es de orden unidad con respecto al sesamol, ya que la ecuación empleada en el análisis de convolución corresponde a procesos de primer orden, esto se ha comprobado obteniendo las pendientes de Tafel y el orden de reacción variando la concentración de sesamol a pH constante, como se muestra en la **Figura 3.23**.

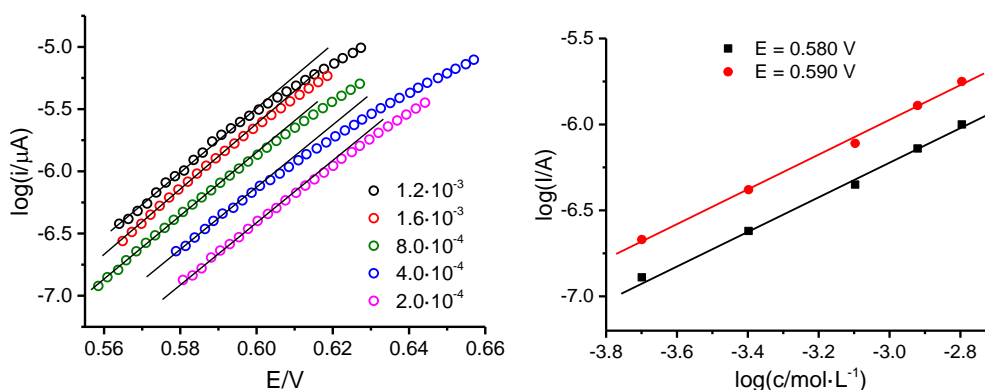


Figura 3.22. Izquierda: representación de $\log I$ vs. E a pH 2.00 y a las concentraciones de sesamol indicadas en la figura. Derecha: representación de $\log I$ vs. $\log c_{\text{sesamol}}$ a los potenciales indicados en la figura.

Las pendientes de las representaciones de $\log I$ vs. $\log c_{\text{sesamol}}$ son muy próximas a la unidad, lo que confirma el orden de reacción con respecto al reactivo.

Estas conclusiones se confirman también cuando se utiliza la voltametría de pulso diferencial, VPD. Los análisis de los voltagramas DP se realizaron utilizando la ecuación correspondiente a procesos de primer orden [32]:

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

donde $L = \exp[-(E - E_p)/b]$, I_p y E_p son la intensidad y el potencial de pico, respectivamente, y b un parámetro que tiene el mismo significado que la pendiente de Tafel o la del análisis logarítmico de convolución [32, 33].

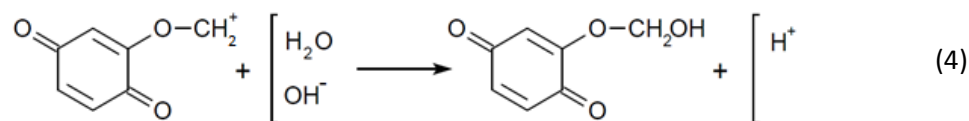
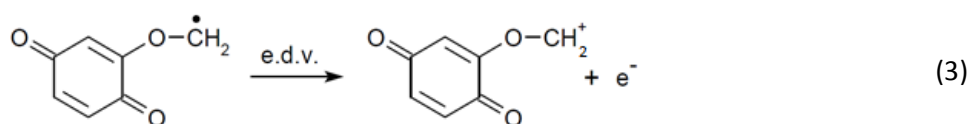
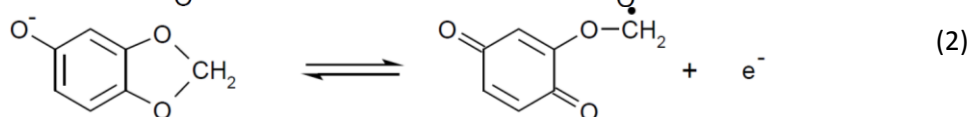
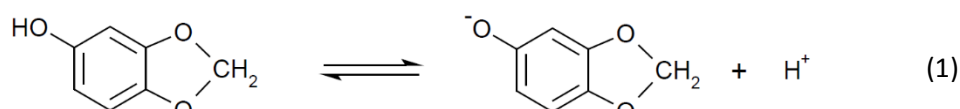
La ecuación anterior corresponde a un pico simétrico cuya área es proporcional a la concentración de la especie que se oxida (y también a $b \cdot I_p$) y al número de electrones intercambiados en el proceso global. Los picos VPD del sesamol se ajustan bien a la ecuación hasta los potenciales anteriores al potencial de pico y, en muchos casos, hasta potenciales mayores que éste. No obstante, la proximidad de la descarga del electrolito soporte origina una distorsión a altos sobrepotenciales y las curvas se distorsionan. Por esta razón, el parámetro b se obtuvo del ajuste entre los resultados experimentales y teóricos a potenciales por debajo del potencial de pico.

A $\text{pH} < \text{pK}_a$ los valores de b experimentales fueron de 41-43 mV, correspondientes a un proceso bielectrónico en el cual la segunda transferencia es irreversible, siendo ésta la

Capítulo 3

e.d.v. [32, 33]. A $\text{pH} > \text{pK}_a$ los valores de b experimentales fueron de 32-33 mV, correspondientes a un proceso bielectrónico en el cual ambas transferencias son reversibles.

Así pues, se puede concluir que la molécula de sesamol para oxidarse debe primero disociarse, siendo esta la primera etapa del proceso a valores menores que el pK_a , y no existiendo esta etapa a $\text{pH} > \text{pK}_a$. Además, a $\text{pH} < \text{pK}_a$ la e.d.v. es la segunda transferencia electrónica irreversible, el proceso global involucra el intercambio de dos electrones por molécula de sesamol, los órdenes de reacción son la unidad, tanto respecto al sesamol y al ion H^+ y que el proceso global viene dado por el **esquema 3.5**. Con todos estos datos se puede proponer el siguiente esquema para la oxidación a potenciales correspondientes al pico 1:



Esquema 3.5. Primer pico. Mecanismo de oxidación del sesamol a $\text{pH} < \text{pK}_a$.

La reacción (1) corresponde a la disociación del sesamol; la reacción (2) es la primera transferencia electrónica que transcurre con la apertura del anillo. La reacción (4) es la adición de OH^- al catión obtenido tras la e.d.v. y contempla la posibilidad de reacción con los propios iones hidroxilo o con el agua, según el pH sea básico o ácido, respectivamente.

Todos los parámetros electroquímicos y cinéticos obtenidos para este pico se pueden explicar completamente con este esquema.

Las relaciones I-E-t para este proceso pueden obtenerse utilizando la aproximación de difusión convectiva y las condiciones de estado estacionario. Además, las ecuaciones

diferenciales correspondientes a la aproximación de la capa de difusión de Nernst pueden resolverse utilizando el método de las variables adimensionales como se hace en la bibliografía [34-39]. Con estas aproximaciones se obtiene la siguiente ecuación aplicable a bajos sobrepotenciales:

$$i = 2FK_1K_2k_3K'c_H^{-1}c_S \exp\left[\frac{(1+\beta)FE}{RT}\right]$$

donde K_1 y K_2 son las constantes de equilibrio de las reacciones 1 y 2, k_3 la constante de velocidad de la reacción 3 a potencial cero, F la constante de Faraday y $K' = \exp[(1+\beta)F\Delta\phi_{ref}/RT]$, siendo $\Delta\phi_{ref}$ el potencial del electrodo de referencia.

De esta ecuación se deduce que los órdenes electroquímicos de reacción con respecto al ion H^+ y al sesamol deben ser -1 y 1 , respectivamente, lo cual concuerda con los datos experimentales, y que la pendiente de Tafel, con $\beta=0.5$, debe valer unos 40 mV. Todos estos datos concuerdan con los experimentales.

A medida que aumenta el pH, el potencial de pico se hace más bajo, de manera que la oxidación es más fácil, esto es, las transferencias electrónicas (reacciones 2 y 3) son más rápidas y por tanto se hacen más reversibles. Por eso, a $pH > pK_a$ las pendientes de Tafel disminuyen y la reacción (3) es cuasi-reversible. Además, a estos valores de pH la reacción (1) no se da, ya que la forma aniónica del sesamol es la especie en disolución.

En este caso, el mecanismo anterior queda reducido a las reacciones (2)-(4), siendo la etapa (3) cuasi-reversible y a bajos sobrepotenciales, la relación intensidad-potencial queda:

$$i = 2FK_2K_3k_4K'c_S \exp\left[\frac{2FE}{RT}\right]$$

donde todos los símbolos tienen el significado ya comentado. En este caso, $K' = \exp[2F\Delta\phi_{ref}/RT]$.

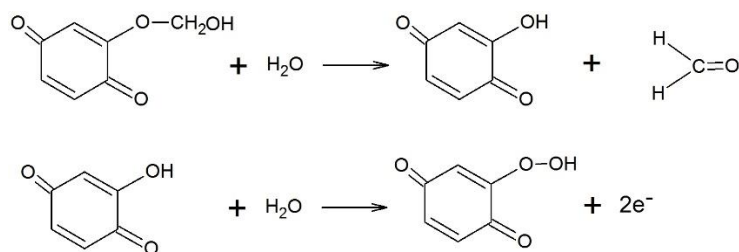
De esta ecuación se deduce que los órdenes electroquímicos de reacción con respecto al ion H^+ y al sesamol deben ser 0 y 1 , respectivamente, lo cual concuerda con los datos experimentales, y que la pendiente de Tafel, debe valer unos 30 mV. Todos estos datos concuerdan con los experimentales.

El análisis del pico 2 es difícil debido a la proximidad de la descarga del electrolito soporte. Como se muestra en la **figura 3.8**, los potenciales de pico no cambian con el pH, excepto en medios muy básicos. Además, por debajo de pH 9, la corriente límite convolucionada tiene el mismo valor que la correspondiente al pico 1, pero aumenta

Capítulo 3

hasta hacerse el doble a $\text{pH} > 10$. Esto significa que el proceso que tiene lugar en medios ácidos, neutro y básico es bielectrónico, mientras que en medios muy básicos es tetraelectrónico.

El reactivo para el proceso de oxidación que tiene lugar a estos potenciales debe ser la 1,4-benzoquinona sustituida obtenida en la oxidación anterior. Dado que el potencial de pico no depende del pH, los iones H^+ u OH^- no toman parte en el proceso, al menos antes de la e.d.v. Por tanto, puede postularse que la 1,4-benzoquinona sustituida se hidroliza por una molécula de agua para dar formaldehído y 3-hidroxi-1,4-benzoquinona, la cual se oxida a continuación al correspondiente peróxido con la participación de otra molécula de agua, como se muestra en el **Esquema 3.6**.



Esquema 3.6. Mecanismo propuesto para el pico 2 del sesamol.

En disoluciones muy básicas la hidrólisis tiene lugar por iones OH^- , lo cual explica el desplazamiento de los potenciales de pico, y el proceso de oxidación progresa más allá del peróxido.

La actividad antioxidante del sesamol medida por las técnicas del DPPH y voltametría cíclica es media-alta [40]. La capacidad de atrapamiento de radicales frente a ROS medida por voltametría de pulso diferencial utilizando la oxidación de peróxido de hidrógeno es media-baja [41]. Este carácter antioxidante del sesamol puede atribuirse a la relativa labilidad del anillo de cinco miembros que da lugar a la quinona. La formación de esta molécula es responsable de la actividad antioxidante del sesamol, más que la presencia del $-\text{OH}$ fenólico en la molécula, como se postula en la bibliografía [42]. Además, la formación de radicales en la ruptura del anillo puede explicar parcialmente la capacidad del sesamol para interactuar con ROS.

3.4.2. Constantes de disociación de los grupos fenólicos de ácido gálico y 2,4- y 2,5-dihidroxibenzaldehídos en relación con sus actividades antioxidantes

En primer lugar, se determinaron las actividades antioxidantes a partir de la medida de la disminución del voltagrama de pulso diferencial de la señal de oxidación del peróxido de hidrógeno sobre un electrodo de mercurio en presencia de cantidades crecientes del antioxidante [43]. Este experimento mide la interacción con los radicales producidos en la oxidación del H_2O_2 , la cual es una medida de la capacidad del antioxidante para el atrapamiento de radicales y ROS. Puesto que el volumen añadido es proporcional a la concentración, el volumen V_{10} que disminuye el área del pico de oxidación del peróxido de hidrógeno en un 10% se relaciona con la actividad antioxidante, de manera que bajos valores de V_{10} implican altos valores de actividad. El inverso de V_{10} , μ_{10} , se seleccionó para expresar la actividad antioxidante debido a que altos valores de μ_{10} implican altos valores de actividad del compuesto investigado.

Las **Figuras 3.23 a 3.25** muestran los voltagramas DP de la oxidación del peróxido de hidrógeno tras la adición de cantidades crecientes de los antioxidantes estudiados.

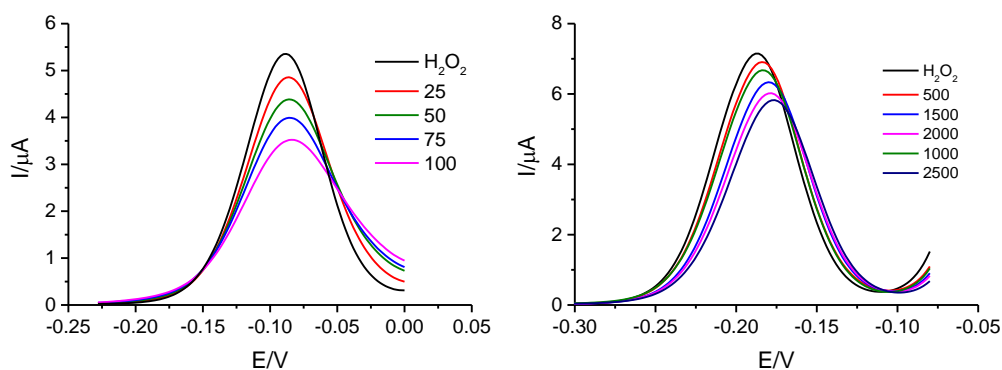


Figura 3.23. Voltagramas de pulso diferencial sobre electrodo de mercurio de H_2O_2 $5 \cdot 10^{-4}$ M en presencia de 2,4-dihidroxibenzaldehído (2,4DHB) $5 \cdot 10^{-3}$ M. Los números en la figura indican μL en 10 mL de disolución. Izquierda: pH=10.5 Derecha: pH=12.5

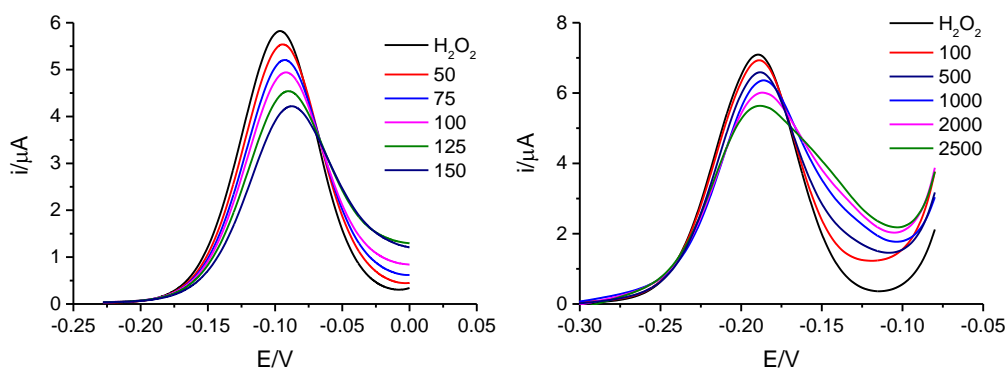


Figura 3.24. Voltagramas de pulso diferencial sobre electrodo de mercurio de H_2O_2 $5 \cdot 10^{-4}$ M en presencia de 2,5-dihidroxibenzaldehído (2,5DHB) $5 \cdot 10^{-3}$ M. Los números en la figura indican μL en 10 mL de disolución. Izquierda: $\text{pH}=10.5$ Derecha: $\text{pH}=12.5$

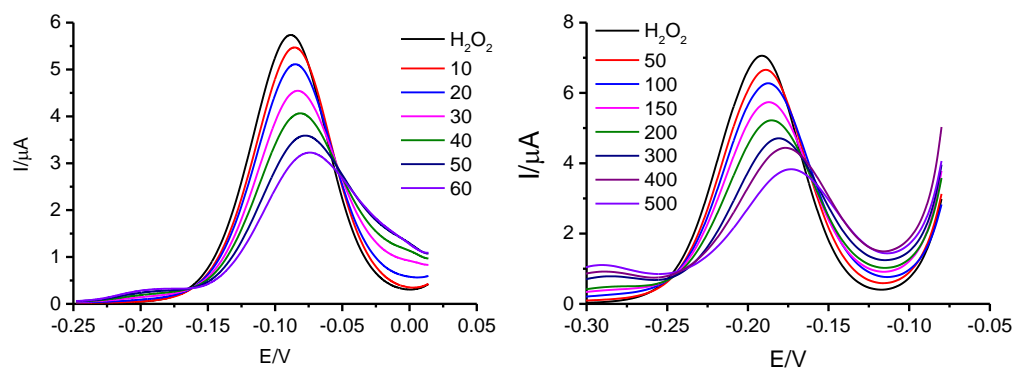


Figura 3.25. Voltagramas de pulso diferencial sobre electrodo de mercurio de H_2O_2 $5 \cdot 10^{-4}$ M en presencia de ácido gálico (AG) $5 \cdot 10^{-3}$ M. Los números en la figura indican μL en 10 mL de disolución. Izquierda: $\text{pH}=10.5$ Derecha: $\text{pH}=12.5$

Estos resultados muestran claramente que el pico de oxidación del peróxido de hidrógeno disminuye de intensidad a medida que aumenta la concentración de antioxidante. Esto sucede a ambos valores de pH , pero en el medio más básico son necesarios mayores volúmenes de antioxidante para producir la disminución. Esto es cierto para los tres compuestos investigados.

Las **Figuras 3.26** y **3.27** muestran los porcentajes de disminución del área del pico en función de los volúmenes de antioxidante.

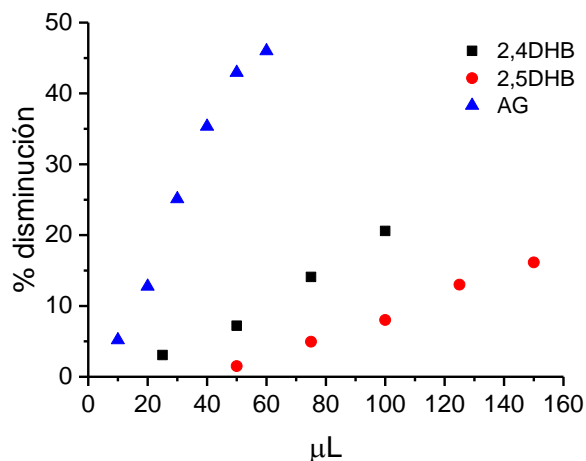


Figura 3.26. Porcentaje de disminución del área del pico VPD de H_2O_2 $5 \cdot 10^{-4}$ M para los antioxidantes a $c=5 \cdot 10^{-3}$ M vs. μL en 10 mL de disolución a pH 10.5.

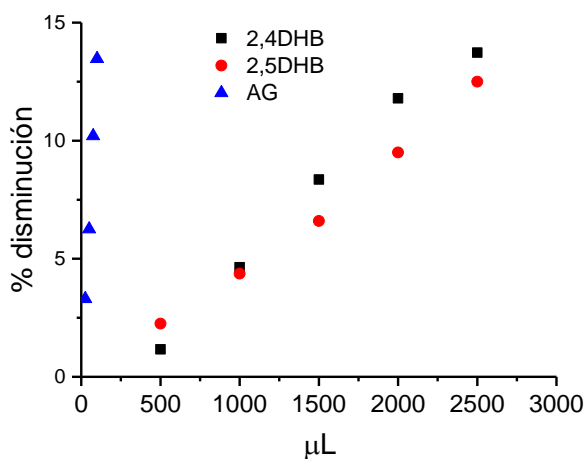


Figura 3.27. Porcentaje de disminución del área del pico VPD de H_2O_2 $5 \cdot 10^{-4}$ M para los antioxidantes a $c=5 \cdot 10^{-3}$ M vs. μL en 10 mL de disolución a pH 12.5.

El análisis de los resultados obtenidos a pH 10.5 lleva a la conclusión de que la actividad antioxidante, reflejada en el valor de V_{10} , para el isómero 2,4- ($\approx 60 \mu\text{L}$) es aproximadamente el doble que el medido para el isómero 2,5- ($\approx 110 \mu\text{L}$). En cambio, a pH 12.5 las actividades antioxidantes de ambos compuestos son similares (≈ 1800 - $2000 \mu\text{L}$), aunque ligeramente menor en el caso del gentaldehído (2,5DHB). Es conocido que la acción disociación de los grupos $-\text{OH}$ es importante para comprender

Capítulo 3

la relación estructura-actividad de los derivados del ácido gálico con su actividad antioxidante [44]. Por lo tanto, los cambios en las actividades antioxidantes, tanto absolutos como relativos, podrían discutirse a la luz de la extensión de la disociación de los grupos hidroxilo de las moléculas.

Para confirmar esta hipótesis es esencial el conocimiento de los valores de pK de estos compuestos. Los valores de pK del ácido gálico son [45]: 4.0 (grupo carboxílico) y 8.7, 11.4 y > 13 (grupos hidroxilo), pero los valores de pK completos de los dihidroxibenzaldehídos no se encuentran en la bibliografía y solamente hay una referencia sobre el valor del primer pK de disociación del 2,5DHB [46]. Además, el conocimiento de estos valores de pK será también esencial a la hora de discutir los mecanismos de oxidación electroquímica.

Por lo tanto, se hace necesario establecer los valores de las constantes de disociación de los dihidroxibenzaldehídos.

Las **Figuras 3.28** y **3.29** muestran los espectros de absorción UV-Vis como función de la acidez para ambos compuestos.

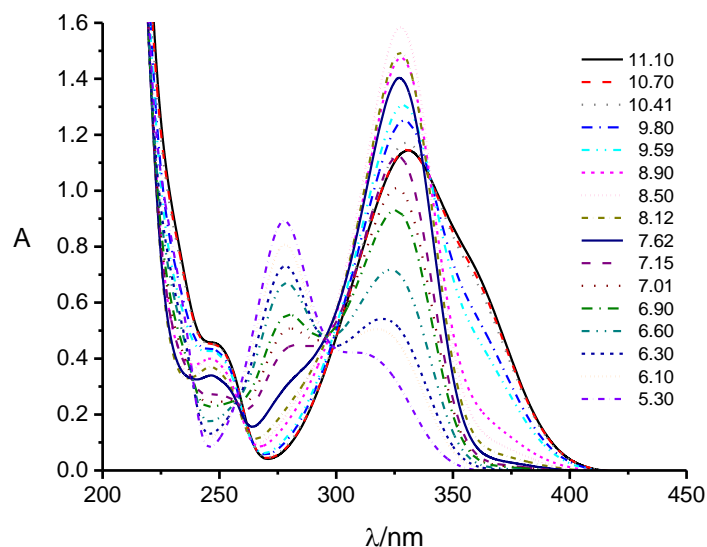


Figura 3.28. Espectros UV-Vis de 2,4DHB $1 \cdot 10^{-5}$ M en función de la acidez del medio. Los valores de pH se muestran en la figura.

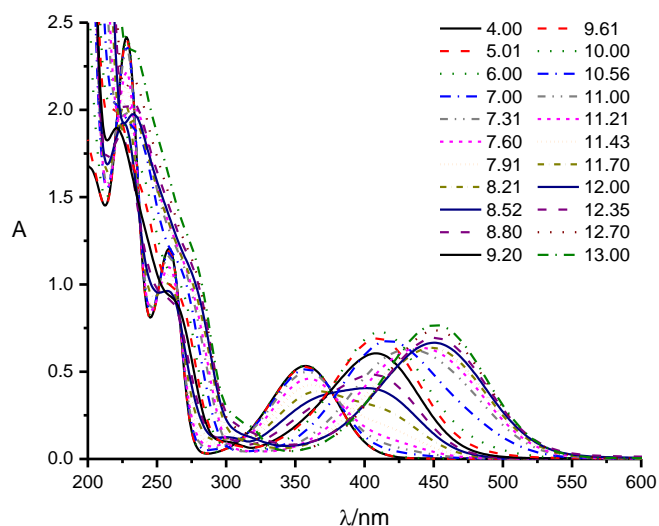
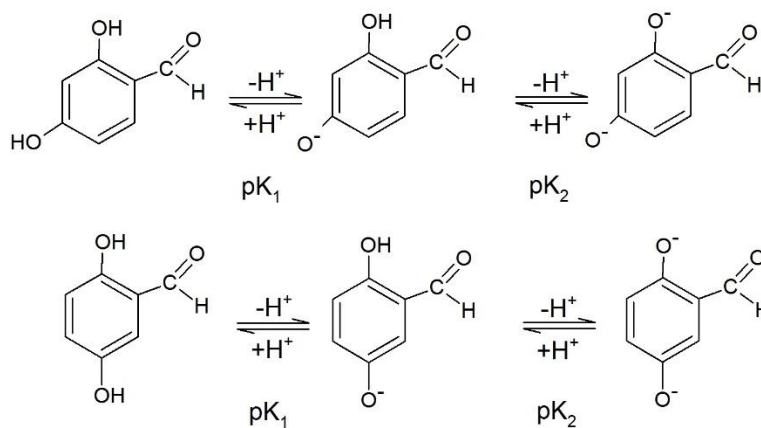


Figura 3.29. Espectros UV-Vis de 2,5DHB $1 \cdot 10^{-5}$ M en función de la acidez del medio. Los valores de pH se muestran en la figura.

Los espectros muestran varias bandas principales cuyas intensidades y, en menor grado, posiciones, dependen del pH del medio.

Los puntos isobécticos que aparecen en las **figuras 3.28 y 3.29** indican que los reactivos están involucrados en reacciones ácido-base, las cuales deben corresponder a la disociación de los grupos hidroxilo de las moléculas (**Esquema 3.7**):



Esquema 3.7. Disociación de los dihidroxibenzaldehídos.

Capítulo 3

En el esquema anterior se ha tenido en cuenta que el grupo hidroxilo en posición 2 puede formar un enlace de hidrógeno intramolecular con el grupo carbonilo adyacente [47] que estabiliza el –OH. Por esta razón las secuencias de disociación más plausibles son las que se muestran en el esquema.

Los espectros de absorción se han analizado utilizando un programa informático desarrollado en Microsoft Visual Basic 2013, basado en otros programas desarrollados en el Grupo Electroquímica Molecular de la UCO y utilizados previamente para determinar las constantes de disociación de otras moléculas [48, 49]. En este programa se supone que las bandas se pueden describir mediante la ecuación de distribución log-normal, más que por una gaussiana o una lorenziana, la cual viene descrita por la ecuación [50]:

$$A = A_0 \exp \left(\ln 2 \left[\frac{\ln \left[1 + 2b(v - v_0) / \Delta v_{1/2} \right]}{b} \right]^2 \right)$$

Donde A es la absorbancia a la frecuencia ν , A_0 y ν_0 son las coordenadas del máximo, $\Delta \nu_{1/2}$ la semianchura de la banda (anchura a la mitad de la intensidad máxima) y b es un parámetro que determina la asimetría de la curva. Cuando b tiende a cero, la ecuación se reduce a una curva gaussiana, es decir, la curva es simétrica.

Los espectros se han descompuesto en conjuntos de bandas integrados por el mínimo número de bandas posible, con la condición de que los parámetros que describen dichas bandas sean independientes tanto del pH como de la concentración, con la excepción obvia de la absorbancia máxima. Las **Figuras 3.30** y **3.31** muestran la comparación entre los resultados teóricos y los experimentales para ambos compuestos a valores de pH bajos y altos.

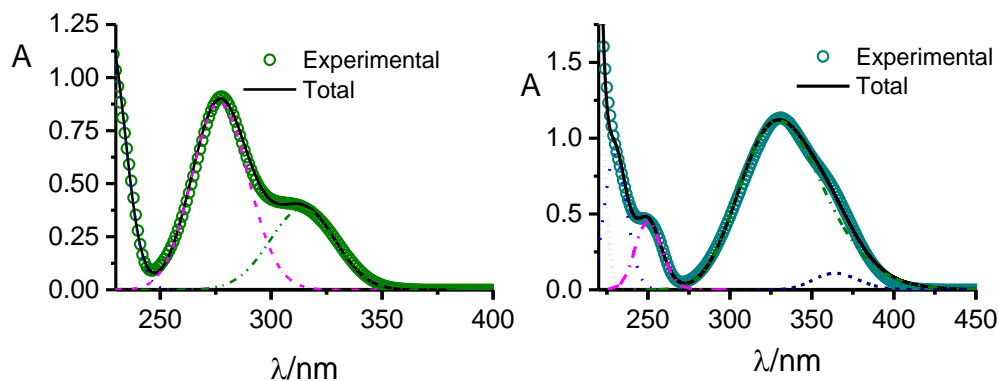


Figura 3.30. Espectros UV-Vis de 2,4DHB $1 \cdot 10^{-5}$ M. Ajuste entre los datos experimentales y los valores teóricos generados con la función log-normal a pH: 1.51 (izquierda) y 12.01 (derecha). Las líneas discontinuas son las bandas individuales teóricas.

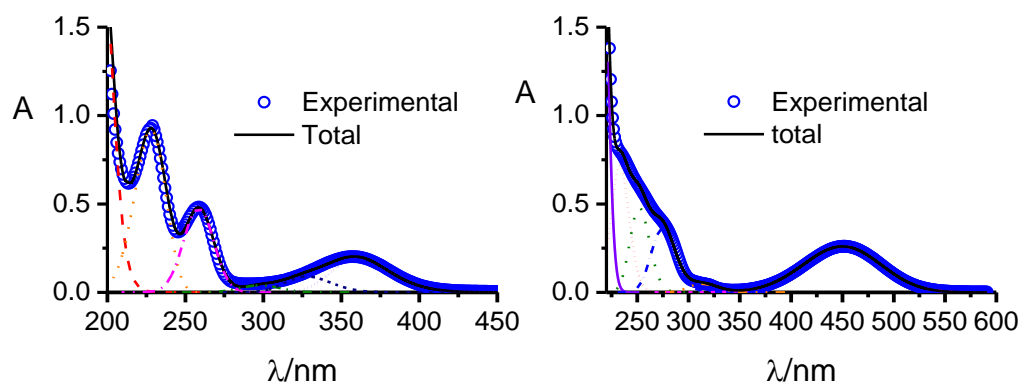


Figura 3.31. Espectros UV-Vis de 2,5DHB $1 \cdot 10^{-5}$ M. Ajuste entre los datos experimentales y los valores teóricos generados con la función log-normal a pH: 5.81 (izquierda) y 13 (derecha). Las líneas discontinuas son las bandas individuales teóricas.

Las intensidades de las bandas obtenidas de los ajustes de los datos mostrados en las **figuras 3.30** y **3.31** presentan variaciones con el pH que, o bien comienzan en cero y aumentan hasta alcanzar un valor máximo, o bien comienzan en un valor máximo y disminuyen hasta hacerse cero, o bien presentan un valor máximo a valores intermedios de pH, siendo cero a valores de pH mucho mayores y mucho menores. Los parámetros característicos de las principales bandas se muestran en la **Tabla 3.2**.

Compuesto	λ/nm	$\Delta\nu_{1/2}/\text{kK}$	b
2,4DHB	276.5	3.8	0.1
	313.3	3.8	0.15
	248.0	3.0	0.0
	327.0	3.3	0.16
	357.0	3.0	0.0
2,5DHB	258.0	3.3	0.15
	361.0	3.4	-0.05
	420.0	3.4	-0.1
	452.0	4.4	0.22

Tabla 3.2. Valores de los parámetros característicos de las bandas principales obtenidas de los ajustes.

Los parámetros mostrados en la tabla 3.2 permanecen prácticamente constantes en el rango de pH estudiado. Obviamente todas las bandas no aparecen simultáneamente a cualquier valor de pH. Las **Figuras 3.32** y **3.33** muestran las dependencias de las absorbancias máximas con el pH.

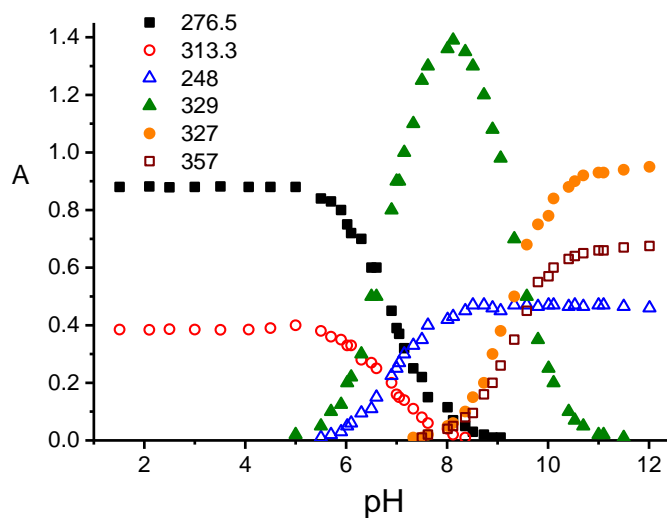


Figura 3.32. Espectroscopía UV-Vis de 2,4DHB $1 \cdot 10^{-5}$ M. Dependencia de las absorbancias máximas con el pH. Las longitudes de onda máximas (en nm) se muestran en la figura.

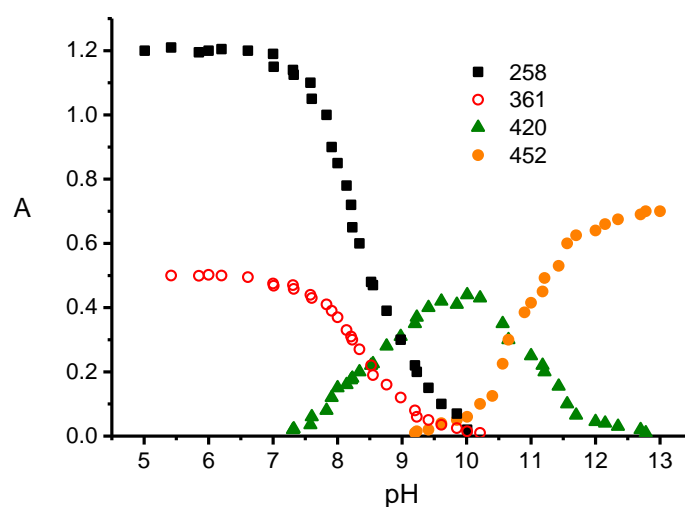


Figura 3.33. Espectroscopia UV-Vis de 2,5DHB $1 \cdot 10^{-5}$ M. Dependência de las absorvâncias máximas com o pH. Las longitudes de onda máximas (em nm) se muestran en la figura.

Si las variaciones con o pH de las absorvâncias máximas de las bandas individuales son debidas a los equilibrios ácido-base mencionados anteriormente, se debe cumplir la siguiente expresión:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{A_{\text{max}} - A}{A - A_{\text{min}}}$$

Donde A_{min} y A_{max} son los valores mínimo y máximo de las absorvâncias máximas, respectivamente, medidos a los valores de pH máximos y mínimos a los que aparece la curva. Las representaciones de $\log[(A_{\text{max}} - A)/(A - A_{\text{min}})]$ vs. pH deben ser líneas rectas cuyas ordenadas corresponden al pK. Cuando las bandas aumentan con o pH, la pendiente de la línea recta obtenida debe ser +1, mientras que en el caso contrario (intensidades decrecientes) dicha pendiente debe ser -1. Las **Figuras 3.34** y **3.35** muestran las representaciones para ambos compuestos en los rangos de pH ácido-neutro y neutro-básico.

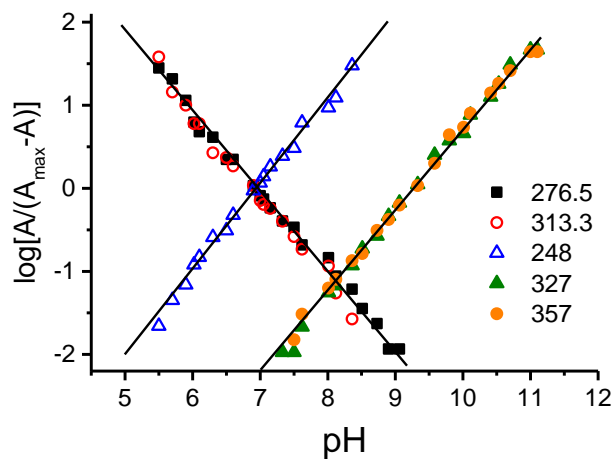


Figura 3.34. Espectroscopía UV-Vis de 2,4DHB $1 \cdot 10^{-5}$ M. Dependencia de la $\log\left[\frac{A_{\max} - A}{A - A_{\min}}\right]$ con el pH a las longitudes de onda máximas (en nm) mostradas en la figura.

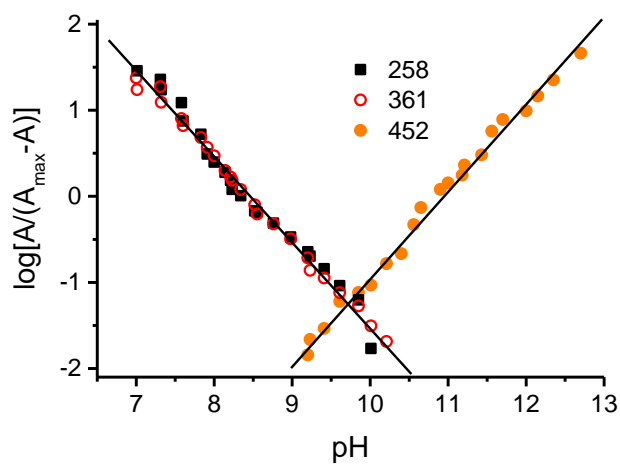


Figura 3.35. Espectroscopía UV-Vis de 2,5DHB $1 \cdot 10^{-5}$ M. Dependencia de la $\log\left[\frac{A_{\max} - A}{A - A_{\min}}\right]$ con el pH a las longitudes de onda máximas (en nm) mostradas en la figura.

Los valores de pK obtenidos de estas gráficas fueron 6.94 ± 0.03 y 9.28 ± 0.03 , para 2,4DHB, y 8.42 ± 0.03 y 10.93 ± 0.03 , para 2,5DHB.

El conocimiento de los valores de pK permite calcular el porcentaje de las diferentes especies en disolución a los dos valores de pH estudiados. La existencia de grupos hidroxilo disociados está relacionada con una mayor capacidad antioxidante, a igualdad de número de grupos hidroxilo en la molécula. A pH 10.5 el grupo hidroxilo en posición 4- del 2,4DHB se encuentra completamente disociado (esto ocurre a $\text{pH} > 9$, ya que el primer pK de disociación está próximo a 7) y el grado de disociación del grupo hidroxilo en posición 2- es aproximadamente un 94%. En el caso del 2,5DHB, el grupo hidroxilo en posición 5- se encuentra completamente disociado a dicho pH, pero el grado de disociación del grupo hidroxilo en posición 2- es ahora de un 37% aproximadamente. Esto quiere decir que a pH 10.5 la forma dianiónica del 2,4DHB es unas dos veces más abundante que la correspondiente forma dianiónica del 2,5DHB. Hay que recordar que a este pH la actividad antioxidante del isómero 2,4- es unas dos veces la que se mide para el isómero 2,5-.

En medios más básicos, a pH 12.5, los dos grupos hidroxilo del 2,4DHB se encuentran completamente disociados y alrededor de un 97.5% del isómero 2,5- se encuentra en forma dianiónica. La actividad antioxidante de este último compuesto a este pH es sólo ligeramente menor que la correspondiente al isómero 2,4-. Por tanto, en el caso de estos dos isómeros, es el grado de disociación de los grupos hidroxilo el factor más importante en los valores relativos de actividad antioxidante, siendo la posición de los -OH en la molécula un factor secundario.

En lo que concierne al ácido gálico, el hidroxilo del grupo carboxílico se encuentra disociado a ambos valores de pH, uno de los -OH fenólicos no está disociado en absoluto y los grados de disociación de los otros dos hidroxilos fenólicos son muy parecidos a los del 2,5DHB. El ácido gálico es mucho más antioxidante que los dihidroxibenzaldehídos a ambos valores de pH estudiados, lo cual se encuentra probablemente ligado, además de a la presencia de tres grupos hidroxilo disociados, al grupo -OH adicional unido al anillo comparado con los dihidroxibenzaldehídos.

En resumen, los resultados muestran que el pH al que se realizan los ensayos de capacidad antioxidante es muy importante desde la perspectiva de la disociación de los grupos hidroxilo, debido a las diferencias en los valores de las constantes de disociación de los diferentes isómeros. Por esta razón, si se quiere conocer la posible acción antioxidante de una molécula (o alimento, extracto, bebida, etc.) en un organismo vivo, el ensayo debe realizarse en las condiciones más próximas posible al medio fisiológico, esto es, en medio acuoso de fuerza iónica media-alta y a pH 7-7.5, como en el ensayo

Capítulo 3

CUPRAC-AOA [29]. El ensayo DPPH se realiza en metanol, un medio no acuoso, y los ensayos voltamétricos sobre mercurio utilizando oxígeno o peróxido de hidrógeno, en todas sus variantes, se realizan a pH básico y en el caso de las medidas por DPV a un 30% de etanol [18, 41]. Estos ensayos, aunque dan una perspectiva de las diferencias de la capacidad antioxidante entre moléculas muy distintas, pueden llevar a conclusiones erróneas para moléculas de la misma familia.

En esta línea, se puede concluir que la capacidad antioxidante de los derivados fenólicos parece estar relacionada intrínsecamente con el número de hidroxilos en la molécula. Así, cuando el número de grupos –OH en las moléculas es el mismo, la extensión de la disociación de cada grupo en unas condiciones determinadas es esencial, mientras que las posiciones de estos grupos en el anillo aparece como un factor secundario.

3.4.3. Mecanismo de oxidación del 2,5-dihidroxibenzaldehído sobre GCE

En voltametría cíclica de barrido lineal de potencial sobre GCE, el 2,5DHB a la concentración $1 \cdot 10^{-3}$ M presenta hasta tres picos de oxidación y uno de reducción dependiendo del número de ciclos registrado como se muestra en la **Figura 3.36**.

El primer ciclo del voltagrama muestra uno o dos picos de oxidación, *Pico 1* y *Pico 2*, el segundo a potenciales más positivos que el primero (esto solamente en medios básicos), y un pico de reducción, *Pico 3'*, a potenciales menos positivos que el pico 1. En el segundo ciclo aparece un pico adicional de oxidación, *Pico 3*, a potenciales más positivos que el pico 3'.

Los picos 1 y 3' aparecen en todo el rango de pH estudiado; el pico 2 lo hace a partir de pH 8; finalmente el pico 3 no aparece a pH < 1.5 ni a pH > 10.

Como puede verse en la **figura 3.36**, las intensidades del pico 3 dependen del pH de forma aparentemente aleatoria. Se podría pensar que el pico 3 y el 3' forman un sistema similar al que se vio para el sesamol. Para comprobar esta suposición, se realizaron experimentos de voltametría cíclica en la zona de potenciales del sistema 3-3', previa preelectrolisis durante un corto tiempo (del orden de segundos) a un potencial posterior al pico 1.

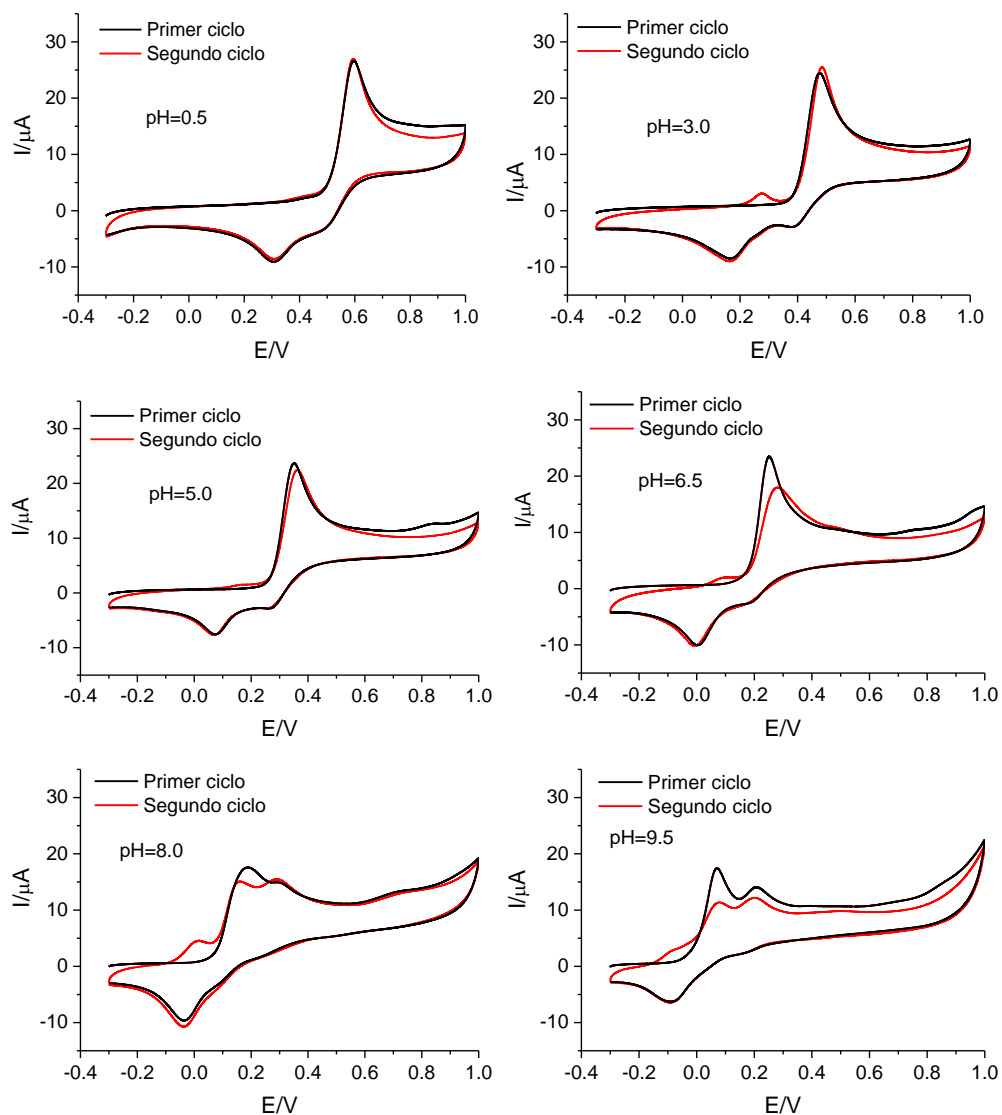


Figura 3.36. Voltagramas cíclicos de los dos primeros ciclos a distintos valores de pH. 2,5DHB $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L, v : 0.1 V/s.

El proceso de oxidación al potencial del pico 3 debe ser diferente al del 2,5DHB del pico 1, puesto que aparece a un potencial más bajo que éste. Si fuese 2,5DHB, no aparecería un nuevo pico. Para investigar el posible proceso que ocurre a estos potenciales, se ha aplicado un potencial constante a un valor posterior al pico 1, durante tiempos de deposición t_d . A continuación, se han registrado voltagramas en la ventana

de potenciales correspondientes a los picos 3-3', en el sentido reducción-oxidación. En la **figura 3.37**, se muestran resultados a diferentes velocidades de barrido.

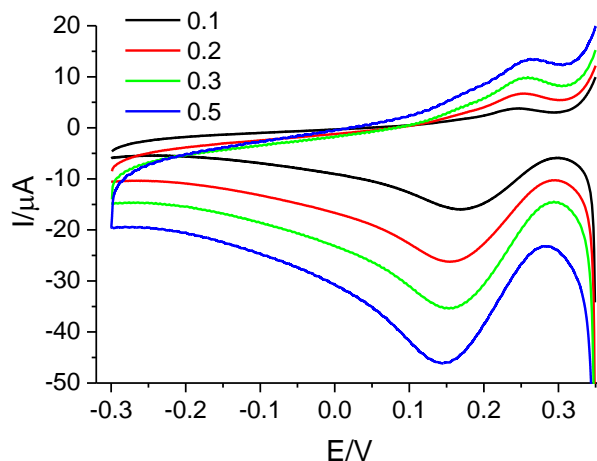


Figura 3.37. Voltagramas cíclicos del sistema 3-3' de 2,5DHB $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L tras la deposición a 0.600 V y un tiempo de deposición de 10 s. Las velocidades de barrido (en V/s) se dan en la figura. Potencial de inicio del barrido 0.350 V. pH = 3.80.

En otro conjunto de experimentos se obtuvieron voltagramas en las mismas condiciones, pero en la secuencia oxidación-reducción. En la **figura 3.38**, se muestran algunos resultados en función de la velocidad de barrido.

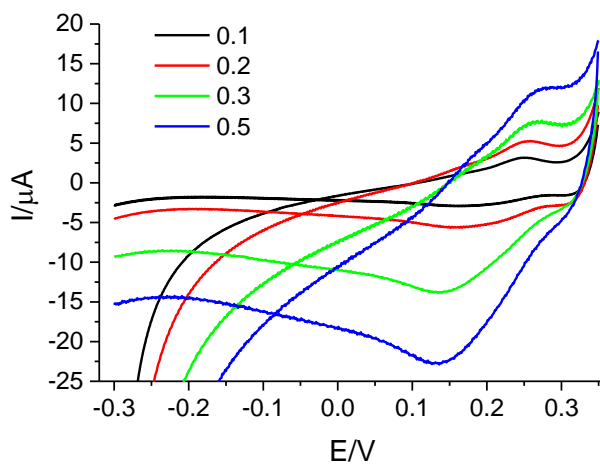


Figura 3.38. Voltagramas cíclicos del sistema 3-3' de 2,5DHB $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L tras la deposición a 0.600 V y un tiempo de deposición de 10 s. Las velocidades de barrido (en V/s) se dan en la figura. Potencial de inicio del barrido -0.300 V. pH = 3.80.

Los dos conjuntos de experimentos mostraron resultados diferentes. En la **Figura 3.39** se muestra la comparación a baja velocidad de barrido para ambas situaciones.

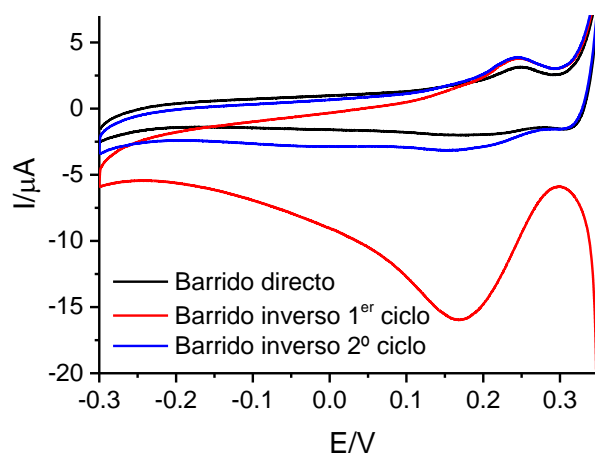


Figura 3.38. Voltagramas cíclicos del sistema 3-3' de 2,5DHB $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L tras la deposición a 0.600 V y un tiempo de deposición de 10 s a 0.1 V/s. pH = 3.80.

El barrido directo presenta el pico 3 de oxidación y ninguno de reducción, aun cuando se ha acumulado el producto de oxidación del pico 1 sobre el electrodo. El barrido inverso, en su primer ciclo, presenta el pico 3', hacia intensidades negativas, debido a la reducción del producto de oxidación del pico 1, el cual cae prácticamente a cero en el segundo ciclo. El pico 3 que aparece en ambos ciclos es prácticamente idéntico al que se obtiene en el barrido directo.

Además, se han realizado experimentos cambiando el tiempo de deposición. Los potenciales de pico permanecieron prácticamente independientes de este tiempo. En la **Figura 3.39** se presenta la dependencia de las intensidades de pico con el tiempo de deposición a pH 2, aunque los resultados fueron similares a otros valores de pH.

La intensidad de pico del pico 1 disminuye ligeramente con el tiempo de deposición, mientras que el pico 3 incrementa claramente su intensidad al aumentar este tiempo, señal inequívoca de que se acumula material en la superficie del electrodo conforme se lleva a cabo la electrolisis parcial del 2,5DHB. Esta acumulación disminuye el área efectiva del electrodo y es la responsable de la ligera disminución de intensidad del pico 1. Por otro lado, el pico de reducción aumenta ligeramente de intensidad, lo cual es compatible con la reducción del producto de oxidación que hay en la capa de difusión y el acumulado en la superficie del electrodo.

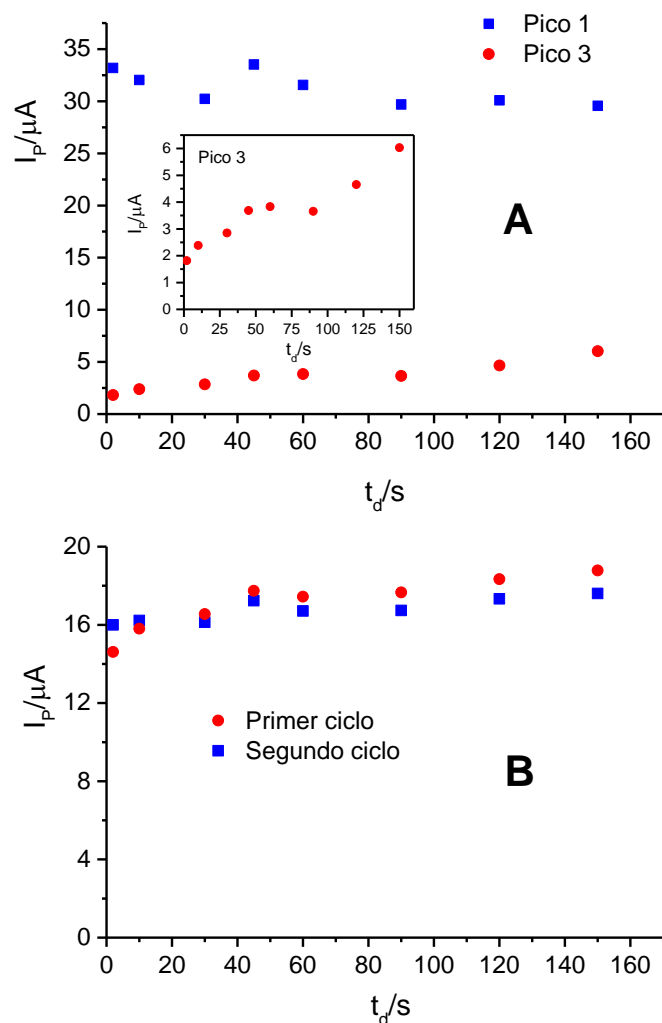


Figura 3.39. Voltametría cíclica del sistema 3-3' de 2,5DHB $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L tras la deposición a 0.600 V, pH=2.00, y $v= 0.1$ V/s. Dependencia de las intensidades de pico con el tiempo de deposición. A) Picos de oxidación 1 y 3. B) Pico de reducción 3'.

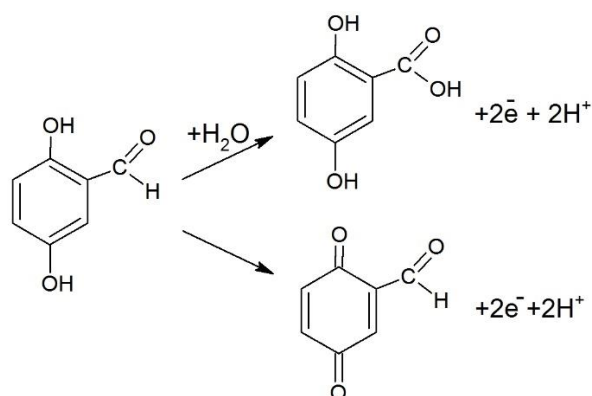
Estos resultados indican que los picos 3 y 3' no forman un par redox, como sucedía en el caso del sesamol. La única opción posible es que el pico 3 esté originado por procesos de adsorción sobre el electrodo debido a la acumulación de material sobre el mismo al potencial de deposición.

En apoyo de esta hipótesis, para el pico 3, las intensidades de pico varían de forma lineal con la velocidad de barrido, lo que indica que el voltograma es debido a un proceso

completamente heterogéneo [29] probablemente originado por el producto de la oxidación obtenido a los potenciales del pico 1.

Se trata a continuación de establecer el proceso global de oxidación que tiene lugar a los potenciales del pico 1. Para ello se necesita conocer el producto de oxidación y el número de electrones implicados en el proceso global, que debe ser compatible con dicho producto.

Dada la estructura del 2,5DHB, las reacciones de oxidación más simples que pueden darse en medio acuoso son las que se muestran en el **Esquema 3.8**.



Esquema 3.8. Posibles productos de oxidación del 2,5DHB en medios acuosos.

Es decir, se puede oxidar el grupo aldehído al correspondiente ácido carboxílico, o bien el anillo a la correspondiente quinona, como en el caso del sesamol.

Se han realizado experimentos para comprobar si el producto de la oxidación es el ácido. Se han registrado voltagramas cíclicos del 2,5DHB y del correspondiente ácido carboxílico, así como de su mezcla, en las mismas condiciones experimentales. Los resultados se muestran en la **Figura 3.40**.

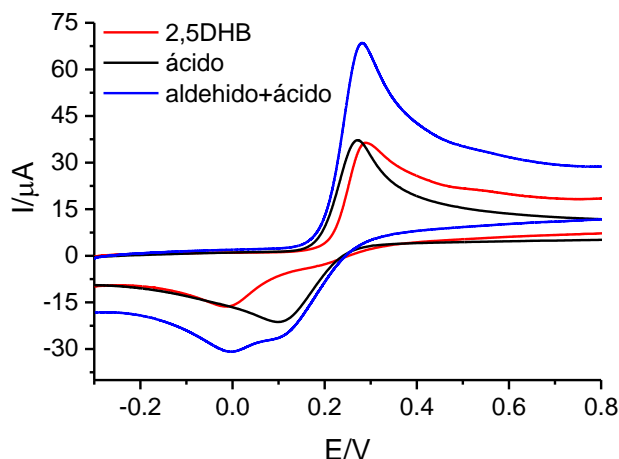


Figura 3.40. Voltagramas cíclicos de 2,5DHB y el correspondiente ácido carboxílico, ambos $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L, así como una disolución conjunta de los dos, a pH 2.00. $v = 0.1$ V/s.

El ácido 2,5-dihidroxibenzoico es electroactivo y su oxidación se da a potenciales menores que los del 2,5DHB. Esto quiere decir que, si el aldehído se oxidase al ácido, a los potenciales del pico el proceso de oxidación proseguiría y el pico del aldehído sería sensiblemente mayor que el del ácido (aproximadamente el doble, si el número de electrones implicados en la oxidación del ácido fuese de 2), contrariamente a lo que se observa.

Además, el pico de reducción del aldehído aparece a potenciales diferentes que el ácido, además de tener diferente intensidad. Si el ácido fuese el producto de oxidación, en el registro de la disolución que contiene ambos componentes el pico de reducción simplemente incrementaría su intensidad, lo que es contrario a lo encontrado experimentalmente.

Por tanto, se puede descartar que la oxidación del 25DHB implique al grupo aldehído, por lo que se pasa a continuación a explorar la segunda posibilidad, esto es, que la oxidación ocurra sobre el anillo para dar una quinona.

Se han registrado voltagramas cíclicos del 2,5DHB y de la 1,4-dihidroquinona, en las mismas condiciones experimentales. Los resultados se muestran en la **Figura 3.41**.

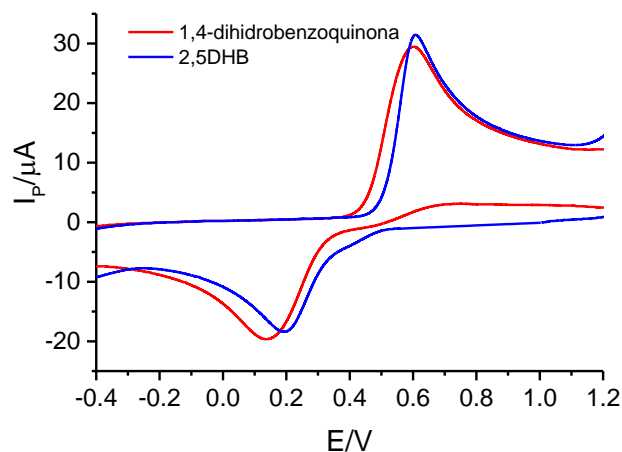


Figura 3.41. Voltagramas cíclicos de 2,5DHB y la 1,4-dihidroquinona , ambos $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L a pH 1.30. $v = 0.1$ V/s.

La oxidación del 2,5DHB es muy similar a la de la dihidroquinona, tanto en los potenciales como en las intensidades y morfología de los picos de oxidación y reducción.

Aunque los picos de oxidación tienen intensidades muy similares, como ya se ha dicho anteriormente, la intensidad de pico depende del mecanismo de la reacción redox, por lo que de nuevo se utilizará la voltametría de convolución para la comparación.

La **Figura 3.42** muestra que las corrientes límite de los voltagramas convolucionados correspondientes al sesamol, al 2,5DHB, y a la 1,4-dihidroquinona son muy parecidas. Las pequeñas diferencias se deben a las diferencias de coeficientes de difusión. Como se ha visto que para el sesamol y el sistema quinona-hidroquinona se intercambian dos electrones, a los potenciales del pico 1 se intercambian dos electrones en el proceso global.

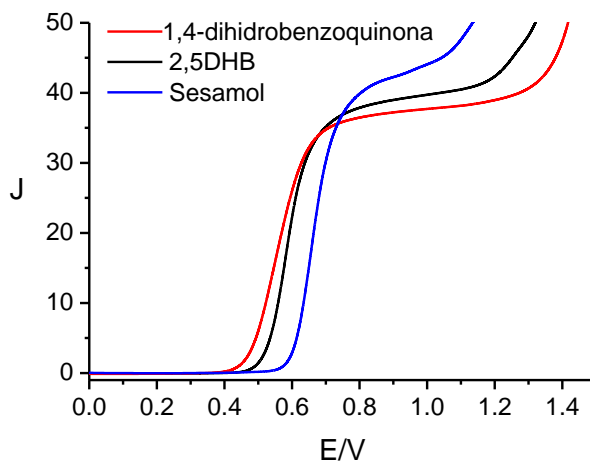


Figura 3.42. Voltagramas convolucionados de los picos de oxidación de sesamol, 2,5DHB, y 1,4-dihidroquinona, todos $1 \cdot 10^{-3}$ M, a pH=1.30 y $v=0.1$ V/s.

Para reforzar esta conclusión, se han realizado electrolisis a potenciales más positivos que el pico 1. La **Figura 3.43** muestra espectros obtenidos a lo largo de la electrolisis.

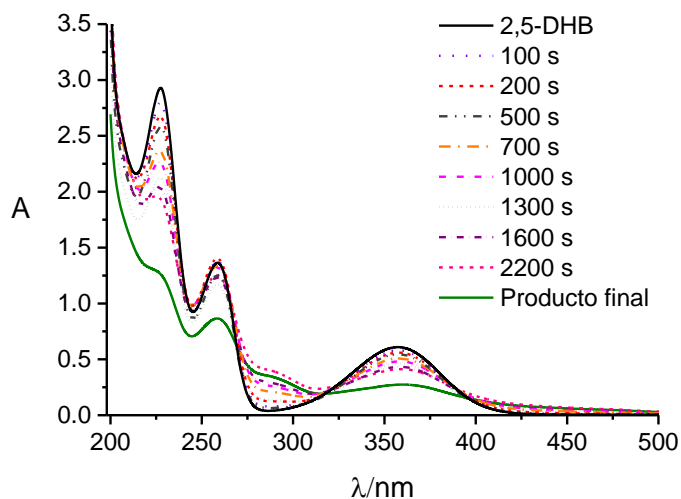


Figura 3.43. Espectros UV-Vis de 2,5DHB $1.0 \cdot 10^{-3}$ M electrolizada a diferentes tiempos (en la figura) a pH 1.52 $E_{\text{electrolisis}}=0.700$ V.

El espectro UV-Vis al final de la electrolisis semejante al registrado para el producto de electrolisis del sesamol, muy diferente del obtenido para el 2,5DHB, y muestra las tres bandas características del anillo de 1,4-benzoquinona [28], centradas a 360 nm, 290 nm y 260 nm, en este caso. Además, se ha comparado el espectro del producto final con el del ácido 2,5-dihidroxibenzoico, como se muestra en la **Figura 3.44**.

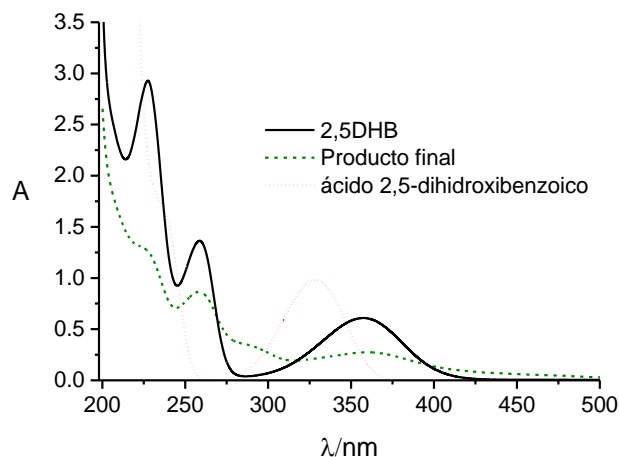


Figura 3.44. Comparación de los espectros UV-Vis del 2,5DHB, el producto de electrolisis y el ácido 2,5-dihidroxibenzoico a pH 1.52 $E_{\text{electrolisis}}=0.700$ V.

Como puede verse, el espectro del producto final es muy diferente del obtenido en las mismas condiciones para el ácido, lo que reafirma las conclusiones anteriores.

El número de electrones que intervienen en el proceso de oxidación se obtuvo de la pendiente de la representación de la carga que pasa durante la electrolisis vs. los moles de 2,5DHB oxidado. Esto se muestra en la **Figura 3.45**, para la cual la pendiente de la recta es de 2.05, por lo que se confirma que el proceso global es bielectrónico.

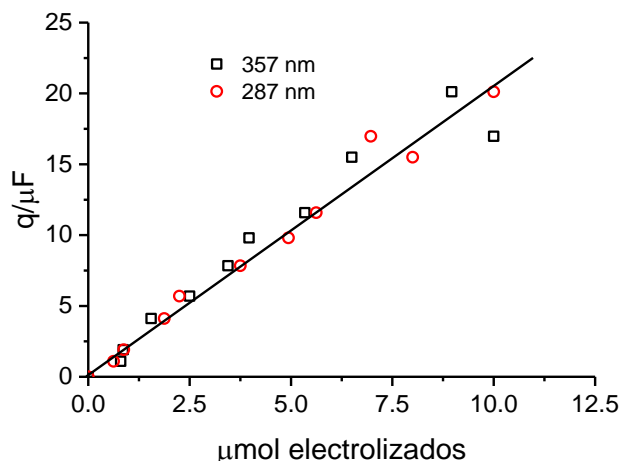


Figura 3.45. Dependencia de la carga con la cantidad de 2,5DHB convertida en la electrolisis de una disolución $1.0 \cdot 10^{-3}$ M a pH 1.52. $E_{\text{electrolisis}}=0.700$ V.

Todos estos hechos y conclusiones indican que el proceso global de oxidación a los potenciales del pico 1 corresponde a la opción de la parte inferior del **esquema 3.8** (ver página 143). Se trata a continuación de caracterizar el mecanismo de oxidación a dichos potenciales.

La **Figura 3.46** muestra algunos voltagramas a diferentes valores de pH. Como puede observarse, en medio básico el pico de oxidación que aparece a potenciales menos positivos (pico 1) se desdobra en dos picos que tiene aproximadamente la misma intensidad a valor de pH suficientemente altos.

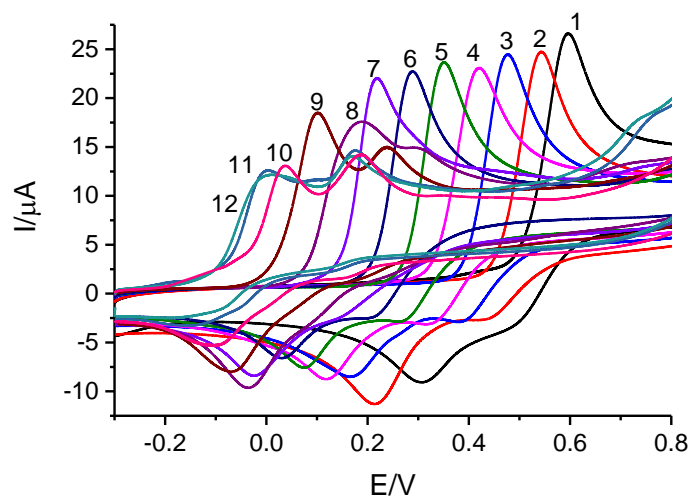


Figura 3.46. Voltagramas cíclicos del primer ciclo en función del pH (indicado en la figura). 2,5DHB $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L, v : 0.1 V/s.

En la **Figura 3.47** se muestran las dependencias de los potenciales de pico con el pH. Para el pico 1 se observan dos tramos lineales, el primero con una pendiente de -59 mV/pH a valores de $\text{pH} < 11$, mientras que en medios más básicos el potencial de pico es independiente del pH. Lo mismo sucede para el pico 2, aunque en este caso la pendiente del primer tramo lineal es de -63 mV/pH.

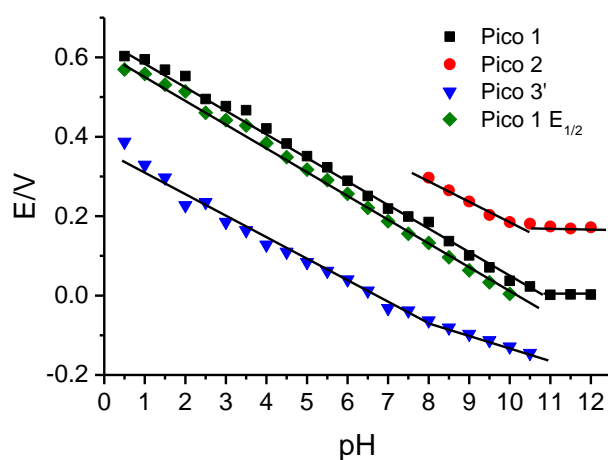


Figura 3.47. Dependencia de los potenciales de pico y del potencial de onda media (voltametría de convolución) en función del pH. 2,5DHB $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L, v : 0.1 V/s.

Capítulo 3

En cuanto al pico de reducción 3', las pendientes fueron -58 mV/pH y -30 mV/pH , para valores de pH menores y mayores que 8.2, respectivamente.

Recuérdese que los valores de pK para los grupos $-\text{OH}$ del 2,5DHB que se han obtenido por medidas espectrofotométricas son de 8.4 y 10.9. Los puntos de corte de las rectas mostradas en la **Figura 3.47** parecen estar relacionados con estos valores.

En la **Figura 3.48** se muestran las dependencias de las intensidades de pico con el pH. Por debajo de pH 7, las intensidades de los picos 1 y 3' (oxidación y reducción, respectivamente) son independientes del pH, mientras que en medios básicos hay una disminución de intensidad con el pH asociada a las reacciones de disociación. El pico 2 tiene siempre una intensidad muy similar a la del pico 1.

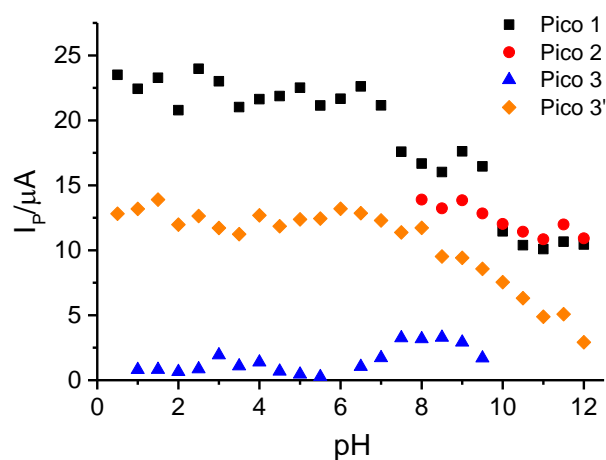


Figura 3.48. Intensidades (voltametría cíclica) en función del pH. 2,5DHB $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$. $v = 0.1 \text{ V/s}$.

Cuando, a la concentración de 2,5DHB $1 \cdot 10^{-3}$ y a $\text{pH} < 8$, se aumenta la velocidad de barrido aparece un nuevo pico de reducción, 1' como se puede observar en la **Figura 3.49**.

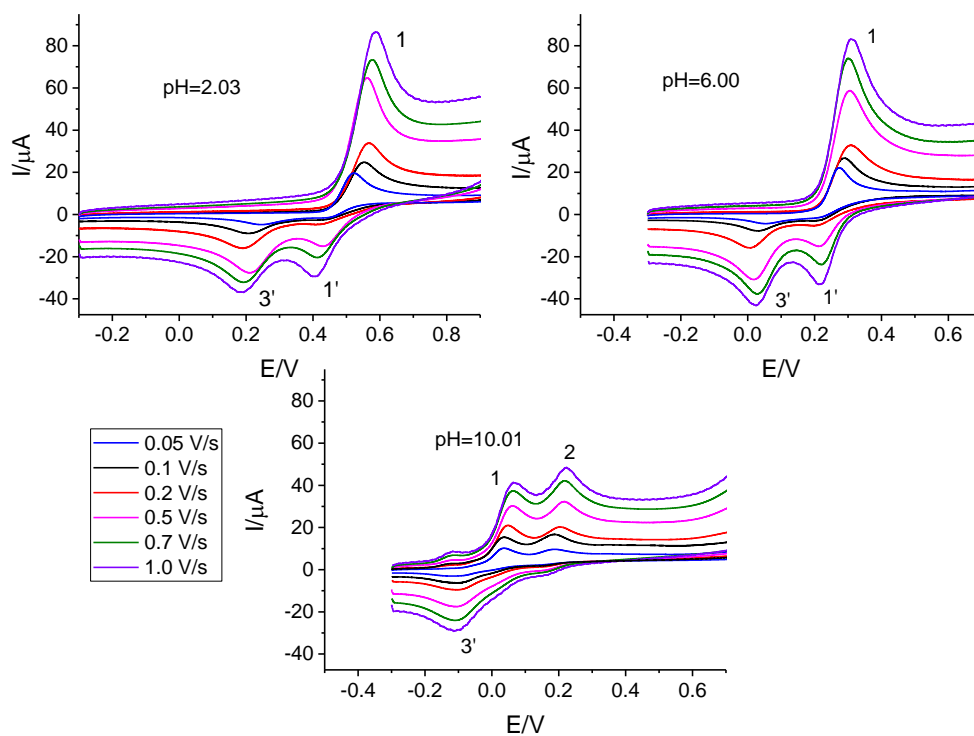


Figura 3.49. Voltagramas cíclicos del primer ciclo en función de la velocidad de barrido (indicada en la figura). 2,5DHB $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L.

Este pico está claramente asociado a un proceso puramente heterogéneo, como lo indica la dependencia lineal de su intensidad de pico con la velocidad de barrido reflejada en la **Figura 3.50**. En realidad, este pico debe ser el complementario del pico 3'.

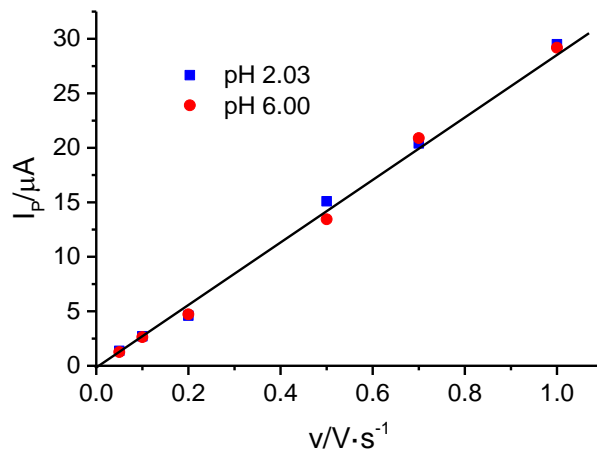


Figura 3.50. Voltametría cíclica (primer ciclo) de 2,5DHB $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L Pico de reducción 1'. Representación de la intensidad de pico frente a la velocidad de barrido.

Por otro lado, la función de corriente (razón entre la intensidad de pico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido) es aproximadamente independiente de la velocidad de barrido para los picos de oxidación 1 y 2, y disminuye con esta variable para el pico de reducción a $pH < 7$, como se muestra en la **Figura 3.51**.

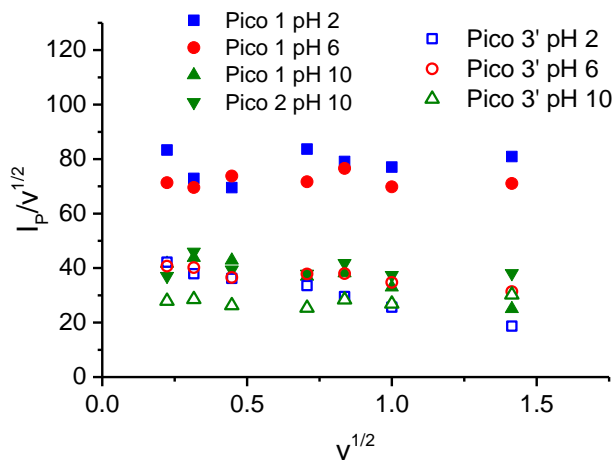


Figura 3.51. Voltametría cíclica (primer ciclo) de 2,5DHB $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L. Representación de la función de corriente frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

Estos resultados son compatibles con que los procesos de oxidación a los potenciales de los picos 1 y 2 se encuentran controlados principalmente por difusión, así como para el pico de reducción en medios básicos, mientras que para la reducción a $\text{pH} < 7$ hay alguna reacción química previa a las transferencias electrónicas.

Por otro lado, en la **Figura 3.52** se presentan las dependencias de los potenciales de pico con la velocidad de barrido. Las pendientes de las representaciones del potencial de pico frente al logaritmo de la velocidad de barrido se dan en la **Tabla 3.3**.

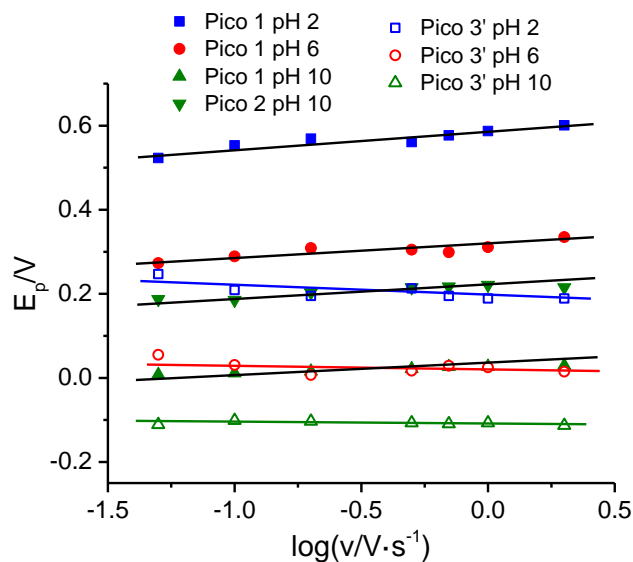


Figura 3.52. Voltametría cíclica (primer ciclo) de 2,5DHB $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L. Representación de los potenciales de pico intensidad de pico frente al logaritmo de la velocidad de barrido.

pH	Pico 1	Pico 2	Pico 3'
2.03	30.0	-	-20.4
6.00	32.2	-	-15.2
10.01	20.3	16.5	-8.3

Tabla 3.3. Valores de las pendientes (en mV) de las rectas mostradas en la figura 3.51.

En la **Figura 3.53** se presentan voltagramas cíclicos a pH 2.0 y diferentes valores de concentración.

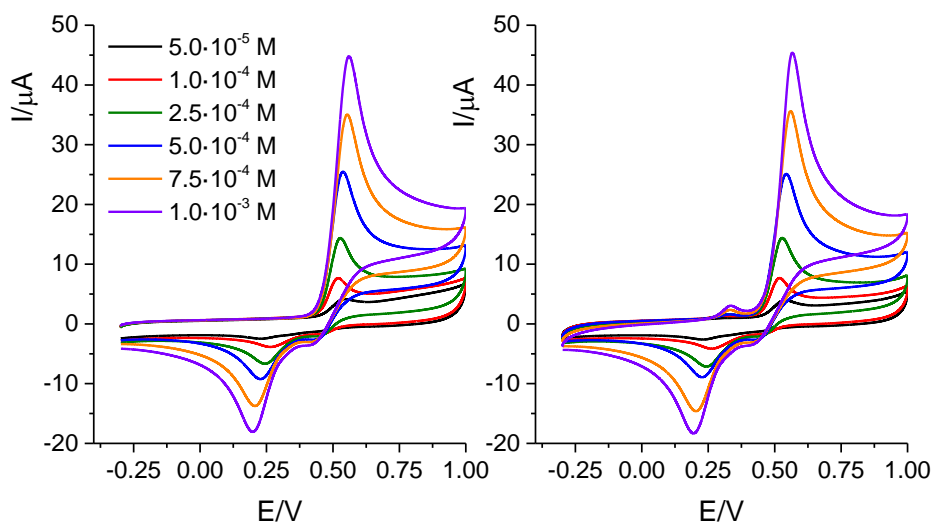


Figura 3.53. Voltagramas cíclicos a diferentes concentraciones de 2,5DHB a pH 2.0 y 0.1 V/s. Izquierda: primer ciclo. Derecha: segundo ciclo.

En la **Figura 3.54** se muestran las dependencias de las intensidades de pico con la concentración a pH 2.0. Estas variaciones fueron similares en el resto de los valores de pH investigados (pH 6 y pH 10).

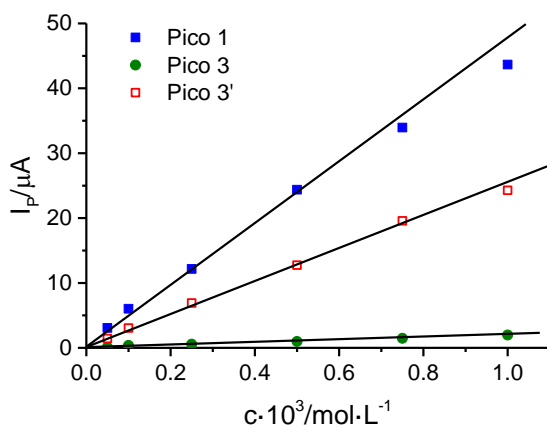


Figura 3.54. Dependencia de las intensidades de pico con la concentración para 2,5DHB a pH 2.0 y 0.1 V/s.

Los potenciales de pico en todos los casos fueron prácticamente independientes de la concentración de 2,5DHB o, en todo caso, presentaron variaciones muy escasas, del orden de pocos mV por década de concentración.

Al igual que en el caso del sesamol, se ha procedido al análisis de los voltagramas convolucionados utilizando las funciones de la tabla 3.1. Como se puede observar en la **Figura 3.55**, a bajas velocidades de barrido el análisis del pico 1 como proceso reversible dio lugar a análisis lineales con pendientes próximas a $2.303RT/F$ (esto es, unos 0.059 V), mientras que los análisis con la función para procesos irreversibles fueron curvas.

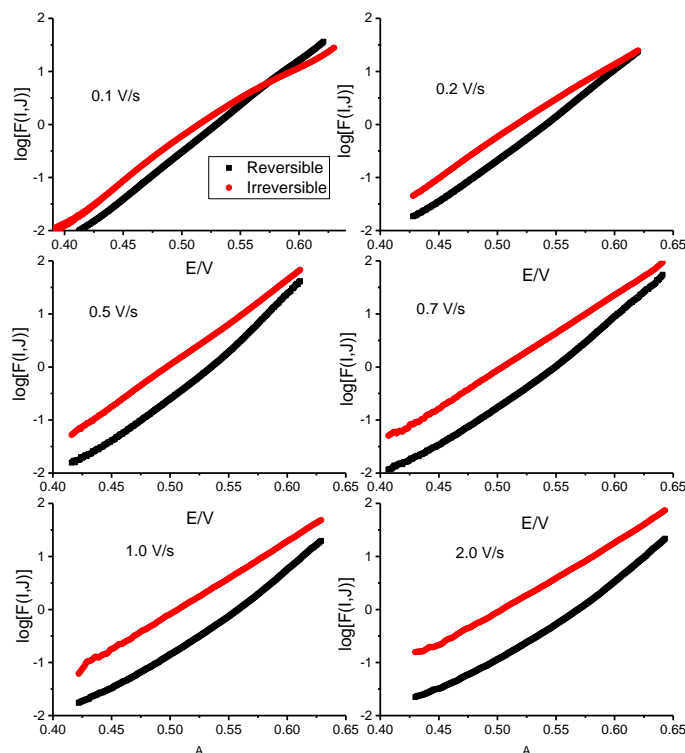


Figura 3.55. Análisis de convolución del primer ciclo del pico 1 de 2,5DHB $1 \cdot 10^{-3}$ M a pH=2.03.

Sin embargo, conforme aumenta la velocidad de barrido sucede lo contrario, esto es, se hacen más lineales los análisis como proceso irreversible. Esto es debido a que el pico 1 debe corresponder a un proceso cuasi-reversible, como ya se había deducido del hecho de que el pico de reducción es de menor intensidad y su potencial de pico se encuentra relativamente separado del pico de oxidación.

Lo expuesto anteriormente sucede a valores de pH por debajo de 7-7.5. En medios más básicos, los análisis del pico 2 fueron lineales con pendientes muy próximas a 0.059 V, utilizando la función correspondiente a procesos irreversibles o EC, como se muestra en la **Figura 3.56**.

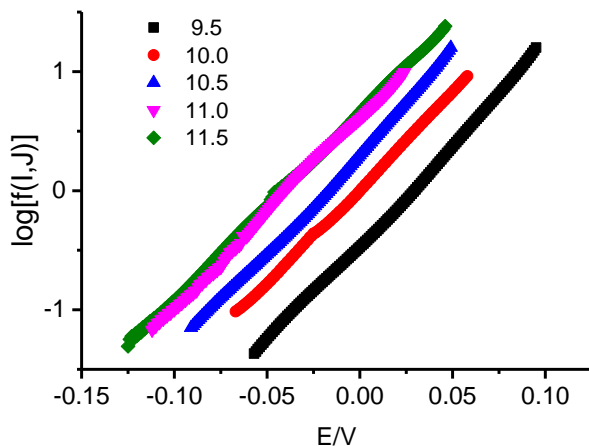


Figura 3.56. Análisis de convolución del primer ciclo del pico 1 de 2,5DHB $1 \cdot 10^{-3}$ M a pH=2.03, utilizando la función correspondiente a procesos E_i/EC .

En la **Figura 3.57** se muestran voltagramas convolucionados en diferentes condiciones experimentales.

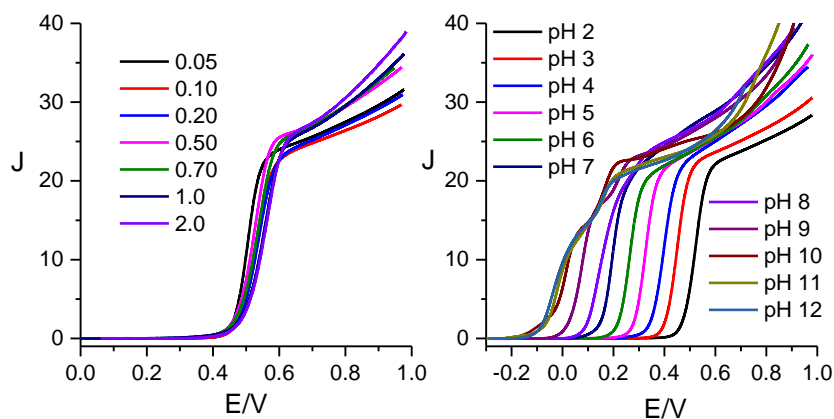


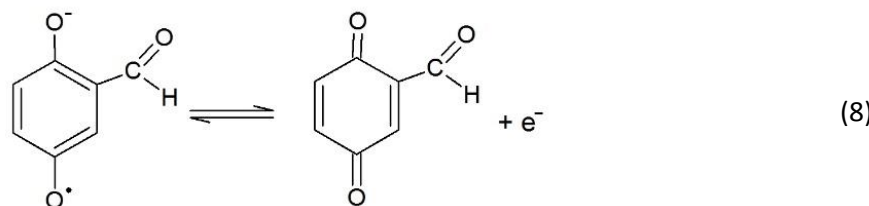
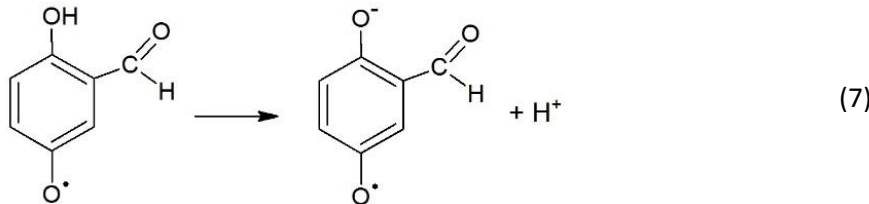
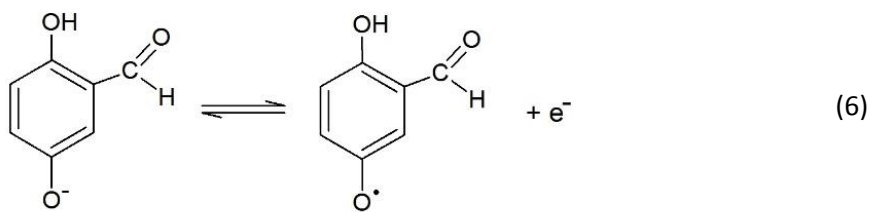
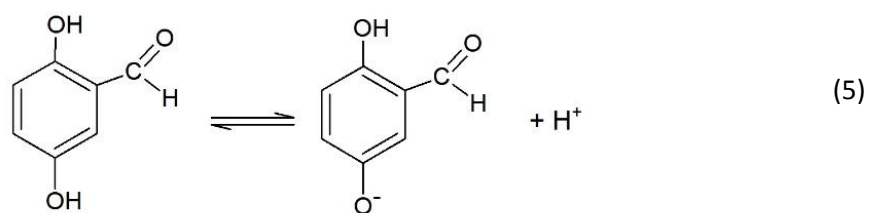
Figura 3.57. Voltagramas convolucionados del barrido de oxidación de 2,5DHB $1 \cdot 10^{-3}$ M. Izquierda: pH= 2.03, velocidades de barrido indicadas en V/s. Derecha: $v= 0.1$ V/s.

Como puede observarse, la intensidad límite convolucionada es independiente de la velocidad de barrido, como cabe esperar si los procesos están controlados por difusión, lo cual sugiere, como ya se ha apuntado, que la adsorción sobre el electrodo, de haberla, es débil.

En cuanto a la evolución con el pH, las intensidades límites de los voltagramas convolucionados permanecen constantes hasta pH 8, disminuyendo a partir de este valor, a medida que aparece una segunda onda correspondiente al pico 2. En medios básicos la intensidad límite del voltagrama convolucionado correspondiente al pico 1 es aproximadamente la mitad que la obtenida para el mismo pico a pH < 7.

Además, las intensidades límites convolucionadas varían linealmente con la concentración de 2,5DHB.

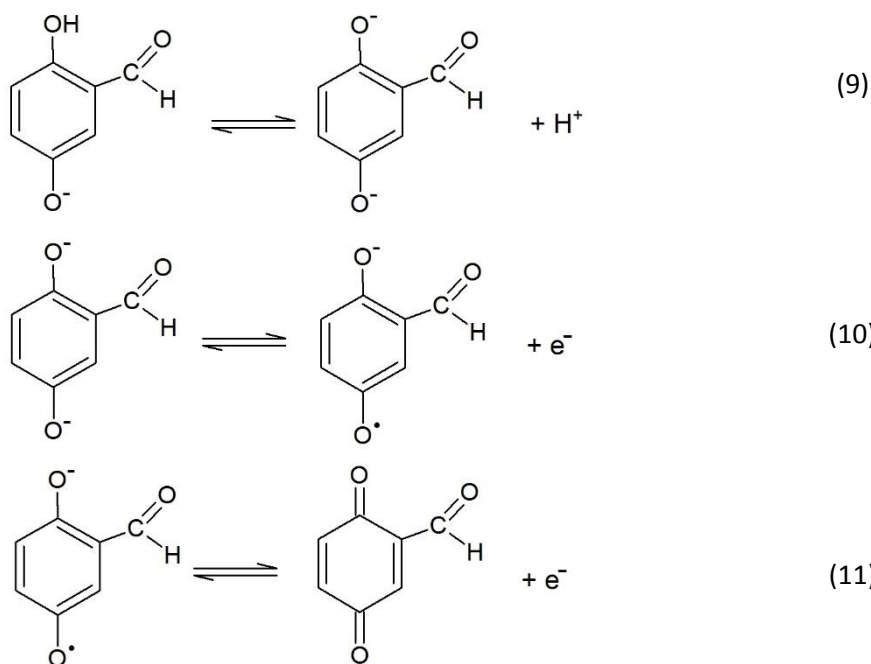
Con todos estos datos se puede proponer el siguiente esquema para la oxidación a potenciales correspondientes al pico 1 y a valores de pH por debajo del primer pK de disociación:



Esquema 3.9. Primer pico. Mecanismo de oxidación a pH < pK₁.

La transferencia electrónica mostrada en la etapa 6 es reversible o cuasi-reversible, siendo la e.d.v. la etapa 7. Esta secuencia de reacciones corresponde a un proceso total bielectrónico de primer orden con respecto a la concentración de 2,5DHB, y también de primer orden (en realidad orden -1) con respecto a la concentración de H^+ , por lo que la dependencia del potencial de pico con el pH (o del $E_{1/2}$ de los voltagramas convolucionados como puede verse en la **Figura 3.47**) debe ser de $-2.303RT/F \approx -0.059$ V por unidad de pH (a 25 °C). Los resultados experimentales están de acuerdo con los que se deducen de este esquema.

A valores de pH más altos que el pK_1 , pero más bajos que el pK_2 (esto es entre pH 8.4 y 10.9) la reacción 5 no tiene lugar y, si el esquema de reacción se mantiene, el potencial de pico del pico 1 debería ser independiente del pH y además sólo habría un pico de oxidación. Sin embargo, hay una disminución de la intensidad de pico en este intervalo de pH, lo cual debe estar asociado a la reacción 5. Por otro lado, la variación del potencial de pico con el pH indica que hay el intercambio de un ion H^+ antes de la e.d.v. del proceso, y los análisis del pico 1 indican que hay una transferencia monoeléctrica reversible o cuasi-reversible. Esto solamente es posible si en este intervalo de pH cambia la especie electroactiva, con pérdida previa de un ion H^+ , como se muestra en el **Esquema 3.10**.



Esquema 3.10. Primer pico. Mecanismo de oxidación a $pK_1 < pH < pK_2$.

La oxidación del dianión se daría a potenciales muy parecidos a los del monoanión, por lo que no se observaría una discontinuidad en la dependencia del potencial de pico con el pH. El proceso sería ahora tipo CEE, esto es, dos transferencias monoelectrónicas (etapas 10 y 11) que ocurren a potenciales diferentes, precedidas por una etapa química rápida. En este caso, las etapas 9 y 10 corresponden al pico 1 y la etapa 11 al pico 2.

A $\text{pH} > \text{pK}_2$, esto es, en medios muy básicos, el proceso pasa a ser del tipo EE, desaparece la reacción 9, y no interviene ningún ion H^+ en el proceso, por lo que los potenciales de pico no dependen del pH.

El proceso correspondiente al pico de reducción debe partir del producto (la 1,4-quinona sustituida) y dar la correspondiente 1,4-dihidroquinona sustituida, esto es, el 2,5DHB, por lo que el proceso debe ser bielectrónico. El punto de inflexión en la representación del potencial de pico con el pH se corresponde aproximadamente con el primer pK de disociación. Como la pendiente del potencial de pico con el pH es de -30 mV a $\text{pH} > \text{pK}_1$, -60 mV por debajo de este valor y, además, en el proceso global están implicados dos iones H^+ , el mecanismo debe ser parecido al inverso del esquema 5-8, con diferencias en la e.d.v. o en la secuencia de las reacciones. Desafortunadamente no se dispone de datos suficientes para proponer un mecanismo de reducción.

Capítulo 3

3.5. Bibliografía

- [1] T. M. Alligrant, J. C. Hackett, J. C. Alvarez, *Electrochim Acta* 55 (2010) 6507-6516.
- [2] S. Steenken, *J. Phys. Chem.* 83 (1979) 595-599.
- [3] N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman, *Food Chem.* 99 (2006) 191-203.
- [4] A. Valenzuela, S. Nieto, B. K. Cassels, H. Speisky, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68 (1991) 935-937.
- [5] R. Blomhoff, *Curr. Opin. Lipidology* 16 (2005) 47-54.
- [6] D. Lawlor, *International Journal of Epidemiology* 34 (2005) 715-716.
- [7] A. Bendini, T. G. Toschi, G. Lercker, *Industrie Alimentari* 40 (2001) 525-529.
- [8] M. P. Kähkönen, A.I. Hopia, H. J. Vuorela, J. P. Rauha, K. Pihlaja, T. S. Kujala, M. Heinonen, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 3954-3962.
- [9] A. Cano, *Phytochem. Anal.* 9 (1998) 196-202.
- [10] C. Sánchez-Moreno, J. A. Larrauri, F. Saura-Calixto, *J. Sci. Food Agric.* 76 (1998) 270-276.
- [11] C.S. Moreno, *Food Sci. Technol. Int.* 8 (2002) 121-137.
- [12] M. Serafini, D.D. Rio, *Redox Report* 9 (2004) 145-152.
- [13] P. A. Kilmartin, H. Zou, A. L. Waterhouse, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 1957-1965.
- [14] R. Bortolomeazzi, N. Sebastianutto, R. Toniolo, A. Pizzariello, *Food Chem.* 100 (2007) 1481-1489.
- [15] M. Abou Samra, V. S. Chedea, A. Economou, A. Calokerinos, P. Kefalas, *Food Chem.* 125 (2011) 622-629.
- [16] K. E. Yakovleva, S. A. Kurzeev, E. V. Stepanova, T. V. Fedorova, B. A. Kuznetsov, O. V. Koroleva, *Appl. Biochem. Microbiol.* 43 (2007) 661-668.
- [17] S. Chevion, M. A. Roberts, M. Chevion, *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000) 860-870.

- [18] A. Palma, M. Ruiz Montoya, J. F. Arteaga, J. M. Rodríguez Mellado, *J. Electrochem. Soc.* 160 (2013) H213-H218.
- [19] G. Fauler, H. J. Leis, J. Schalamon, W. Muntean and H. Gleispach *J. Mass Spectrometry*, 31 (1996) 655-660.
- [20] ACD/pK_a, <http://www.acdlabs.com/products/percepta/predictors/pKa/>
- [21] P. S. Guin, S. Das, P. C. Mandal, *Int. J. Electrochem.* 2011 (2011) Article ID 816202, <http://www.hindawi.com/journals/ijelc/2011/816202/abs/>
- [22] C. P. Andrieux, L. Nadjo, J. M. Savéant, *J. Electroanal. Chem.* 26 (1970) 147-186.
- [23] J. C. Imbeaux, J. M. Savéant, *J. Electroanal. Chem.* 44 (1973) 169-187.
- [24] J. M. Savéant, D. Tessier, *J. Electroanal. Chem.* 61 (1975) 251-263.
- [25] J. M. Savéant, D. Tessier, *J. Electroanal. Chem.* 77 (1977) 225-235.
- [26] D. B. Oldham, *Anal. Chem.* 44 (1972) 196-198.
- [27] G. D. Zoski, D. B. Oldham, P. J. Mahon, T. L. E. Menderson, A. M. Bond, *J. Electroanal. Chem.* 297 (1991) 1-17.
- [28] NIST Standard reference data, U.S. Secretary of Commerce, Vol. 69 (2011) <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C106514&Mask=400>.
- [29] R. S. Nicholson, I. Shain, *Anal. Chem.* 36 (1964) 706-723.
- [30] J. M. Rodríguez Mellado, *Ann. Chim.* 83 (1993) 279-283.
- [31] M. Ruiz Montoya, J. M. Rodríguez Mellado, *J. Electroanal. Chem.* 370 (1994) 183-187.
- [32] J. M. Rodríguez Mellado, M. Blázquez, M. Domínguez, J. J. Ruiz, *J. Electroanal. Chem.* 195 (1985) 263-270.
- [33] J. M. Rodríguez Mellado, M. Blázquez, M. Domínguez, J. J. Ruiz, *J. Electroanal. Chem.* 201 (1986) 237-246.
- [34] P. Andrieux, L. Nadjo, J. M. Savéant, *J. Electroanal. Chem.* 42 (1973) 223-242.
- [35] L. Nadjo, J. M. Savéant, *J. Electroanal. Chem.* 137 (1982) 149-157.

Capítulo 3

- [36] J. E. Cosano, A. M. Heras, L. Camacho, J. L. Avila, J. M. Rodríguez Mellado, *J. Electroanal. Chem.* 195 (1985) 321-334.
- [37] E. Muñoz, L. Camacho, J. L. Avila, A. M. Heras, J. J. Ruiz, *Bull. Soc. Chim. Belg.* 96 (1987) 255-263.
- [38] A. M. Heras, E. Muñoz, J. L. Avila, L. Camacho, *Electrochim. Acta* 32 (1987) 1495-1947.
- [39] R. Ortiz, M. J. Higuera, R. Marín Galvín, J. M. Rodríguez Mellado, *J. Electrochem. Soc.* 148 (2001) E419-E426.
- [40] J. F. Arteaga, M. Ruiz Montoya, A. Palma, G. Alonso Garrido, S. Pintado, J. M. Rodríguez Mellado, *Molecules* 17 (2012) 5126-5138.
- [41] A. Palma, M. Ruiz Montoya, J. F. Arteaga, J. M. Rodríguez Mellado, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 582-589.
- [42] R. Joshi, M. S. Kumar, K. Satyamoorthy, M. K. Unnikrisnan, T. Mukherjee, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 2696-2703.
- [43] R. Estévez Brito, J. M. Rodríguez Mellado, A. Palma, M. Ruiz Montoya, J. F. Arteaga, *J. Electrochem. Soc.* 161 (2014) H854-H859.
- [44] H.-F. Ji, H.-Y. Zhang, L. Shen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2006) 4095-4098.
- [45] A. C. Eslami, W. Pasanphan, B.A. Wagner, G. R. Buettne, *Chem. Central J.* (2010) 4:15.
- [46] M. Xia, R. Dempski, R. Hille, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 3323-3330.
- [47] J. A. Valderrama, J. Benites, M. Cortés, D. Pessoa-Mahana, E. Prina, A. Fournier, *Tetrahedron* 58 (2002) 881-886.
- [48] J. M. Rodríguez Mellado, M. Ruiz Montoya, *Gazz. Chim. Ital.* 120 (1990) 553-555.
- [49] R. Pérez, R. Marín Galvín, J. M. Rodríguez Mellado, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 67 (2002) 429-438.
- [50] R. P. Fraser, E. Suzuki, *The Use of Least Squares in Data Analysis, Physical Principles of Protein Chemistry. Part C*, S. J. Leach Ed., Academic Press Inc: New York, (1974) 301-355.
- [51] R. Apak, K. G. Güçlü, M. Özyürek, S. E. Çelik, *Microchim. Acta* 160 (2008) 413-419.

Summary:

In this chapter, the oxidation mechanisms of different antioxidants are investigated to explore their behaviors as antioxidants: sesamol, gallic acid, 2,4-dihydroxybenzaldehyde (2,4DHB) and 2,5-dihydroxybenzaldehyde (2,5DHB). These compounds act catching free radicals through the process named *radical scavenging*.

First, it was determined the dissociation constant of sesamol by the technique of UV-Visible (UV-Vis) spectroscopy, because it is very important to know the state of protonation of the molecules, both for its role in the reaction mechanism, and its behavior under physiological conditions. The facts that the UV-Vis spectra are modified with pH and the presence of isosbestic points imply that there are chemical species involved in acid-base reactions. The pK_a value obtained from the analysis of the dependence of the UV-Vis spectra of sesamol with the acidity of the medium was 10.1 ± 0.1 , corresponding to the dissociation of the hydroxyl group of the aromatic ring.

In the study of the oxidation of sesamol on Glassy Carbon Electrodes (GCE), two peaks in the oxidation sweep and a peak in the reduction, were observed. In the second sweep a new oxidation peak was obtained, related to the reduction and corresponding to a reversible peak system of the type of 1,4-benzoquinone. Based on these data, it can be confirmed that the process involves the transfer of two electrons.

At pH values below the pK_a (as physiological pH close to 7), the first step of the oxidation mechanism of sesamol consists the formation of an anion by the dissociation of the hydroxyl group of the aromatic ring. In the second step, the anion is stabilized by the breakdown of the dioxolane ring, adopting a structure of p-benzoquinone substituted by a methoxy radical. Then, this radical loses a second electron to generate a cation, this being the rate determining step, r.d.s. Finally, a OH^- is added to the obtained cation, coming from the hydroxyl ions present in the solution or from the water molecule as the pH is basic or neutral-acid, respectively.

At pH values above the pK_a , the dissociation of hydroxyl group of the aromatic ring does not occur, since the sesamol molecule is dissociated. As the pH increases, the oxidation peak potential shifts to less positive values, which means that the oxidation is easier and the electronic transfers are faster. So, the process becomes more reversible. Therefore, at $pH > pK_a$ the oxidation mechanism is quasi-reversible.

At very basic pH values the process becomes four-electron, and it can be proposed that the mono-substituted 1,4-benzoquinone, obtained as final product at not very basic pH values, is hydrolyzed by the action of a water molecule to give formaldehyde and 3-hydroxy-1,4-benzoquinone, which is then oxidized to the corresponding peroxide with the participation of another water molecule.

Capítulo 3

The antioxidant activity of sesamol measured by both the DPPH technique and cyclic voltammetry is medium-high. The radical scavenging capacity against ROS measured by differential pulse voltammetric oxidation of hydrogen peroxide is medium-low. This antioxidant character of sesamol can be attributed to the relative ease of break of the dioxolane ring, to originate the quinone. This last molecule is responsible for the antioxidant activity of sesamol.

The antioxidant activities of the dihydroxybenzaldehydes are determined by the measurement of the decrease in the differential pulse voltammetry, of the oxidation signal of hydrogen peroxide on a mercury electrode in the presence of increasing amounts of antioxidant. This experiment measures the interaction with radicals produced in the oxidation of H_2O_2 , which is a measure of antioxidant capacity for trapping radicals and ROS. The added volume is proportional to the concentration; the volume that decreases the peak area of oxidation of hydrogen peroxide an amount of 10% (V_{10}), is related to antioxidant activity, so that low values of V_{10} involve high antioxidant activity values. To express antioxidant activity, it was used the μ_{10} parameter, which is the inverse of V_{10} . Thus, high values of parameter μ_{10} imply high values antioxidant activity of the studied compound.

The results indicated that at higher pH values, a greater amount of antioxidant is required to achieve V_{10} . By this method, it was found that the compound with the highest antioxidant activity is Gallic Acid, and at value of pH = 10.5 the antioxidant capacity for 2,4DHB is about twice that for 2,5DHB. However, at pH 12.5 the antioxidant activities of both dihydroxybenzaldehydes are very similar (slightly less in the case of 2,5DHB). Thus it can be said that the pH at which the testing of antioxidant capacity is made is very important because it significantly affects dissociation of the hydroxyl groups, hence the importance of knowing the values of the dissociation constants of different isomers.

The pK_a values for Gallic Acid were found in the literature, whereas the corresponding values for the dihydroxybenzaldehydes were not found there, so they were experimentally determined by UV-Vis spectroscopy measurements. For 2,4DHB the pK_a values obtained were 6.94 ± 0.03 and 9.28 ± 0.03 , corresponding respectively to the dissociations of the hydroxyl groups at positions 4 and 2. For 2,5DHB the values of pK_a were 8.42 ± 0.03 and 10.93 ± 0.03 for the loss of H^+ ions of the hydroxyl groups at positions 5 and 2, respectively. For both dihydroxybenzaldehydes, the hydroxyl group in position 2 is dissociated at higher pH values. This can be explained by the formation of an intramolecular hydrogen bond with the adjacent carbonyl group, that stabilizes this $-OH$ group with respect to those found in positions 4 or 5.

These results confirm that at pH = 10.5 the hydroxyl group at the 4- position for 2,4DHB is completely dissociated and the degree of dissociation of hydroxyl group at 2-position is approximately 94%. For the 2,5-DHB the hydroxyl group at 5- position is completely

dissociated, but the degree of dissociation of hydroxyl group at 2-position is approximately 37%. That is, at pH = 10.5 the dianionic form of 2,4DHB is about twice more abundant than the dianionic form of 2,5DHB, and at this pH value, the antioxidant activity of the former is about twice that of the second. However, in more basic conditions, like at pH = 12.5 the two hydroxyl groups are completely dissociated for 2,4-DHB, and for 2,5-DHB the amount of dianion is about 97.5%, but the antioxidant activities of both are very similar. This indicates that the most important factor in the relative values of antioxidant activity is the dissociation degree of the hydroxyl groups, being secondary their position in the molecule.

Concerning the Gallic acid, the pK_a values are 4.0 (carboxyl group) and 8.7, 11.4 and >13 (hydroxyl groups). This compound is much more antioxidant than the dihydroxybenzaldehydes at the pH values studied, due to the presence of more hydroxyl groups in its structure, which can be oxidized, and at least one of them remains undissociated at these pH values.

In conclusion, the pH influences significantly on the value of the antioxidant capacity of a given compound. For molecules in food that are ingested by a living organism, the measures must be carried out in conditions as close as possible to the physiological medium (aqueous medium, $pH \approx 7-7.5$ and medium-high ionic strength).

It was also studied the oxidation mechanism of 2,5-DHB on GCE. The voltammograms of this compound showed up three oxidation peaks and one reduction peak, depending on the number of cycles recorded. The possible oxidation products of this molecule could be the 2,5-dihydroxybenzoic acid (due to oxidation of the aldehyde group) or formyl-p-benzoquinone (due to oxidation of biphenolic ring).

2,5-dihydroxybenzoic acid is also an electroactive compound, being its oxidation potential on GCE lower than the obtained for 2,5-DHB. So, if the aldehyde is oxidized to the acid at potentials corresponding to the main oxidation peak, the oxidation process must continue and the aldehyde peak would be significantly higher than the acid peak, which does not occur at all. In addition, the reduction peak of the aldehyde on the reverse sweep appears at different potential than that obtained for the acid and with a different intensity. If the oxidation product of 2,5 DHB were the acid, in the tests performed with a mixture of both compounds, the reduction peak must increase in intensity, contrary to that was obtained experimentally. In addition, the oxidation product of 2,5DHB and 2,5-dihydroxybenzoic acid were compared by UV-Vis spectrometry, concluding that the spectra were very different. Therefore, it can be ruled out that the oxidation of 2,5-DHB does not involve the aldehyde group.

With respect to the option in question of the formyl-p-benzoquinone, there has been observed a great similarity between the oxidation product of 2,5DHB with p-benzoquinone and the oxidation product of (potentials, intensities and morphology of

Capítulo 3

oxidation and reduction peaks) using the convolution voltammetry to compare the results. Small variations were observed, due only to differences in the diffusion coefficients and the low influence of the non hydroxylic substituents in the ring, being as in the case of sesamol and hydroquinone, a process in which two electrons are exchanged. The UV-Vis spectrum of the final product of electrolysis of 2,5-DHB shows the three characteristic bands of 1,4-benzoquinone ring, located at 360 nm, 290 nm and 260 nm. This way it can confirm that the oxidation product for 2,5-DHB is the formyl-p-benzoquinone.

Based on the electrochemical results and values of the dissociation constants it is concluded that at $\text{pH} < \text{pK}_1$ the mechanism involves a first step corresponding to the loss of a H^+ ion from the $-\text{OH}$ group in position 5, followed by a first quasi-reversible electronic transfer to give a radical, which losses a proton in a third step, corresponding to the r.d.s. Then, it takes place the second electron transfer to give the substituted 1,4-benzoquinone. At pH values higher than pK_1 but lower than pK_2 (pH 8.4-10.9), the electroactive species changes to the anion, which losses an ion H^+ to give the dianion. The process is now of CEE type, that is, two electron transfers occur at different potentials, preceded by a fast chemical step. A $\text{pH} > \text{pK}_2$ the process becomes of the EE type, and no H^+ ions are involved in the process.

CAPÍTULO IV

COMPOSICIÓN DE EXTRACTOS ALIMENTARIOS EN RELACIÓN CON LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

4.1. Introducción

El Té es la tercera bebida más consumida en el mundo, después del agua y el café, de ahí que sea de especial interés conocer su composición y sus propiedades. Se elabora con hojas de la planta “*Camellia Sinensis Sinensis*” estribando la diferencia entre cada tipo de té en el proceso que se aplica después de la cosecha. Es originaria de China, aunque hoy se cultiva en todo el mundo: China, Japón, India, Sri Lanka y Taiwán, e incluso hay países africanos productores, como Kenia.



Canasta de hojas de té en una plantación de “*Camellia Sinensis Sinensis*”

El Té Blanco está considerado como el más exquisito y refinado. En lugar de hojas enteras, se recogen a mano sólo los brotes más tiernos y jóvenes durante pocos días cada primavera. El vello blanco que recubre la hoja nada más nacer da nombre a esta variedad. Los brotes se extienden sobre grandes filtros donde se marchitan bajo ventilación controlada, y se secan con la ayuda de esta ventilación. Finalmente se secan a baja temperatura evitando romperlos, para no afectar su color o aroma.

El Té Negro es el más famoso y consumido en Reino Unido. Se elabora enrollando hojas cosechadas después de marchitarse, rompiendo las paredes celulares y ocasionando la pérdida del líquido celular. Se fermenta a 35-40 °C y el color verde original de las hojas pasa a tonos que van del marrón rojizo, hasta el negro intenso, cuando la oxidación es completa. Este té conserva su sabor y aromas con el tiempo, llegando por esto a ser empleado como moneda de cambio en la antigüedad.

El Té Rojo o “té de los emperadores” (durante muchos años su consumo estuvo prohibido al resto de la población), tiene un sabor muy característico, fuerte y terroso, y la infusión es de color rojizo oscuro. Es un té postfermentado que, a diferencia del Té Negro, requiere de un proceso de maduración en bodegas que puede llegar a durar varios años.

El Té Verde es, posiblemente, el más consumido de todos. Su principal característica es que no está fermentado, lo que hace que mantenga sus componentes naturales prácticamente igual que en su estado natural.

Con el término “Manzanilla” se denomina popularmente en España a un conjunto de 54 especies diferentes, siendo las más comunes: “*Chamaemelum nobile*” (Manzanilla

Capítulo 4

común o romana), “*Matricaria recutita*” (Manzanilla de Castilla, alemana, dulce o cimarrona), “*Matricaria aurea*”, “*Helichrysum stoechas*” (perpetua o siempreviva) y “*Santolina chamaecyparissus*” (abrótano hembra).

Son plantas con propiedades medicinales: digestiva, carminativa, sedante, tónica, vasodilatadora y antiespasmódica. Se utiliza fresca o seca para preparar infusiones, así como su aceite esencial en aromaterapia.



Detalle de flores de Manzanilla, y su aceite esencial

La Menta-Poleo es una hierba muy usada desde la antigüedad por griegos y romanos para cocinar, aunque poco a poco ha ido cayendo en desuso como hierba culinaria, pasando a utilizarse actualmente como infusión por sus propiedades carminativas, expectorantes y antitusivas, relajantes e incluso como emenagoga (favorece la aparición de la menstruación). Su nombre, deriva del “*pulex*” (pulga), en referencia a la antigua costumbre de quemar Menta-Poleo en las casas para repeler a estos insectos.



Plantas y flores de Menta-Poleo salvajes

El Rooibos es un arbusto de origen sudafricano, cuyo nombre significa en afrikáans “arbusto rojo”. Las infusiones se elaboran a partir de las finas hojas en forma de aguja que crecen en las ramas más delgadas de este arbusto. La intensidad con que brilla el tono rojo se asocia con una mayor calidad del producto.



Recolección de Rooibos "*Aspalathus Linearis*"

La Salvia es una planta lamiácea que recibe su nombre del latín "*salvare*", que significa "curar", en referencia a sus propiedades curativas, en especial cicatrizantes y bactericidas. Sirve también para suavizar los síntomas de la menopausia, en especial los sofocos, paliar los dolores antes y durante la menstruación, etc. Se emplea también como condimento, especialmente en Italia y en recetas de influencia italiana. En España, se emplea también en la maceración del Orujo de hierbas gallego.



Plantas de Salvia con las características flores

La Tila es una infusión que se prepara con el fruto en forma de flor de algunas de las especies del género *tilia* (tilos). Es muy usada por sus propiedades antiespasmódicas, somníferas y ansiolíticas.



Hojas y frutos de Tila secos

La Albahaca se cultiva en la India desde hace más de 5.000 años. Dependiendo de la especie y variedad, las hojas pueden tener un sabor con un toque anisado, y un penetrante olor fuerte, a menudo dulce. Existen muchas variedades e incluso híbridos también llamados Albahaca. Además de las hojas se utilizan los capullos florales.

Capítulo 4



Planta de Albahaca

Los tipos más populares que se cultivan son: Albahaca azul africana, Albahaca anís o persa (conocida también como Albahaca regaliz), Albahaca alcanfor o africana, Albahaca canela, Albahaca ópalo oscuro (Albahaca “Dark Opal”), Albahaca globe, Albahaca enana o francesa, Albahaca canosa, Albahaca morada, Albahaca spice o santa, Albahaca limón, Albahaca de hoja de lechuga, Albahaca púrpura y Albahaca reina de Siam o Rubin.

La Canela se extrae de la corteza interna del árbol de la Canela. La variedad *Cinnamomum* la componen unas doce especies de árboles. Aparte del *Cinnamomum Zeylanicum* o *Verum* (Canela de Ceilán, la de más calidad), también se explotan el *Cinnamomum Aromaticum* o *Cinnamomum Cassia* (Canela china), *Cinnamomum Loureioi* (Canela de Saigón) y el *Cinnamomum Burmanii* (Canela de Vietnam).



Canela en polvo (izq.) y en rama (der.)

El Clavo que se utiliza en la cocina, son botones (flores que aún no se han abierto), procedentes del árbol del Clavo o clavero (*Syzygium aromaticum*), de la familia Myrtaceae, nativo de Indonesia. Su nombre procede de su similitud con los Clavos metálicos. Los Clavos se cosechan principalmente en Indonesia y Madagascar, Zanzíbar, India y Sri Lanka. Debido a su contenido en eugenol, es un buen remedio casero para el dolor de muelas. Es muy tradicional en la India.



Clavo en grano (izq.) y molido (der.)

El Comino es la semilla de la planta herbácea *Cuminum Cyminum*, originaria de la cuenca del Mediterráneo y, por tanto, muy popular en la dieta mediterránea. Sus principales usos, fuera de la gastronomía, son: tónico estomacal, estimulante intestinal (para tratar la inapetencia, estreñimiento, aerofagia o digestiones pesadas) y en tratamiento de afecciones broncopulmonares (poder analgésico y antimicrobiano).



Comino en grano (izq.) y Comino molido (der.)

La Cúrcuma se obtiene del extracto de la planta (tallos y raíces) que le da nombre (*Curcuma Longa*). Se utiliza como Cúrcuma (extracto crudo) y como curcumina (estado purificado o refinado). Es muy poco estable en presencia de la luz, pero su estabilidad mejora añadiendo zumos cítricos. En algunos países de Sudamérica se conoce como “palillo de azafrán”, “yuquilla” o “azafrán de raíz”. Tiene potentes propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas.



Raíces de Cúrcuma y Cúrcuma en polvo

El Jengibre o quion (*Zingiber officinale*) es una planta de la familia de las zingiberáceas, de cuyos rizomas se extrae la especia.

En el este de Estados Unidos existe la especie *Asarum canadense*, o Jengibre silvestre, que no está emparentada con el verdadero Jengibre, pero tiene propiedades aromáticas parecidas; sin embargo, no se debe utilizar como sustituto del Jengibre, ya que contiene ácido aristolóquico (también llamado aristoloquina), un agente cancerígeno.

Capítulo 4

Entre sus numerosas propiedades, aparte de las gastronómicas, es digestivo, antiemético, antibiótico, bueno para el aparato respiratorio (mitigando los síntomas de la sinusitis, resfriado, fiebre y gripe), relajante muscular y articular, etc.



Raíz de Jengibre seca (izq.) y Jengibre en polvo (der.)

El Orégano como especia son hojas del *Origanum vulgare* (Orégano común), tanto secas como frescas, es muy utilizado en la dieta mediterránea. Entre sus muchos beneficios es antibacteriano, antioxidante, antifúngico, antiinflamatorio, antihistamínico, alivia enfermedades de la piel, combate enfermedades respiratorias, descongestivo nasal y pulmonar, alivia dolores musculares y articulares, disminuye los cólicos menstruales, alivia malestar estomacal, estimulante inmunológico, etc.



Hojas de Orégano frescas (izq.) y secas (der.)

La Nuez Moscada se obtiene de la endosperma de la semilla del árbol mirística o árbol de la Nuez Moscada (*Myristica*), que es un género de árboles perennifolios de la familia de las Myristicaceae procedentes de las Islas de las Especias (islas Molucas, Indonesia). A concentraciones altas se ha utilizado como un fuerte alucinógeno y psicodélico.



Nuez Moscada entera (izq.) y rallada (der.)



Detalle del fruto de la Nuez Moscada

El Romero se obtiene de las hojas de la planta *Rosmarinus officinalis*, procedente de la región mediterránea. Presenta muy buenas propiedades culinarias y debido a sus efectos estimulantes y tónicos favorece la recuperación de las enfermedades respiratorias y del aparato digestivo. Es rico en antioxidantes, y por sus propiedades bactericidas puede servir como complemento de un tratamiento con antibióticos y algunos casos de enfermedades de transmisión sexual. En uso externo sirve para mitigar dolores musculares y calambres producidos por el esfuerzo físico, así como para desinflamar o relajar los pies, tratar la alopecia, fortalecer uñas frágiles y quebradizas, combatir el mal aliento, aliviar las llagas y las inflamaciones bucales, etc. También se emplea como ambientador y como purificador de agua contaminada con bacterias (hervir el agua contaminada con planta seca de Romero, elimina completamente las bacterias).



Romero

El género *Thymus* lo forman unas 1500 especies de plantas aromáticas herbáceas y perennes, conocidas comúnmente como Tomillo, siendo el más habitual el *Thymus Vulgaris*. Son especies ampliamente distribuidas por Europa, África del Norte y Asia.

El Tomillo es muy habitual en la cocina mediterránea. Tiene propiedades, carminativas, antipútridas, es estimulante digestivo, antibiótico natural, emenagogo, antirreumático, tranquilizante, evita los síntomas del mal de altura, alivia dolores de cabeza, antifúngico en las uñas de las manos, combate problemas bucales como llagas, caries y mal aliento, también es repelente de mosquitos junto con la Albahaca, etc.



Ramas de Tomillo (a los lados) y Tomillo seco

Estas infusiones y especias se usan extensamente y contienen, entre otros componentes, diferentes tipos y proporciones de antioxidantes. El conocimiento de su composición,

Capítulo 4

sobre todo de los extractos en agua, aunque también de los extractos alcohólicos, es indudablemente importante a la hora de explicar su actividad como antioxidantes. Por esta razón se han seleccionado para este trabajo.

4.2. Objetivos del capítulo

En este capítulo, nos centramos en determinar la composición de los extractos acuosos y metanólicos en diferentes muestras de té, infusiones y especias. Los téis analizados han sido: Té Blanco con un toque de Vainilla y Té Negro de la marca *Hornimans*, Té Rojo, Té Verde y Mezcla de tres téis de la marca *Hacendado*. Las infusiones analizadas han sido: Manzanilla, Menta-Poleo, Rooibos sabor Ciruela, Salvia y Tila de la marca *Hacendado*. Las especias analizadas han sido: Albahaca, Canela en polvo, Canela en rama, Clavo, Comino, Cúrcuma, Jengibre, Nuez Moscada, Orégano, Romero y Tomillo, todos de la marca *Hacendado*.

Los téis son bebidas que se toman siempre con agua, de manera que los extractos en disolventes apolares o alcohólicos, no aportan una información real de lo que se ingiere. En algunos artículos científicos sí se llevan a cabo extractos en agua, pero se centran principalmente en los contenidos de polifenoles en su conjunto, sin hacer distinciones, o simplemente evaluando la capacidad antioxidante conjunta del extracto, sin identificar las posibles especies antioxidantes.

Las infusiones, al igual que los téis, se consumen en agua, siendo interesante estudiar su composición y su relación con el carácter antioxidante en la forma en que se consumen. Aunque hay trabajos sobre aceites esenciales de algunas de las plantas utilizadas en las infusiones, su composición no es la misma que en el extracto acuoso.

Las especias, al contrario de las muestras anteriores, se ingieren con una base acuosa, pero dependiendo de cómo se cocinen, se puede extraer también la fracción no acuosa, bien por uso de alcoholes (vinos, coñacs, whiskies, etc.), con grasas procedentes del propio alimento (animales o vegetales) o añadidas en el proceso de elaboración (aceites, mantecas, mantequillas, etc.). La mayor parte de los artículos científicos publicados hasta el momento, se centran en la composición y los antioxidantes presentes en los aceites esenciales de las especias, sin tener en cuenta la composición de los extractos acuosos y/o hidroalcohólicos.

4.3. Materiales y Métodos

Tanto para cromatografía de gases como para HPLC, los ensayos realizados se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados que se muestran en las tablas de los apartados 4.4. y 4.5. son los valores medios obtenidos para esos compuestos, siendo la variación de los resultados en todos los casos, menor al 5% del valor medio.

Capítulo 4

4.3.1. Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas (CG-EM)

4.3.1.1. Preparación de las Muestras/Extractos

La preparación de muestra se llevó a cabo pesando 0.4 gramos en una balanza de precisión Sartorius, de cada uno de los tipos de tés, infusiones y especias pasando cada alícuota a un vaso de precipitado de 25 mL donde se le añadían 10 mL de agua ultrapura a 100°C que previamente se calentaban con la ayuda de un calentador de agua tipo Kettle. Para preparar el extracto se dejaban agitando durante 3 minutos a 300 r.p.m.

Después se tomaron 4 mL de cada uno de estos extractos, y se filtraron con filtros de 0.45 µm de tamaño de poro, poniendo este filtrado en viales color topacio de 4 mL para la concentración de la muestra. Estos viales se llevaron a un desecador, donde se calentaron y se les pasó una corriente de nitrógeno para eliminar el disolvente. Una vez llevados a sequedad, se añadieron 100 µL de metanol y se sonicaron. De ahí, se sacó el contenido y se pasó a los viales para muestras concentradas de CG-EM.

Para los extractos hechos en metanol, se procedió de igual forma a la descrita anteriormente, pero en lugar de utilizar 10 mL de agua ultrapura a 100°C para hacer el extracto, se añadió metanol a 60°C.

4.3.1.2. Método utilizado en CG-EM

Los análisis en CG-EM se realizaron con un Cromatógrafo de Gases-Espectrómetro de Masas “*Gas Chromatography-Mass Spectrum Perkin-Elmer Clarus 500*” provisto de un autoinyector para 100 viales. Las características más importantes se detallan a continuación.

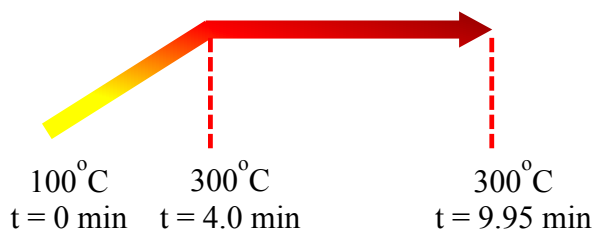
El método empleado en CG-EM consistió en una rampa de temperatura, hasta alcanzar una temperatura máxima, la cual se mantenía durante un tiempo determinado para asegurar que todos los componentes de las muestras pasaban por la columna y el espectrómetro de masas. La interfase entre el cromatógrafo de gases y el espectrómetro de masas debía estar a la misma temperatura máxima para evitar condensaciones de los compuestos en ella.

Gas portador: Helio

Flujo de Gas portador: 0.5 mL/min

Volumen de inyección: 0.5 µL

Programa de Temperatura: rampa de 100°C a 300°C con un incremento de 50°C/min, manteniendo posteriormente la temperatura de 300°C durante 5.95 min



Duración total del método: 9.95 min

Tipo de columna del cromatógrafo de gases: SLB-5ms (10 m x 0.1 mm x 0.1 μm)

Temperatura del Puerto Inyector (interfase entre el CG y el MS): 300°C

Analizador: Cuadrupolo con prefiltro (131 mm x 12 mm barras circulares / 16 mm x 12 mm barras prefiltro)

Detector: Fotomultiplicador sellado de larga vida

Modos de Ionización: Ionización de Electrón (por defecto). Ionización Química Positiva/Negativa (opcional).

Rango de iones seleccionado (relación masa/carga): de 50 a 500 g·mol⁻¹·carga⁻¹

Iones seleccionados: Positivos

Tiempo de medida del MS: de 0 a 9.95 min

Tiempo de escaneo: 0.4 segundos

Retraso interesaneo: 0.01 segundos

4.3.2. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)

4.3.2.1. Preparación de las muestras/extractos

La preparación de muestra se llevó a cabo pesando 1 g en una balanza de precisión Sartorius, de cada uno de los téis, infusiones y especias, pasando cada alícuota a un vaso de precipitados de 25 mL donde se le añadían 10 mL de agua ultrapura a 100°C, previamente calentada con la ayuda de un calentador de agua tipo Kettle, el cual para automáticamente la calefacción cuando el agua llega a ebullición (muy utilizada en Reino Unido). A continuación se dejaban agitando durante 3 minutos a 300 r.p.m.

Después, una parte de cada uno de estos extractos se pasó por filtros de 0.45 μm de tamaño para eliminar los posos, restos de hojas y partículas en suspensión. El líquido resultante se trasvasó a los viales de 1.5 mL utilizados en HPLC.

Capítulo 4

Para los extractos en metanol, se procedió de igual forma, pero en lugar de utilizar 10 mL de agua ultrapura a 100°C para obtener el extracto, se añadió metanol a 60°C.

4.3.2.2. Método utilizado en HPLC

Los análisis en HPLC se realizaron con un *High Performance Liquid Chromatography Perkin-Elmer Flexar* cuyas características más importantes se detallan a continuación.

El método utilizado en HPLC se estableció buscando la separación de las especies existentes en las muestras en base a su polaridad, utilizando disolventes baratos y fácilmente accesibles. Desde un principio se descartó el empleo de una fase móvil monocomponente, ya que el análisis podría implicar más tiempo, y el uso de reactivos más caros. Se diseñó un método que utiliza una fase móvil con dos componentes, uno acuoso y otro alcohólico, empleándose un gradiente que iba desde un 90% de fase móvil acuosa a un 98 % de fase móvil alcohólica. En la mayoría de las muestras no era necesario alcanzar la máxima fracción de metanol en la fase móvil para que los componentes saliesen de la columna y del sistema, utilizándose sobre todo esta proporción para llevar a cabo la limpieza del sistema, en especial la columna, después de cada medida.

En un principio, se empezó utilizando como fase móvil acuosa simplemente agua ultrapura, pero al estar el pH muy cercano al primer pK_a del ácido gálico ($pK_a \approx 4.41$) [1-3], el pico de absorción se desdoblaba en dos, incluso a bajas concentraciones. El ácido gálico es un antioxidante de gran interés y su señal a determinadas longitudes de onda se puede relacionar con el contenido de polifenoles totales. Así pues, era de gran interés obtener una señal más limpia y resuelta. En primer lugar, se optó por una fase móvil de composición: agua ultrapura/acetronitrilo/metanol/acetato de etilo/ácido acético glacial (89/6/1/3/1 en relación de volúmenes), utilizada previamente en la bibliografía para conseguir una buena separación de picos entre la cafeína, catequina, epicatequina y galato de epigalocatequina [4]. Esta fase móvil estaba especialmente diseñada para discriminar estos compuestos, pero no era especialmente útil para otros como el ácido gálico, cuya señal se mantenía como en la primera fase móvil, agua ultrapura sola. Esto, unido a que, se buscaba un método simple, sencillo y barato para discriminar los analitos presentes en las muestras, hizo que se descartase la segunda fase móvil acuosa sustituyéndola por una fase móvil más sencilla y económica, que simplemente disminuyera el pH para que compuestos como el ácido gálico se encontraran en su forma protonada (al menos en su mayor parte), presentando picos con una mayor resolución, sin poner en peligro el equipo por disminuir mucho el pH. Por esta razón, se preparó la denominada Fase Móvil Ácida (F.M.A.) constituida por una disolución acuosa de ácido clorhídrico $44 \cdot 10^{-3}$ Molar (HCl) y glicina $50 \cdot 10^{-3}$ M, cuyo pH final era ≈ 2.01 .

Para preparar la F.M.A. se tomó agua ultrapura y se filtró con una bomba de vacío y filtros de 0.45 μm . A continuación, se disolvieron el HCl y la glicina en el volumen adecuado de agua ultrapura y se sometió a un baño de ultrasonidos durante 15 minutos para asegurar la ausencia de partículas en suspensión que pudieran obstruir los conductos del equipo de HPLC. Con esto se evitó filtrar la fase móvil una vez añadido el HCl, que podría atacar al filtro.

La preparación de la fase móvil alcohólica, el metanol, consistió simplemente en un filtrado tal y como se hacía para el agua ultrapura de la fase móvil acuosa.

Antes de cada serie de medidas se purgó la bomba del equipo de HPLC, durante 6 minutos con cada una de las disoluciones que componen la fase móvil (la alcohólica y la acuosa). A continuación, se llevó a cabo el acondicionamiento de la columna (en todos los casos una tipo C-18 de 25 cm de longitud y 5 μm de diámetro interno), para lo cual se pasó una fase móvil al 50% en fase acuosa y 50% fase alcohólica durante 60 minutos.

Durante este tiempo se cargaba el método y se preparaban las muestras.

Datos comunes a todos los métodos desarrollados fueron:

Velocidad de muestreo: 5 pts/s

Volumen de inyección: 10 μL . La optimización del método se llevó a cabo haciendo medidas donde se inyectaba sólo 1.0 μL para evitar obstrucciones o cualquier otro tipo de problemas en el equipo. Posteriormente, se comprobó que al inyectar un volumen mayor (10 μL), las señales se intensificaban, eran más fáciles de distinguir y dicho volumen no implicaba riesgo para el equipo, por lo que se fijó como volumen de inyección óptimo.

Velocidad de inyección: Alta (inyección completa en menos de 3 segundos).

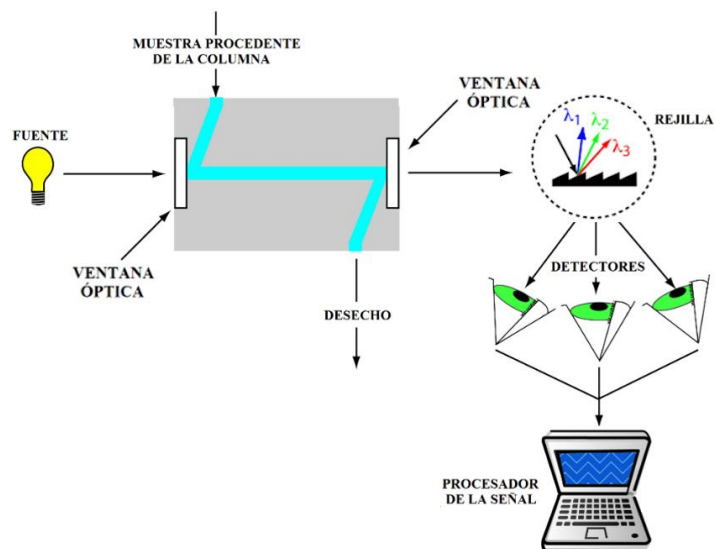
Temperatura del Horno: $\approx 25 \pm 5^\circ\text{C}$. Se fijó esta temperatura para estar en torno a la temperatura a la que se ingieren los alimentos y/o temperatura ambiente.

Detector empleado: Detector de matriz de Diodos

Paso óptico del detector: 0.0025 inch ($6.35 \cdot 10^{-3}$ cm)

Lámpara: Lámpara Ultravioleta

Longitudes de Onda de medida: 254 nm, 260 nm, 275 nm, 280 nm, 325 nm, 340 nm, 355 nm, 370 nm, 385 nm y 395 nm, medidas simultáneamente.



Para los análisis, se emplearon varios métodos, que se fueron adaptando para cada muestra, teniendo en cuenta el tiempo de retención de los componentes y tiempo de limpieza que se requería tras pasar la muestra.

Los métodos puestos a punto y utilizados fueron los siguientes:

Paso	Tipo de Paso	Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% de F.M.A.	% metanol
0	Equilibrado	5.0	1.0	60.0	40.0
1	Medida	6.0	1.0	90.0	10.0
2	Medida	6.0	1.0	80.0	20.0
3	Medida	6.0	1.0	70.0	30.0
4	Medida	6.0	1.0	60.0	40.0
5	Medida	6.0	1.0	50.0	50.0
6	Medida	6.0	1.0	40.0	60.0
7	Medida	6.0	1.0	30.0	70.0
8	Medida	3.0	1.0	20.0	80.0
9	Lavado	15.0	1.5	10.0	90.0

Tabla 4.1. Método empleado para el análisis en HPLC de muestras de té.

Paso	Tipo de Paso	Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% de F.M.A.	% metanol
0	Equilibrado	5.0	1.0	60.0	40.0
1	Medida	6.0	1.0	90.0	10.0
2	Medida	6.0	1.0	80.0	20.0
3	Medida	6.0	1.0	70.0	30.0
4	Medida	6.0	1.0	60.0	40.0
5	Medida	6.0	1.0	50.0	50.0
6	Medida	6.0	1.0	40.0	60.0
7	Medida	6.0	1.0	30.0	70.0
8	Medida	6.0	1.0	20.0	80.0
9	Medida	6.0	1.0	10.0	90.0
10	Medida	6.0	1.0	2.0	98.0
11	Lavado	15.0	1.5	2.0	98.0

Tabla 4.2. Método empleado para el análisis en HPLC de muestras de infusiones y especias.

Paso	Tipo de Paso	Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% de F.M.A.	% metanol
0	Equilibrado	5.0	1.0	60.0	40.0
1	Medida	6.0	1.0	90.0	10.0
2	Medida	6.0	1.0	80.0	20.0

Tabla 4.3. Método *Reference 1*, empleado para los estándares: ácido gálico, cafeína, teobromina y vainillina.

Paso	Tipo de Paso	Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% de F.M.A.	% metanol
0	Equilibrado	5.0	1.0	60.0	40.0
1	Medida	6.0	1.0	90.0	10.0
2	Medida	6.0	1.0	80.0	20.0
3	Medida	6.0	1.0	70.0	30.0
4	Medida	6.0	1.0	60.0	40.0
5	Medida	6.0	1.0	50.0	50.0
6	Medida	6.0	1.0	40.0	60.0
7	Medida	6.0	1.0	30.0	70.0

Tabla 4.4. Método *Reference 2*, empleado para el estándar: cinamaldehído.

En todos los métodos se mantuvo el flujo constante durante las medidas (sólo se varió en las etapas de limpieza), debido a que, si se variaba entre las etapas de “Medida”, se observaba una fluctuación de la medida de Absorbancia, probablemente debida a la caída o incremento de la presión en el sistema.

4.4. Resultados de CG-EM

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, es una técnica que permite obtener gran cantidad de información, aunque se ve limitada por la descomposición térmica de los componentes de la muestra. Esto fue lo que ocurrió con uno de los antioxidantes más importantes y extendidos en este estudio: el ácido gálico. Como contrapartida, pudieron monitorizarse otros muchos compuestos realmente interesantes y que presentan actividad antioxidante [5] como, por ejemplo: Resorcinol, 3-metoxi-1,2-bencenodiol, 1,2,3-bencenotriol, Vainillina, Eugenol, Gingerol, Carvacrol, Timol, Hidroquinona, etc. También, compuestos característicos de determinadas muestras: Tumerona, Eucaliptol, Mentol, Ácido Oléico, Cinamaldehído, Ácido Cinámico, Indol, etc. Y otros compuestos que se utilizaron como factores comunes y comparativos para la composición de las diferentes muestras de té: 2-metilBenzaldehído + 4-metilBenzaldehído, Sacarosa, Cafeína, Teobromina...

Una vez preparada la muestra como se ha indicado anteriormente (punto 4.3.2.1.), se somete al método optimizado para estos ensayos (punto 4.3.2.2.), obteniéndose como resultados para cada muestra un cromatograma de gases y su espectro de masas, que se estudiaron con el programa *AMDIS 32* y su biblioteca (*TurboMass versión V.O. 5.4.2*). Se seleccionaron los picos más característicos del cromatograma, a los cuáles el software les atribuye varios posibles compuestos, seleccionándose aquellos que presentan una coincidencia mayor o igual al 75% con el espectro de la biblioteca. Para la cuantificación se ha utilizado el método del estándar externo, pero ante la imposibilidad de tener estándares para todos los compuestos obtenidos, se relacionaron con un estándar de cafeína pesado exactamente en balanza de precisión, y teniendo en cuenta que la señal de base no presentaba ninguna deriva ni picos que pudiesen interferir en las medidas. Además, como referencia adicional, tanto por el tiempo de retención como por su cantidad, en el cromatograma, aparece siempre el pico del metanol a 0.35-0.40 minutos, que se puso siempre en la misma cantidad y concentración como disolvente de la muestra seca, y del que en cada caso, el equipo inyectó un volumen fijo.

Como ejemplos, se muestran algunas comparativas de los espectros de los compuestos estudiados en los té; en la parte superior puede verse el espectro obtenido, y abajo el espectro del compuesto seleccionado de la biblioteca:

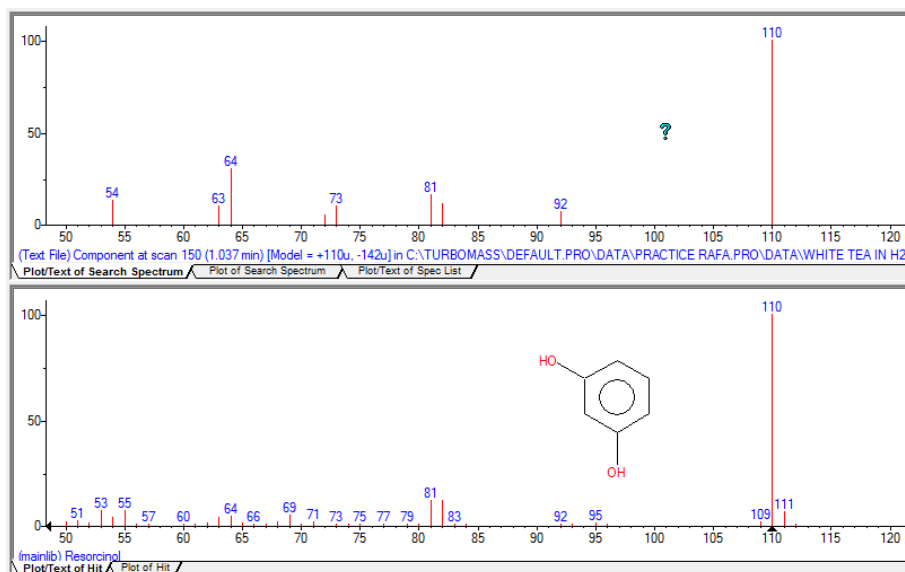


Figura 4.1. Comparativa del espectro de masas correspondiente al **Resorcinol** obtenido en la muestra de Té Blanco en agua. *Arriba*, espectro obtenido. *Abajo*, espectro de la biblioteca.

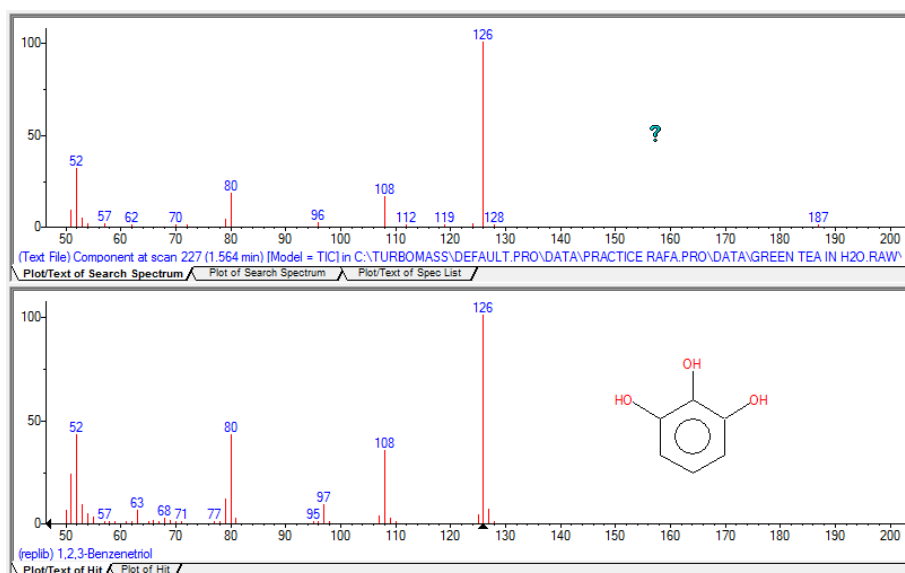


Figura 4.2. Comparativa del espectro de masas correspondiente al **1,2,3-Benzenetriol** obtenido en la muestra de Té Verde en agua. *Arriba*, espectro obtenido. *Abajo*, espectro de la biblioteca.

Capítulo 4

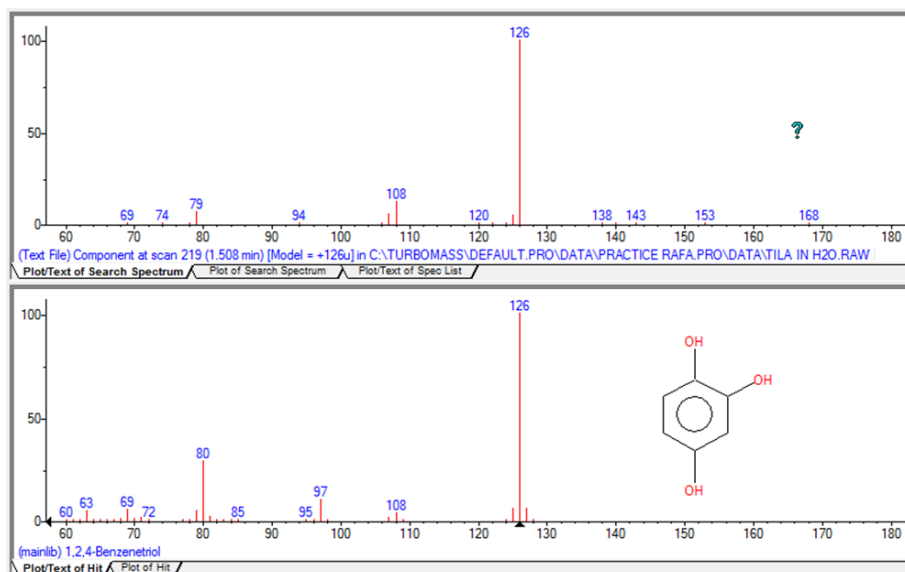


Figura 4.3. Comparativa del espectro de masas correspondiente al **1,2,4-Benzenetriol** obtenido en la muestra de Tila. *Arriba*, espectro obtenido. *Abajo*, espectro de la biblioteca.

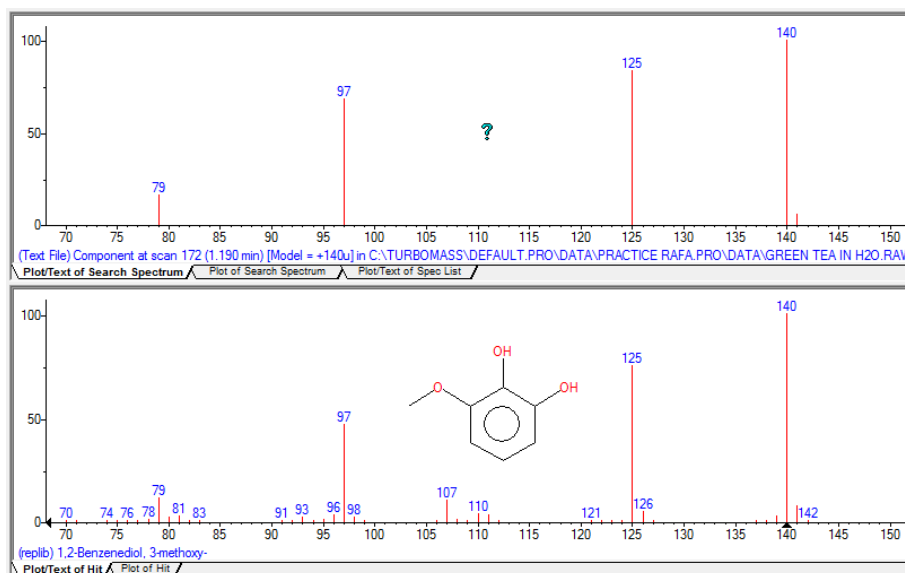


Figura 4.4. Comparativa del espectro de masas correspondiente al **3-metoxi-1,2-Benzenediol** obtenido en la muestra de Té Verde en agua. *Arriba*, espectro obtenido. *Abajo*, espectro de la biblioteca.

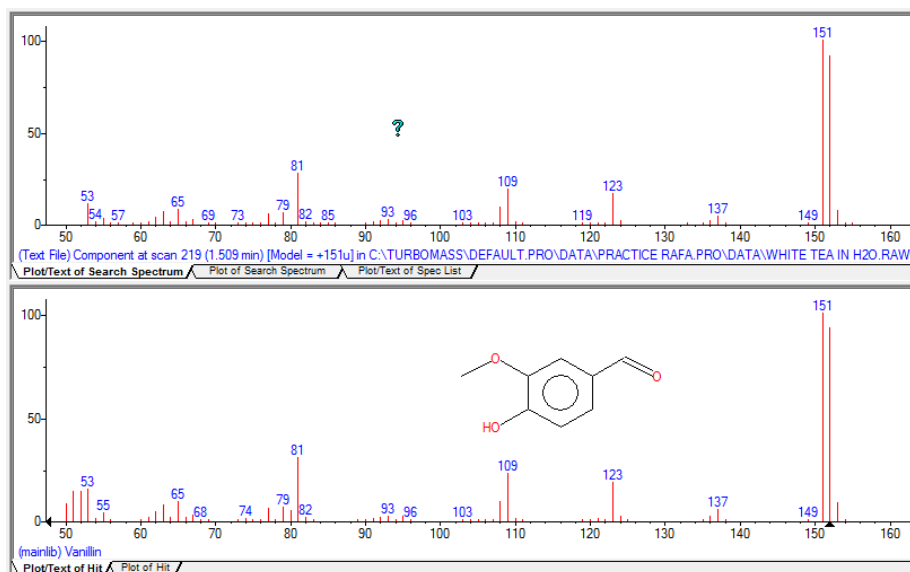


Figura 4.5. Comparativa del espectro de masas correspondiente a la **Vainillina** obtenido en la muestra de Té Blanco en agua. *Arriba*, espectro obtenido. *Abajo*, espectro de la biblioteca.

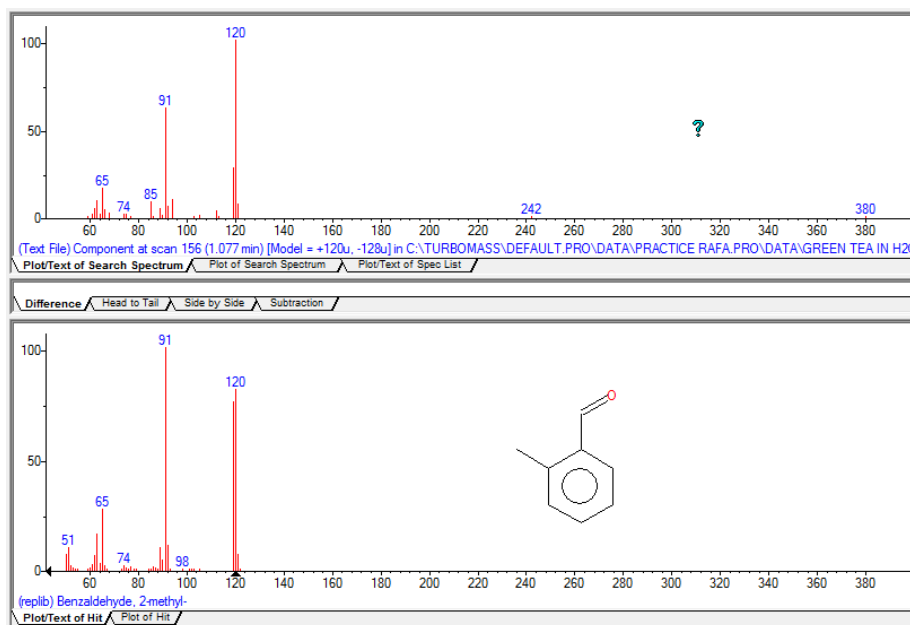


Figura 4.6. Comparativa del espectro de masas correspondiente al **2 metil-Benzaldehído** obtenido en la muestra de Té Verde en agua. *Arriba*, espectro obtenido. *Abajo*, espectro de la biblioteca.

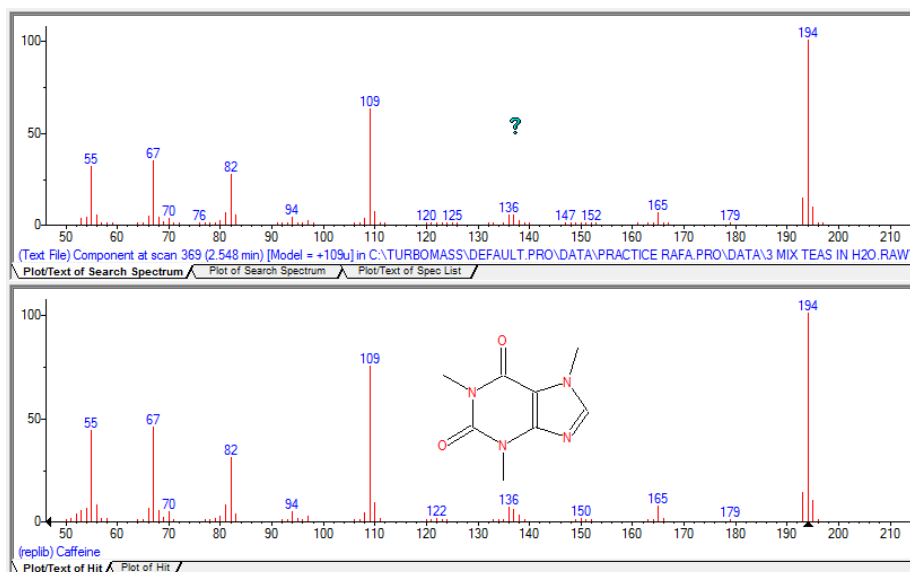


Figura 4.7. Comparativa del espectro de masas correspondiente a la **Cafeína** obtenido en la muestra de Mezcla de 3 Tés en agua. *Arriba*, espectro obtenido. *Abajo*, espectro de la biblioteca.

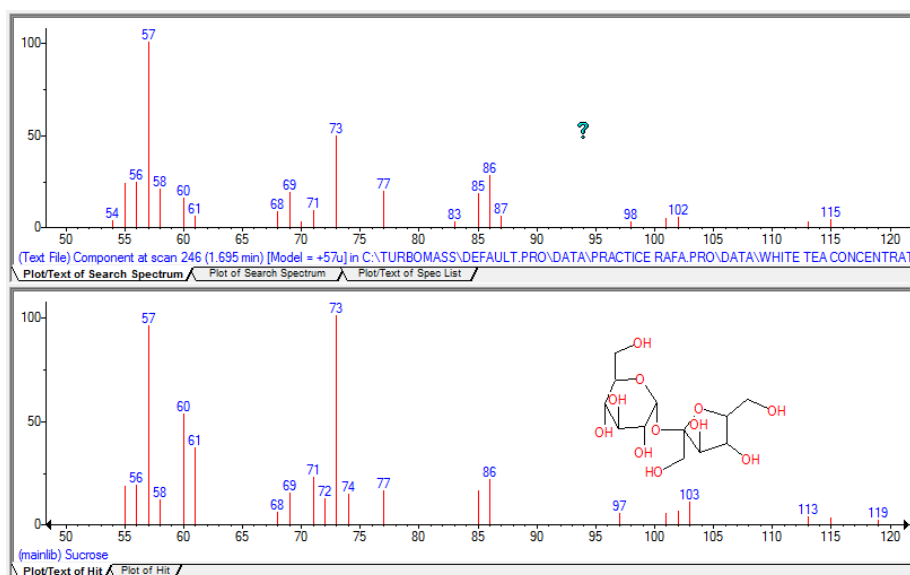


Figura 4.8. Comparativa del espectro de masas correspondiente a la **Sacarosa** obtenido en la muestra de Té Blanco en metanol. *Arriba*, espectro obtenido. *Abajo*, espectro de la biblioteca.

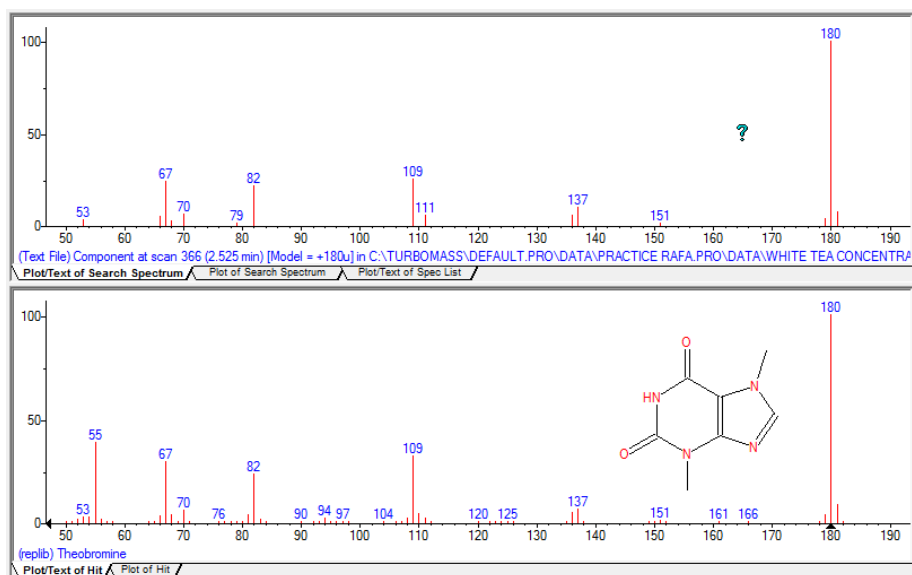


Figura 4.9. Comparativa del espectro de masas correspondiente a la **Teobromina** obtenido en la muestra de Té Blanco en metanol. *Arriba*, espectro obtenido. *Abajo*, espectro de la biblioteca.

Capítulo 4

4.4.1. Tés

En los extractos de té (acuosos y alcohólicos) el principal componente es la cafeína, siendo su contenido, en el menor de los casos, superior al 69 %. Aunque cabría esperar la detección de cantidades significativas de teobromina, esta sustancia tiene un punto de inflamabilidad de 293 °C [6], y carece de punto de ebullición, por lo que la mayor parte de ella se descompone y no se detecta. Con la vainillina, lo que ocurre es que tiene un punto de inflamabilidad de 153°C [7], mucho menor que su punto de ebullición, cercano a 285 °C [7], por lo que se descompone térmicamente antes de pasar a estado gaseoso.

Los resultados de los análisis de CG-EM para las diferentes muestras de té se muestran a continuación, haciendo especial hincapié en los compuestos característicos de cada té, y los antioxidantes. Las tablas indican el compuesto identificado correspondiente a cada pico significativo, su tiempo de retención, la abundancia inyectada (en %), y las partes por millón con respecto al té seco de la muestra.

4.4.1.1. Té Blanco

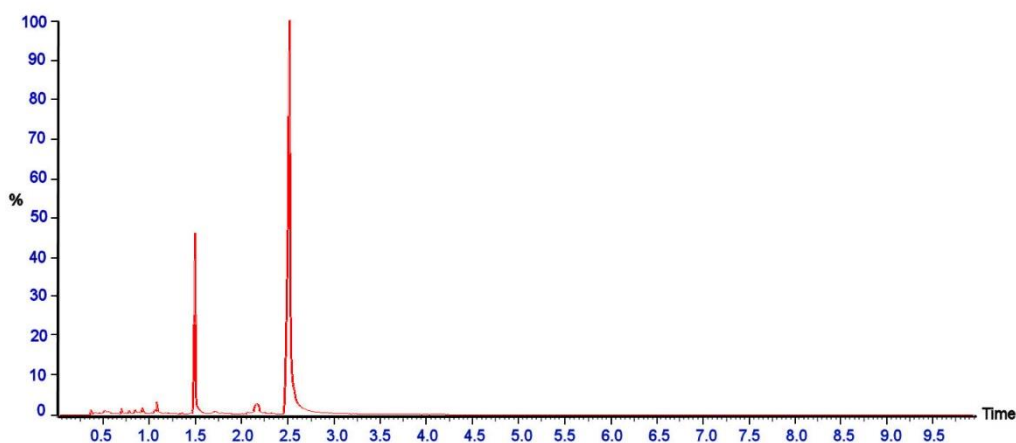


Figura 4.10. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Té Blanco en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Resorcinol	1.0369	0.219	4.55
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	1.0756	0.049	1.01
3-metoxi-1,2-Bencenodiol	1.1875	0.097	2.09
1,2,3-Bencenotriol	1.499	1.973	40.48
Vainillina	1.5092	19.626	402.91
Sacarosa	1.6439; 2.1604-2.1817	9.937	204.02
Cafeína	2.538	67.880	1393.50
Teobromina	2.589	0.218	4.47

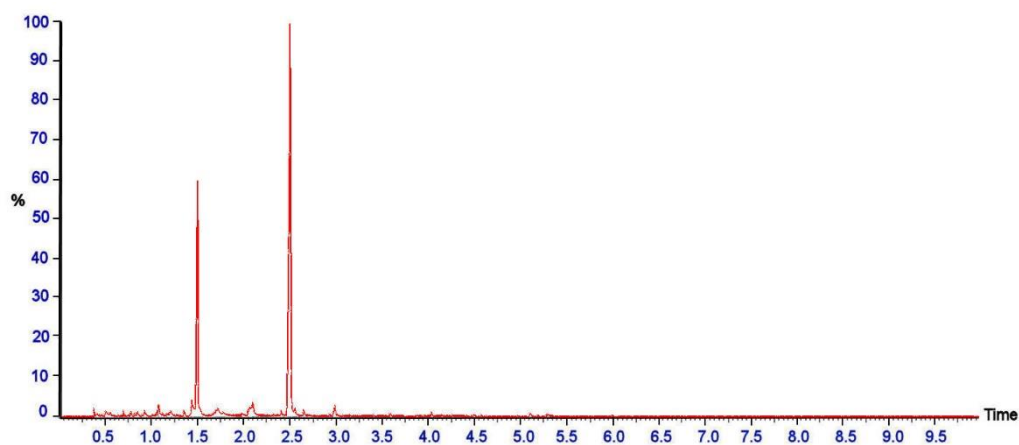
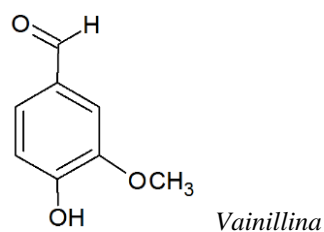


Figura 4.11. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Té Blanco en metanol.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m
1,2,3-Bencenotriol	1.41	2.745	31.88
Vainillina	1.4693	22.978	267.03
Sacarosa	1.695	2.203	25.64
1H-Pyrrolo[2,3-b]pyridine, 2-fenil-	2.4769	9.957	115.71
Cafeína	2.4776-2.5245	60.034	697.60
Teobromina	2.5245	0.473	5.52

En este té, hay que destacar, además de la abundante cafeína, la presencia de vainillina (añadida), la cual, también presenta actividad antioxidante [8].



En la composición del extracto en metanol del Té Blanco se obtuvo Vitamina E (1.45 p.p.m.), el mayor en contenido de las 5 muestras de té. También es el té que presenta más alto contenido en Resorcinol.

Capítulo 4

4.4.1.2. Té Negro

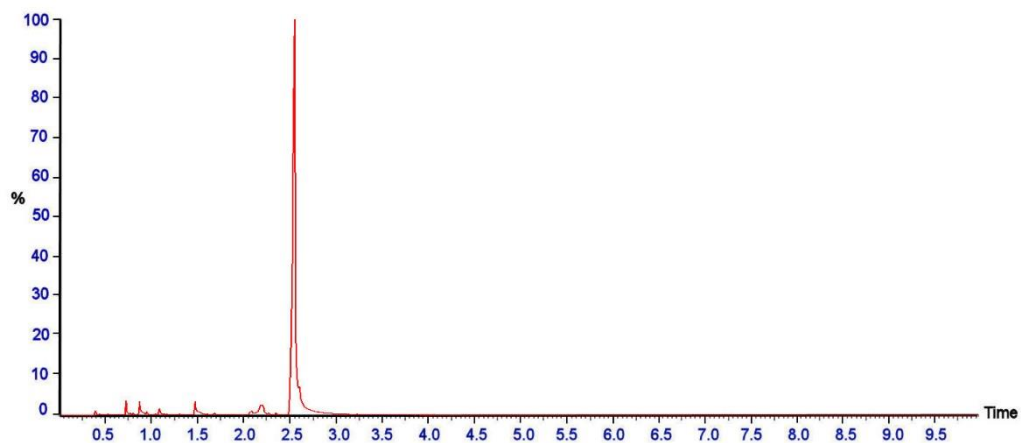


Figura 4.12. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Té Negro en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Resorcinol	1.0376	0.101	2.42
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	1.077	0.325	7.84
3-metoxi-1,2-Bencenodiol	1.1896	0.039	0.94
1,2,3-Bencenotriol	1.4623	1.906	45.82
Sacarosa	1.6727; 2.0573-2.1918	4.548	109.30
Ácido 4-hidroxi-benzoico	1.7783-1.88308	5.102	1.23
Cafeína	2.5413	86.105	2069.05
Teobromina	2.5993	1.569	37.71

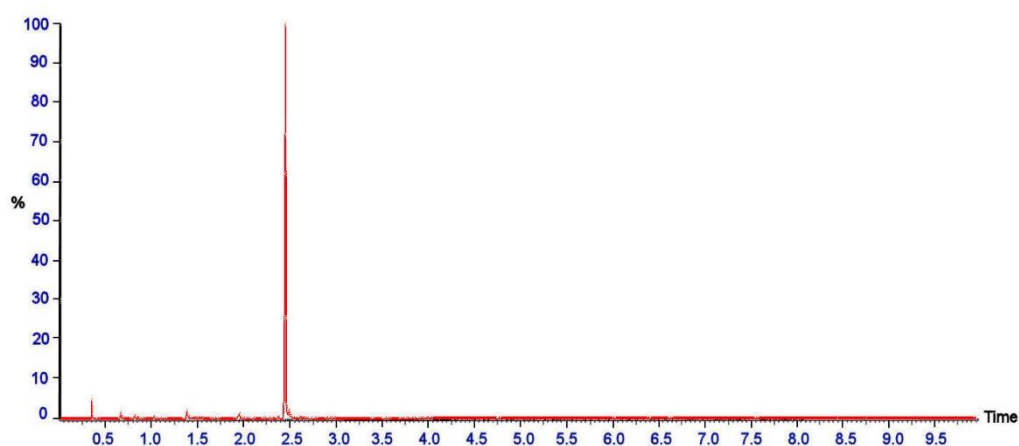
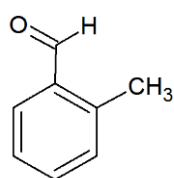


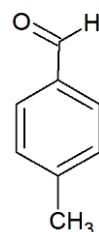
Figura 4.13. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Té Negro en metanol.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
1,2,3-Bencenotriol	1.3815	0.522	3.54
Sacarosa	1.868	1.761	11.85
Cafeína	2.4498	97.149	650.92
Teobromina	2.4919	0.224	1.53

En este té, también se obtuvo el pico más intenso de los cromatogramas para la teína/cafeína. Hay que destacar la Mezcla de 2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído, en el extracto acuoso, que en este té representa un contenido mayor que el resto.



2-metil-Benzaldehído



4-metil-Benzaldehído

Estos compuestos provienen de la degradación de sustancias polifenólicas encontradas en abundancia en los brotes de té, y en menor medida en las hojas [9].

Capítulo 4

4.4.1.3. Té Rojo

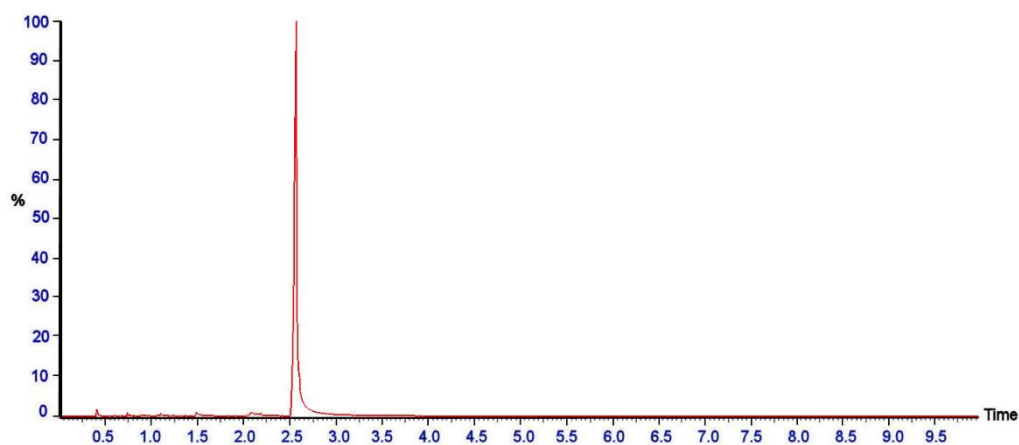


Figura 4.14. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Té Rojo en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Resorcinol	1.0375	0.067	0.91
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	1.0768	0.266	3.63
3-metoxi-1,2-Bencenodiol	1.1886	0.024	0.32
1,2,3-Bencenotriol	1.4628	0.816	11.11
Ácido 4-hidroxi-benzoico	1.8031	0.011	0.15
Cafeína	2.5438	98.110	1734.34
Teobromina	2.5804	0.478	6.45

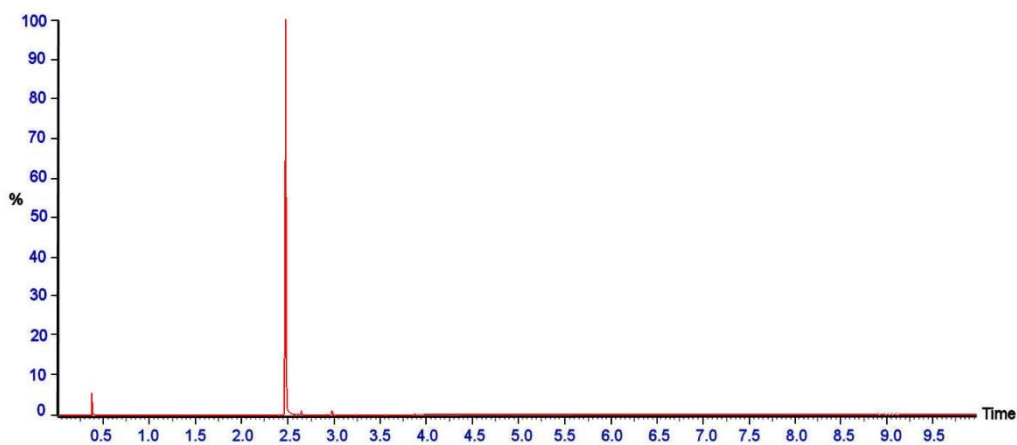


Figura 4.15. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Té Rojo en metanol.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Cafeína	2.4497	99.978	467.52
Teobromina	2.4925	0.017	0.08

En este té también se obtuvo el pico más intenso para la teína/cafeína, sin embargo, es el té con los valores más bajos en contenidos de los compuestos monitorizados de todos los estudiados, a excepción de la cafeína en el extracto en metanol, que es algo mayor que el de la Mezcla de Tres Té.

4.4.1.4. Té Verde

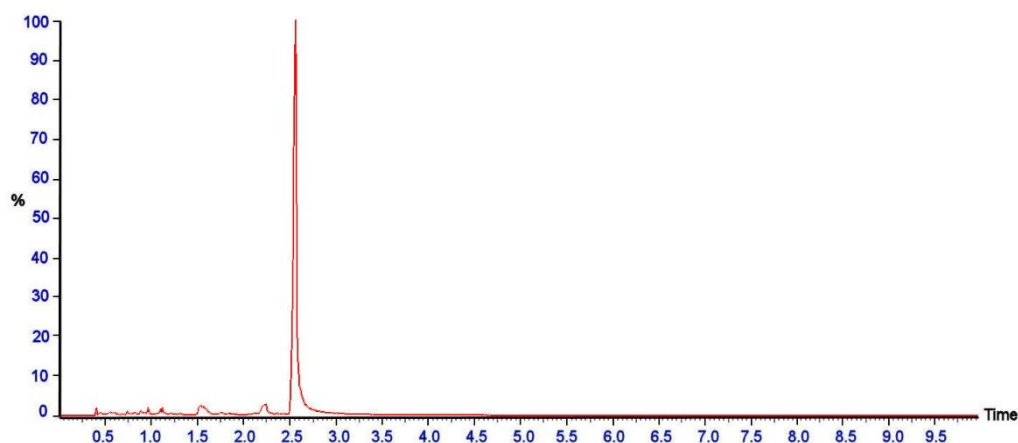


Figura 4.16. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Té Verde en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	1.077	0.322	5.47
3-metoxi-1,2-Bencenodiol	1.19	0.129	2.21
1,2,3-Bencenotriol	1.564	2.175	37.25
Sacarosa	1.744; 2.1819-2.2661	10.454	178.82
Ácido 4-hidroxi-3-metoxi-Bencenoacético	2.057	0.035	0.60
Cafeína	2.544-2.546	86.038	1471.51
Teobromina	2.6015	0.152	2.57

Capítulo 4

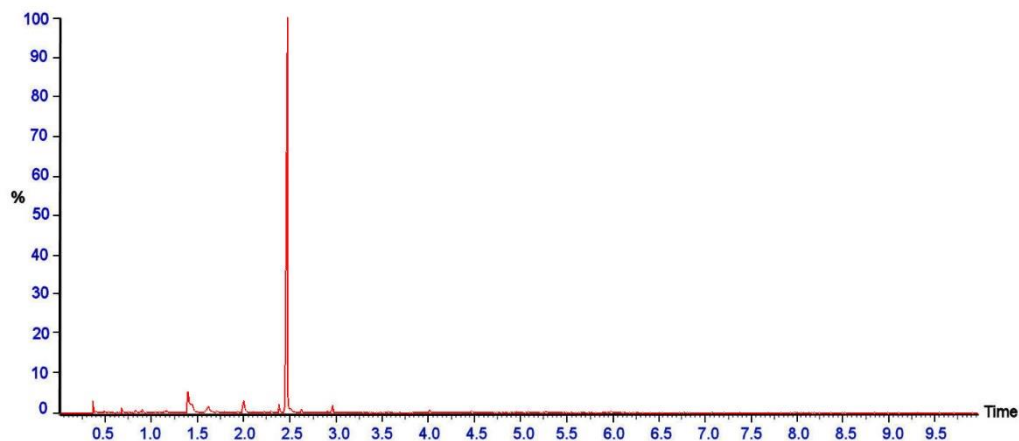


Figura 4.17. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Té Verde en metanol.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
2-metoxi-1,4-Bencenodiol	1.126	0.071	0.82
1,2,3-Bencenotriol	1.375-1.427	2.928	33.89
Sacarosa	1.601-1.606	1.944	22.50
4-propil-1,3-Bencenodiol	1.9239	0.057	0.663
(1 α ,2 β ,3 α ,5 β)-1,2,3,5-Ciclohexanotetrol	1.981-1.987	3.256	37.69
Cafeína	2.451-2.454	87.475	1012.53
Teobromina	2.496	0.071	0.82

El Té Verde también presenta el pico de mayor intensidad para la teína/cafeína. Presenta una gran variedad de compuestos aromáticos con sustituyentes hidroxilo (OH⁻), susceptibles de oxidarse y, por tanto, presentar un marcado carácter antioxidante. La Vitamina E forma parte de la composición de los extractos en metanol del Té Blanco y del Verde (0.35 p.p.m.).

4.4.1.5. Mezcla de 3 Tés

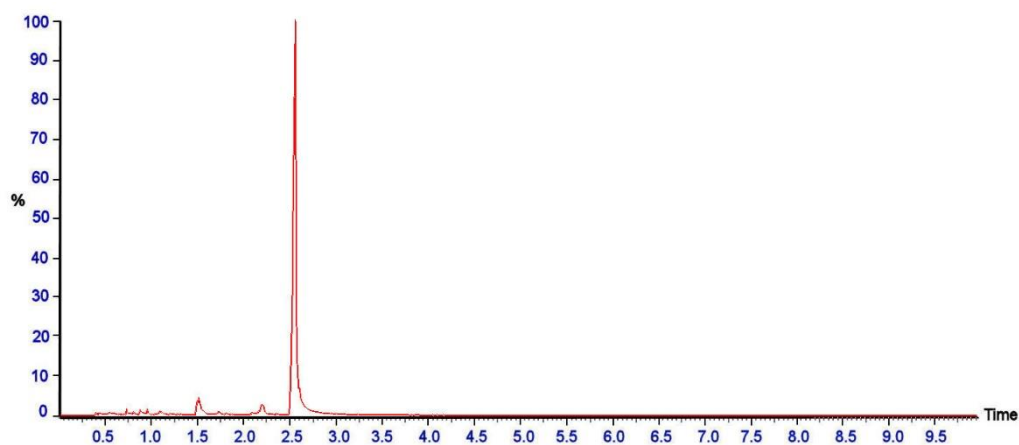


Figura 4.18. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Mezcla de 3 Tés en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Resorcinol	1.0415	0.205	4.24
3-metoxi-1.2-Bencenodiol	1.1942	0.191	3.88
1.2.3-Bencenotriol	1.491-1.5014	2.293	46.93
Vainillina	1.5042	0.308	6.25
Sacarosa	1.7196-1.7236; 2.1842-2.2078	10.020	204.87
4-propil-1.3-Bencenodiol	2.0248	0.006	0.12
Cafeína	2.548-2.551	85.399	1746.37
Teobromina	2.595-2.600	1.482	30.33

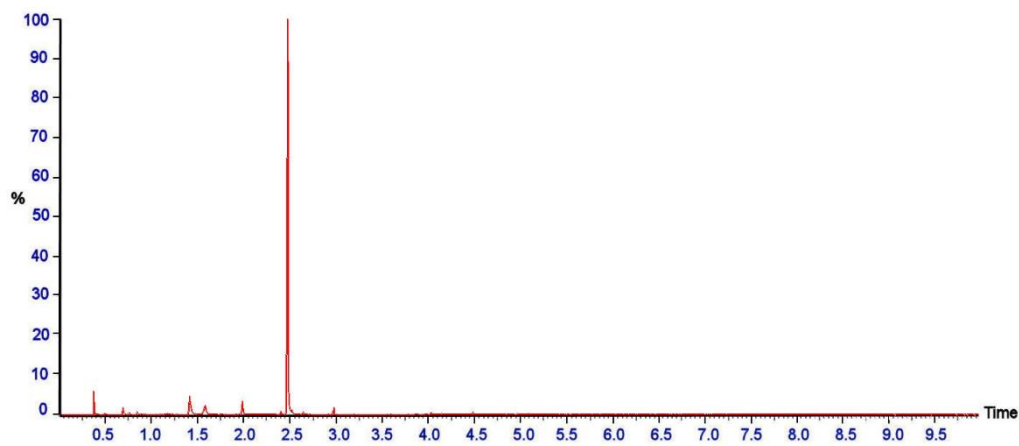
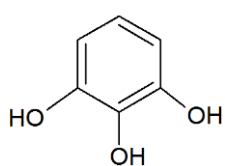


Figura 4.19. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Mezcla de 3 Tés en metanol.

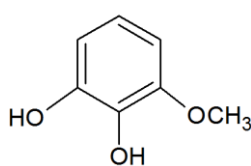
Capítulo 4

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
1,2,3-Bencenotriol	1.3869	1.524	7.45
Sacarosa	1.5581	4.898	24.05
Cafeína	2.451	93.333	459.22
Teobromina	2.4986	0.075	0.37

Esta Mezcla se compone de Té Verde, Rojo y Blanco. Se podría haber determinado el porcentaje de cada uno de los tipos de té presentes en la Mezcla si los tres hubieran sido del mismo fabricante, pero al ser el Té Blanco estudiado, de la casa comercial “Hornimans” en lugar de “Hacendado”, esto no se ha podido hacer. Sin embargo, se han obtenido datos muy interesantes para este producto, como por ejemplo, que es el té que presenta los valores más altos en compuestos como el 1, 2, 3-Bencenotriol y el 3-metoxi-1,2-Bencenodiol, compuestos que presentan una estructura con carácter claramente antioxidante:



1, 2, 3-Bencenotriol



3-metoxi-1,2-Bencenodiol

A continuación se muestran las tablas resumen comparativas entre los compuestos considerados más significativos de cada uno de los té, en extracto en agua y en metanol.

		Muestras de té - Extracto en agua				
		Blanco	Negro	Rojo	Verde	Mezcla
Compuesto (p.p.m./g)	Resorcinol	4.55	2.42	0.91	-	4.24
	2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	1.01	7.84	3.63	5.47	-
	3-metoxi-1,2-Bencenodiol	2.09	0.94	0.32	2.21	3.88
	1,2,3-Bencenotriol	40.48	45.82	11.11	37.25	46.93
	Vainillina	402.91	-	-	-	6.25
	Sacarosa	204.02	109.30	-	178.82	204.87
	Cafeína	1393.50	2069.05	1734.34	1471.51	1746.37
	Teobromina	4.47	37.71	6.45	2.57	30.33

		Muestras de té - Extracto en metanol				
		Blanco	Negro	Rojo	Verde	Mezcla
Compuesto (p.p.m./g)	1,2,3-Bencenotriol	31.88	3.54	-	33.89	7.45
	Vainillina	267.03	-	-	-	-
	Sacarosa	25.64	11.85	-	22.50	24.05
	Cafeína	697.60	650.92	467.52	1012.53	459.22
	Teobromina	5.52	1.53	0.08	0.82	0.37

4.4.2. Infusiones

4.4.2.1. Manzanilla

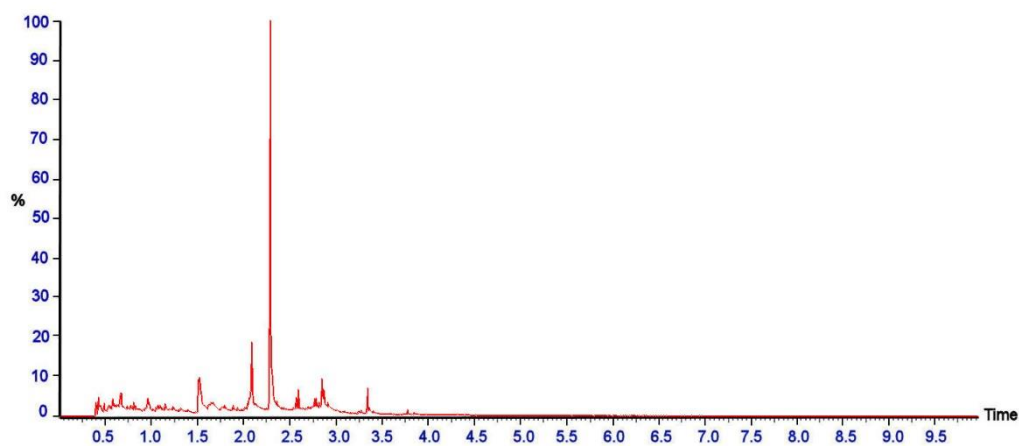


Figura 4.20. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Manzanilla en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
DL-Norvalina	0.4030	0.663	2.81
Butirolactona	0.5845	0.368	1.56
Glicerina	0.6466	2.937	12.42
2,4-Dihidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furan-3-ona	0.6550	0.364	1.54
Bencenoacetaldehído	0.7586	0.251	1.06
Timina	0.7937	0.752	3.18
1,2-Bencenodiol	1.0368	0.492	2.08
Indol	1.2764	0.137	0.58
3-Metil-p-anisaldehído	1.4931 - 1.4966	19.378	81.96
3-hidroxi-4-metoxi-Benzaldehído	1.5042	0.392	1.66
Megastigmatrienona	2.0226	0.228	0.96
4-hidroxi-3,5-dimetoxi-Benzaldehído	2.0777	0.125	0.53
7-metoxi-1-Benzopiran-2-ona	2.2649 - 2.2698	46.894	198.34
2-metil-5-Pirimidinol	2.2912	1.136	4.81

Capítulo 4

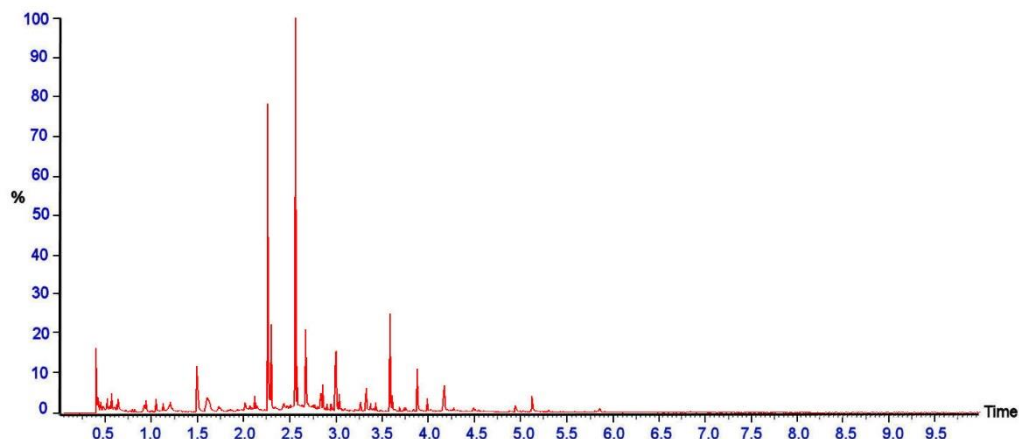
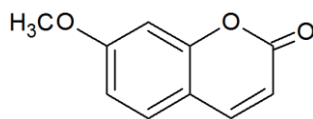


Figura 4.21. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Manzanilla en metanol.

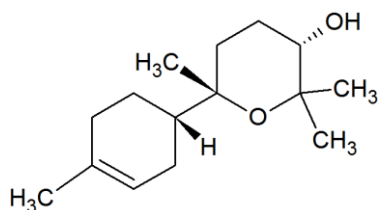
Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Isoxazol	0.3995	0.465	0.44
Glicerina	0.5873	1.045	0.98
Timina	0.725 - 0.746	0.240	0.23
2,6-Dimetil-4-hidroxibenzaldehído	1.4438	5.009	4.71
7-metoxi-1-Benzopiran-2-ona	2.2148	23.130	21.76
Óxido de Bisabolol A	2.2501	4.944	4.65
1,6-Dioxaspiro[4.4]non-3-ene,2-(2,4-hexadiinilidene)-	2.512 - 2.530	28.475	26.79
ácido n-Hexadecanoico	2.6228	5.052	4.75
Etenil-Ciclooctano	2.9459	6.344	5.97
Clindamicina	3.2815	0.769	0.72
Heptacosano	3.5412	6.524	6.14
Nonadecano	3.838	2.903	2.73

En ambos extractos uno de los compuestos mayoritarios es la 7-metoxi-1-Benzopiran-2-ona, o 7-metoxi-Cumarina. Las cumarinas son compuestos muy abundantes en las plantas herbáceas, funcionando como sistema de defensa, ya que poseen propiedades supresoras del apetito (contra los depredadores). También tienen propiedades antimicrobianas, captadoras de radiación UV e inhibidoras de la germinación.



7-metoxi-Cumarina

Hay que destacar también la presencia de óxido de Bisabolol A en el extracto en metanol. El bisabolol es uno de los componentes mayoritarios del aceite esencial de Manzanilla [10].



Óxido de Bisabolol A

El bisabolol se usa en cosmética por sus propiedades calmantes, cicatrizantes y antiinflamatorias. Su cantidad, varía dependiendo de la Manzanilla de la que se extraiga.

4.4.2.2. Menta-Poleo

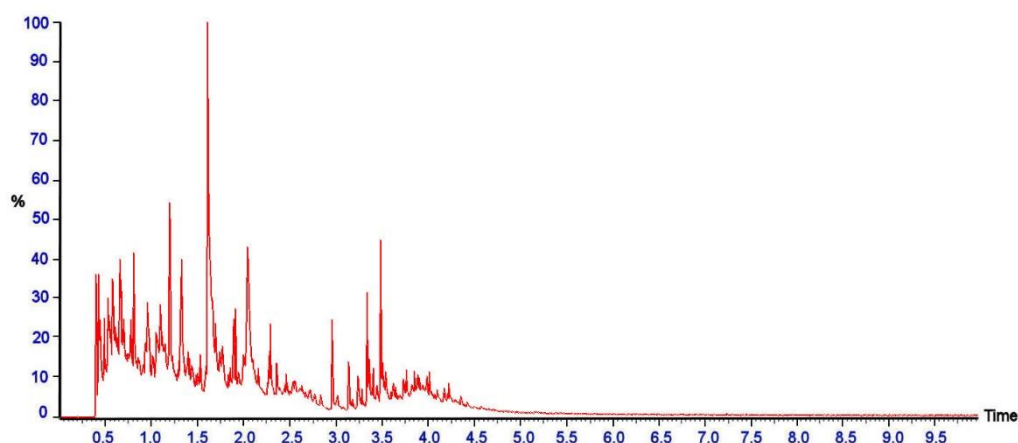


Figura 4.22. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Menta-Poleo en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Glicerina	0.6378	3.730	5.70
Bencenoacetaldehído	0.7587	0.809	1.24
Timina	0.7939	2.981	4.55
Ácido benzoico	0.9547	1.607	2.46
1,2-Bencenodiol + Resorcinol + Hidroquinona	1.0375	6.446	9.85
4-metil-Benzaldehído	1.0776	2.329	3.56
2-isopropil-5-metil-3-Ciclohexen-1-ona	1.1812	5.394	8.24
4-Hidroxi-2-metilacetofenona	1.304 - 1.311	5.386	8.23
2-hidroxi-6-metil-Benzaldehído	1.5919	15.688	23.97
1,2,3-Bencenotriol	1.982	0.532	0.81
(1 α ,2 β ,3 α ,5 β)-1,2,3,5-Ciclohexanotetrol	2.0255	10.533	16.09
α -D-Glucopiranosido, α -D-Glucopiranosilo	2.9409	2.494	3.81
Crotonic acid, menthyl éster	3.3201	2.666	4.07
Ácido Propanoico, 2-(Acetiloxi)-, 5-metil-2-(1-metiletil)ciclohexyl éster	3.472	3.478	5.31

Capítulo 4

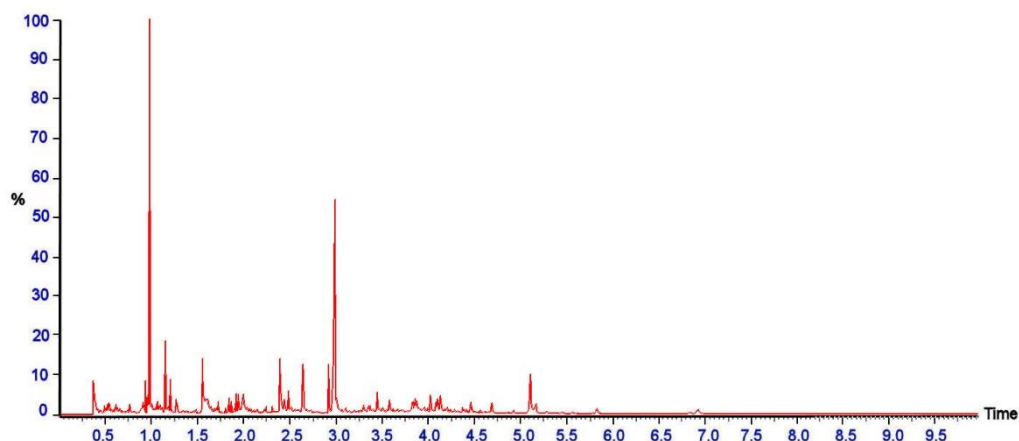


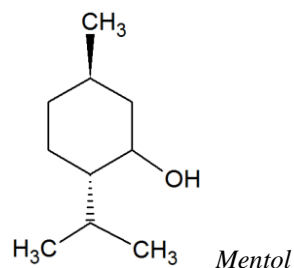
Figura 4.23. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Menta-Poleo en metanol.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Ácido benzoico	0.9037	0.166	0.51
trans-5-metil-2-(1-metiletil)-Ciclohexanona	0.9175	1.526	4.68
2R-trans-5-metil-2-(1-metiletil)-Ciclohexanona	0.9382	0.493	1.51
Ciclohexanol, 5-metil-2-(1-metiletil)-, [1R-(1 α ,2 β ,5 α)]-(MENTOL)	0.9589; 2.9	24.034	73.65
1,2-Bencenodiol + Resorcinol	0.9817	1.072	3.29
4-metil-Benzaldehído	1.0286	0.343	1.05
Mercaptofenol	1.0452	0.693	2.12
2-isopropil-5-metil-3-Ciclohexen-1-ona	1.1315	3.857	11.82
Salicilaldehído hidrazona	1.5334	4.087	12.52
Sacarosa	1.578-1.581	6.150	18.85
Óxido de Cariofileno	1.898	0.865	2.65
Veridiflorol	1.9257	0.761	2.33
3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	2.375-2.464	6.105	18.71
α -D-Glucopiranososa	2.6245	3.671	11.25
11,14,17-Eicosatrienoic acid, metil éster	2.967	19.345	59.28
Geranilgeraniol	4.0054	1.237	3.79
γ -Sitosterol	5.0881	4.074	12.48

En el extracto en agua se obtuvieron compuestos con actividad antioxidante, ninguno de ellos mayoritario, pero en proporciones nada despreciables: 1,2-Bencenodiol, Resorcinol, Hidroquinona, 4-Hidroxi-2-metilacetofenona y 2-hidroxi-6-metil-Benzaldehído, entre otros.

En el extracto en metanol, hay que destacar la presencia del Mentol, que es un compuesto muy representativo de esta planta [11], pero muy poco soluble en agua.

Además, esta molécula presenta un punto de inflamación de aproximadamente 93°C [12], lo que disminuye la cantidad que puede ser cuantificada, debido a las temperaturas empleadas en la técnica de cromatografía de gases.



4.4.2.3. Rooibos

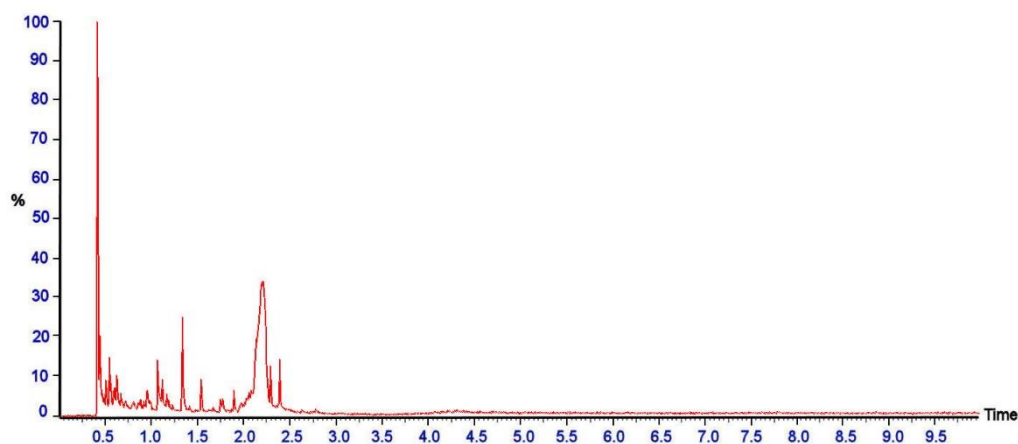


Figura 4.24. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Rooibos en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Gliceraldehído	0.51	1.699	0.82
1,2-Bencenodiol + Resorcinol	1.0355	2.938	1.41
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	1.0831	0.275	0.13
Ácido Bencenoacético	1.1322	0.436	0.21
Timol	1.3041	3.719	1.79
2,4-dihidroxi-6-metil-Benzaldehído	1.5064	1.061	0.51
2-C-metil-Myo-Inositol	2.167-2.180	62.635	30.06

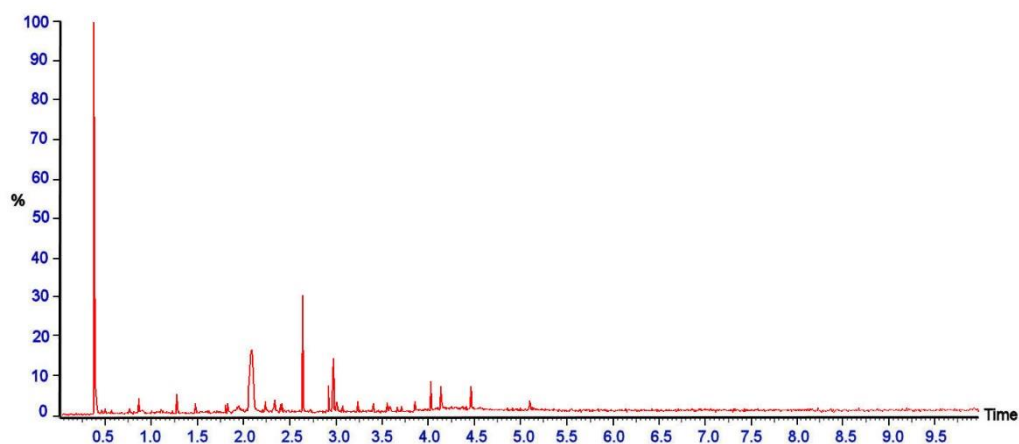


Figura 4.25. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Rooibos en metanol.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
3,6-dietil-1,2,4,5-Tetrazina	0.3582	13.723	1.72
Bencenoacetaldehído	0.8347	1.320	0.17
2,4-dihidroxi-6-metil-Benzaldehído	1.4499	0.821	0.10
Ácido 4-butoxi-Butanoic acid	2.0597	25.074	3.15
ácido n-Hexadecanoico	2.6161	10.333	1.30
Isomentol	2.8993	1.614	0.20
etenil-Ciclohexano	2.9407	3.564	0.45
Farnesol isómero a	4.0038	2.314	0.29
3,3-dimetil-Hexano	4.4396	2.392	0.30

Como puede observarse, los extractos fueron muy poco concentrados debido, probablemente, al carácter leñoso de la muestra, siendo uno de los picos más significativos el correspondiente al metanol (a 0.3853 minutos en el extracto en agua y a 0.3513 minutos en el extracto en metanol).

4.4.2.4. Salvia

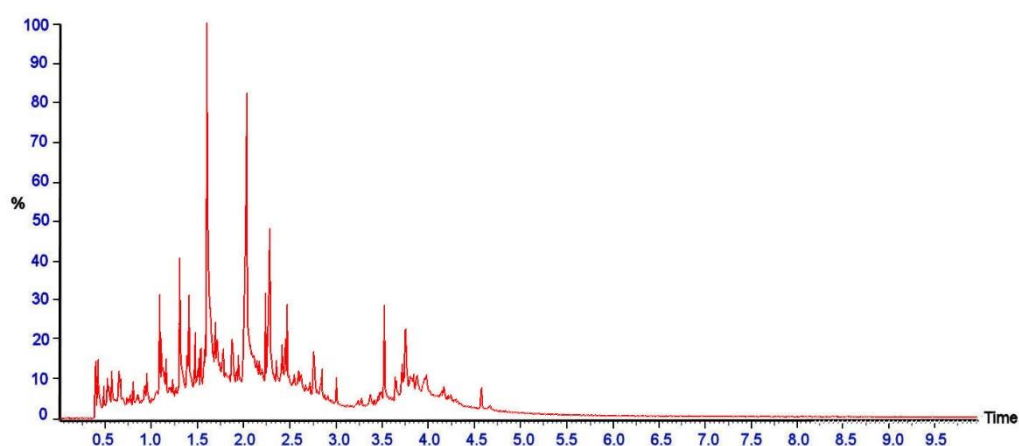


Figura 4.26. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Salvia en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Glicerina	0.6350	1.932	5.57
2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-Piran-4-ona	0.6551	0.396	1.14
Maltol	0.7930	0.919	2.65
1,2-Bencenodiol	1.0415	1.376	3.96
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	1.0760	3.650	10.51
1,3,3-trimetil-2-Oxabiciclo[2.2.2]octan-6-ol	1.097- 1.111	1.551	4.47
trans-p-Mentha-2,8-dienol	1.1154	0.206	0.59
2-Metoxi-4-vinil-Fenol	1.2977	5.090	14.66
trans-p-Mentha-2,8-dienol	1.4628	1.790	5.16
Bencenoethanol, 4-Hidroxi-	1.5587	1.249	3.60
3-hidroxi-2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído + 2-hidroxi-6-metil-Benzaldehído	1.5884	19.209	55.33
3,5-Dimetilanisole	1.5946	4.121	11.87
1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-Etanona	1.6996	1.660	4.78
Ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzoico	1.8693	1.858	5.35
2-Hidroximetil-5-(1-hidroxi-1-isopropil)-2-ciclohexen-1-ona	2.0220	20.931	60.29
1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-Etanona	2.2292	1.892	5.45
7-Acetil-2-hidroxi-2-metil-5-isopropilbiciclo[4.3.0]nonano	2.2643	1.309	3.77
Óxido de Cariofileno	2.2699	5.368	15.46
Ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoico	2.3893	0.245	0.71
6-Isopropenil-4,8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-naftalen-2-ol	2.4577	2.338	6.73
exo-2-Hidroxicineol	3.5123	3.445	9.92
5-Sec-butilpirogalol	3.7422	2.990	8.61
2-metoxi-4-(1-propenil)-Fenol	3.7524	0.709	2.04

Capítulo 4

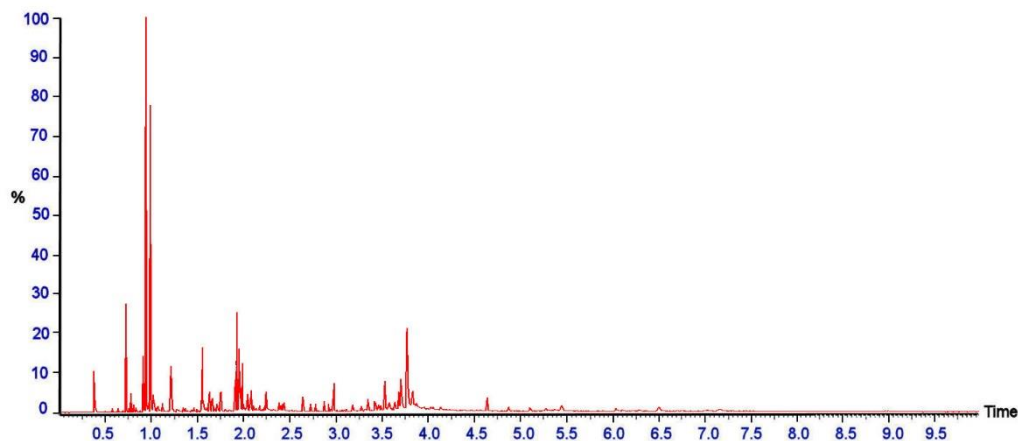
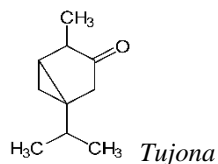


Figura 4.27. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Salvia en metanol.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Eucaliptol	0.6964	5.968	6.29
α -Pino	0.7516-0.8828	4.063	4.28
Tujona	0.9111-0.9167	32.339	34.07
Borneol	0.9588	18.175	19.15
(S)- $\alpha,\alpha,4$ -trimetil-3-Ciclohexen-1-metanol	0.9933	0.716	0.76
Bornyl Acetato	1.1867	2.340	2.47
1-metoxi-4-(1-propenil)-Benceno	1.1935	0.928	0.98
p-Menta-1(7),8(10)-dien-9-ol	1.5242	4.201	4.42
Óxido de Cariofileno	1.8978; 1.9599	8.586	9.05
Veridiflorol	1.9254	3.289	3.46
Ciclopropanecarboxilic acid, 2,2-dimetil-3-(2-metil-1-propenil)-,2-metil-4oxo-3-(2,4-pentadienil)-2-ciclopenten-1-yl éster, [1R-[1 α [S*(Z)],3 β]]-	3.6799	2.102	2.21
Pectolinaringenina	4.8523	0.195	0.21
4-metil-Benzaldehído	5.254	0.085	0.089

En el extracto en agua hay una gran variedad de compuestos en cantidades moderadas, considerándose mayoritarios los que tienen abundancias en torno al 20%. De ellos, el que presenta un mayor carácter oxidante es, probablemente, la Mezcla de 3-hidroxi-2-metil-benzaldehído + 2-hidroxi-6-metil-benzaldehído, ya que tienen grupos hidroxilo en un anillo aromático, fácilmente oxidables.



En el extracto en metanol, hay que destacar el pico de la Tujona, que representa más de un 32 % del extracto. Este compuesto es el más abundante en el aceite esencial de Salvia

[13], presenta un olor similar a la Menta, y puede encontrarse en diversas especies de plantas, como el Ciprés de Nootka, algunos enebros, artemisa, tanaceto, ajeno, algunas especies de Menta y por supuesto, en la Salvia común.

Aunque uno de los componentes más abundantes en el aceite esencial de Salvia es el alcanfor (véase capítulo 1), este compuesto tiene un punto de inflamabilidad muy bajo, por lo que no aparece en ninguno de los dos cromatogramas.

4.4.2.5. Tila

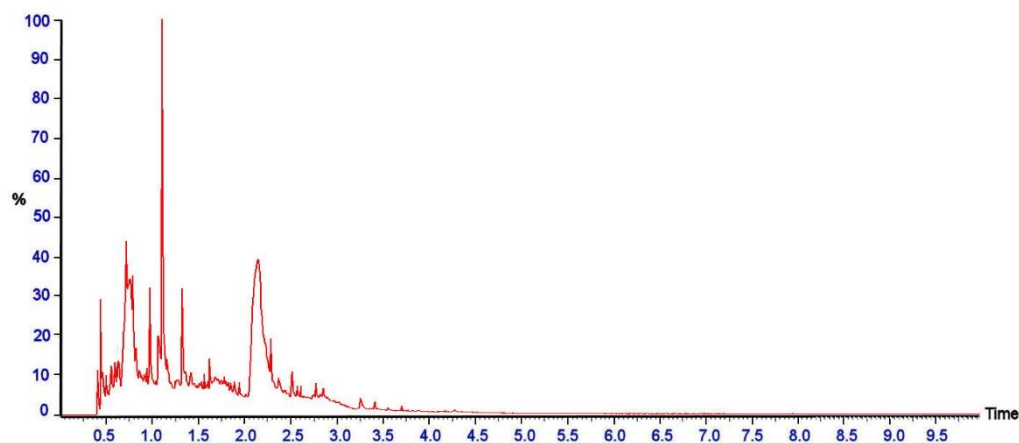


Figura 4.28. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Tila en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Sacarosa + Xilitol	0.7227	17.082	111.89
Phtalano	0.7585	0.749	4.91
2-metoxi-Fenol	0.8365	0.333	2.18
2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-Piran-4-ona	0.945	2.009	13.16
Ácido benzoico	0.9532	0.453	2.97
1,2-Bencenodiol	1.0374	2.990	19.59
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído + 3-metil Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	1.0768	8.436	55.26
1,2,4-Bencenotriol + 1,3,5-Bencenotriol	1.1003	0.931	6.10
Hidroquinona	1.2218	0.344	2.25
1-(2-hidroxi-5-metilfenil)-Etanona	1.2978	1.941	12.71
3-hidroxi-4-metoxi-Benzaldehído	1.5043	0.107	0.70
Ácido 4-(1-metiletil)-benzoico	1.5387	0.304	1.99
2-hidroxi-6-metil-Benzaldehído	1.5947	0.778	5.10
Ácido 4-hidroxi-benzoico	1.7237	0.550	3.60
Ácido 4-hidroxi-3-metoxi-Bencenoacético	2.0574	0.290	1.90
(1 α ,2 β ,3 α ,5 β)-1,2,3,5-Ciclohexanotetrol	2.085-2.132	47.245	309.47
Cafeína	2.487-2.491	1.126	7.37
Desaspidinol	2.7473	0.095	0.62

Capítulo 4

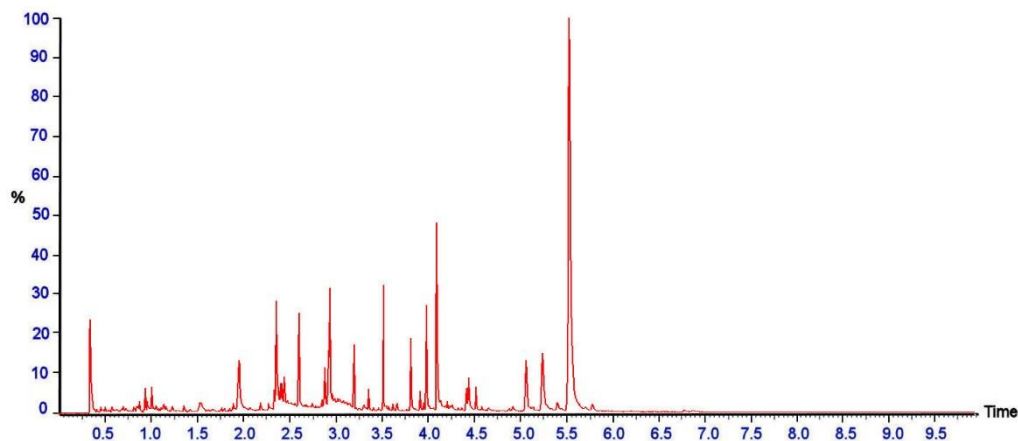
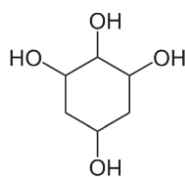


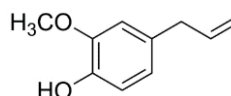
Figura 4.29. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Tila en metanol.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Timina	0.7445	0.095	0.27
Mentol	0.9523	0.557	1.58
1,2-Bencenodiol	0.9751	0.752	2.13
4-metil-Benzaldehído	1.0214	0.750	2.12
Eugenol	1.374-1.559	2.390	6.77
Hexilresorcinol	1.9059	0.250	0.71
2-Hidroxi-5-metilsoftalaldehído	2.3519	0.742	2.10
Cafeína	2.4376	0.389	1.10
Isomentol	2.8989	1.548	4.39
Mirtenol	2.9540	2.814	7.97
Inositol	3.1309	2.769	7.85
Bencenoacetaldehído	3.1744	0.068	0.19
α -D-Glucosa	3.6383	0.101	0.29
Lauroil peróxido	3.9353	0.533	1.51
Farnesol	4.0036	4.040	11.45
Vitamina E	4.5424	0.878	2.49
γ -Sitosterol	5.0824	3.238	9.18
β -Amirina	5.5525	40.783	115.53

El pico más intenso para el extracto en agua corresponde a una Mezcla de metil-benzaldehídos. La mayor señal es una banda ancha del 1,2,3,5-Ciclohexanotretol:

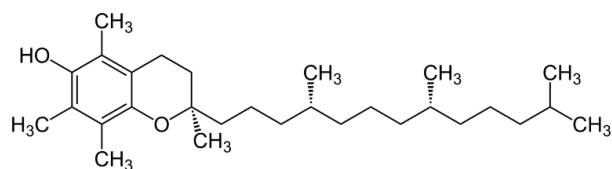


1,2,3,5-ciclohexanotretol



Eugenol

En el extracto en metanol destaca la presencia de benzaldehídos y alcoholes policíclicos, así como antioxidantes en pequeñas cantidades, como la vitamina E y el Eugenol [14].



Vitamina E

4.4.3. Especies

4.4.3.1. Albahaca

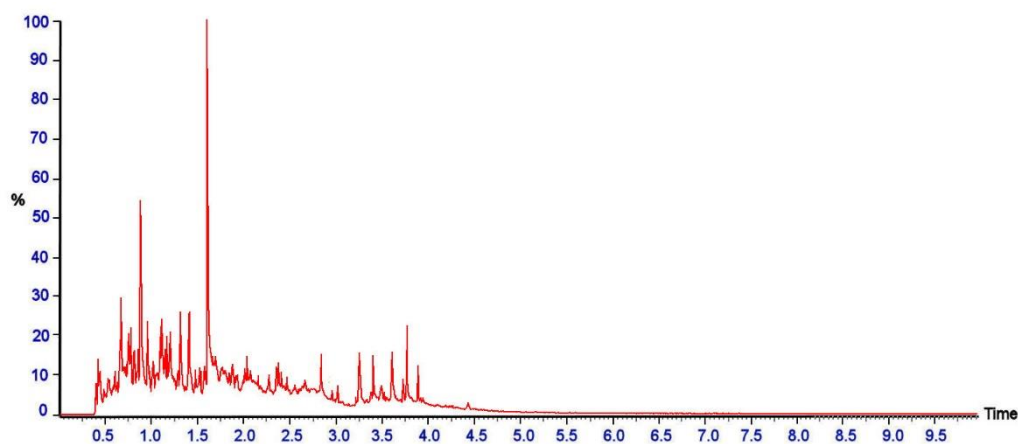


Figura 4.30. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Albahaca en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia(%)	p.p.m.
Glicerina	0.6558	5.465	22.82
β -Pino	0.6628	1.500	6.26
3,4-Dimetildihidrofuran-2,5-diona	0.7083	1.160	4.84
α -Pino	0.7256 – 0.745	2.456	10.26
Bencenoacetaldehído	0.765	1.703	7.11
2(1H)- 6-hidroxi-Piridinona	0.8636 - 0.9195	12.256	51.18
2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-Piran-4-ona	0.9457	2.149	8.97
BenzoylÁcido Formico	0.9671	0.600	2.51
1,2-Bencenodiol + Resorcinol	1.0438 – 1.0562	2.154	8.99
3-metil-Benzaldehído	1.0838	1.905	7.96
4-(2-propenil)-Fenol// 4-(2-propenil)-Fenol acetato	1.1598	1.498	6.25
Hidroquinona	1.224	0.065	0.27
Indol	1.2828	0.408	1.70
1-(2-hidroxi-5-metilfenil)-Etanona	1.3048	2.542	10.61
Ácido Cinámico	1.4291	0.133	0.56
Ácido trans-Cinámico	1.5658	1.193	4.98

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia(%)	p.p.m.
2-hidroxi-6-metil-Benzaldehído + 2-hidroxi-5-metil-Benzaldehído+ 2-hidroxi-4-metil-Benzaldehído	1.5956 - 1.7197	22.441	93.70
Ácido 3-Hidroxi-4-metoxibenzoico	1.8709	0.326	1.36
Ácido 4-Hidroxi-3metoxibencenoacético	2.0635	0.312	1.30
Ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-Benzoico	2.4019	0.499	2.08
β-Mirceno	3.2096	0.178	0.74
Benzyl β-d-glucoside	3.2441 - 3.396	4.063	16.96
4-(2-propenil)-Fenol	3.6012 - 3.7212	3.169	13.23
2-metoxi-4-(2-propenil)- Fenol acetato + 2-metoxi-4-(1-propenil)-Fenol	3.762 - 3.9346	3.821	15.96

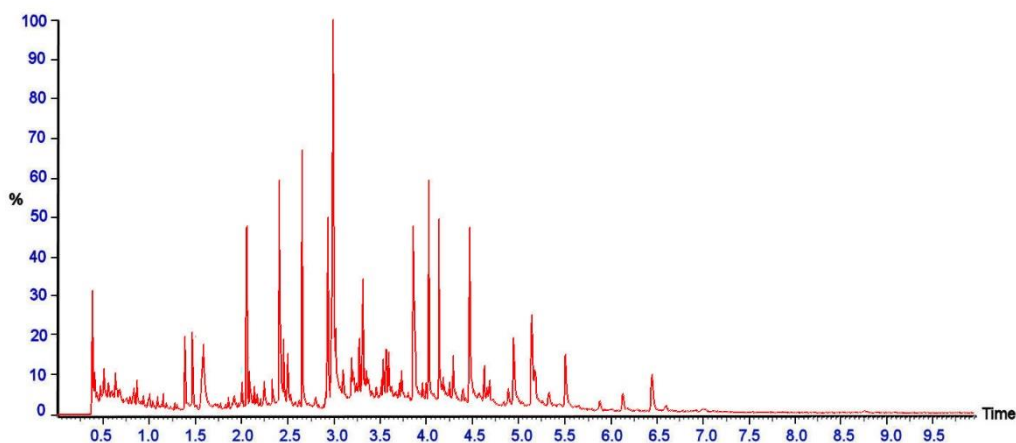
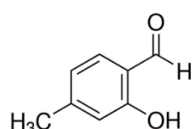


Figura 4.31. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Albahaca en metanol.

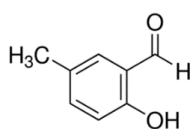
Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
β-Pineno	0.8326	0.430	0.54
Indol	1.2779	0.177	0.22
Eugenol	1.3878	1.429	1.79
Ácido 4-etenil-benzoico, metil éster	1.4706	2.033	2.55
Cadinol	2.0574	3.077	3.86
Bergamoteno	2.0615	4.806	6.03
3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	2.4164 - 2.464	7.546	9.47
ácido n-Hexadecanoico	2.6637	8.117	10.18
Fitol	2.9399	5.3939	6.77
cis,cis,cis-7,10,13-Hexadecatrienal	2.9965	10.956	13.74
Ácido 3-fenil-2-Propenoico, metil éster	3.2817 - 3.319	5.705	7.16
Acetil eugenol	3.7408	0.814	1.02
Eicosano	3.8658	4.501	5.65
2-metilen-Ciclododecanona	3.8728	3.637	4.56

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Escualeno	4.0384	5.274	6.62
2-metil-Octadecano	4.1489	4.786	6.00
Eicosano	4.4804	5.098	6.39
2-metil-Dodecano	4.9546	2.456	3.08
β -Sitosterol	5.1549	3.458	4.34
Ácido (+)-3-oxo-Urs-12-en-24-oico, metil éster	5.5179	2.471	3.10

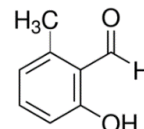
En el extracto en agua, el pico principal correspondió a la Mezcla de tres compuestos con carácter antioxidante [15], los cuáles representaban más del 22% del extracto:



2-hidroxi-4-metil-Benzaldehído

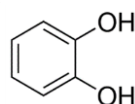


2-hidroxi-5-metil-Benzaldehído

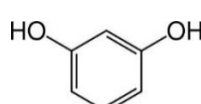


2-hidroxi-6-metil-Benzaldehído

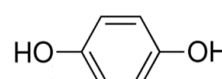
Además de éstos, también se pudo confirmar la presencia (aunque en menor cantidad que los anteriores compuestos), de antioxidantes naturales de gran importancia:



1,2-Bencenodiol

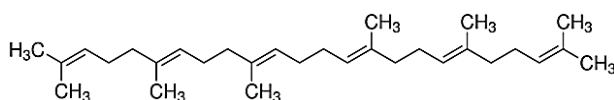


Resorcinol

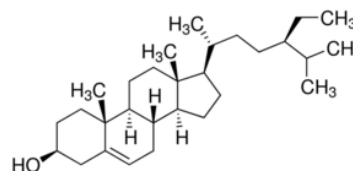


Hidroquinona

En el extracto en metanol, se obtuvo gran cantidad de compuestos aromáticos, entre los que cabe destacar un compuesto típico (aunque en pequeñas cantidades) de la Albahaca como es el α -Bergamoteno y el Eugenol [15], uno de los antioxidantes naturales más extendidos.



Escualeno



β -Sitosterol

También hay que tener en cuenta la presencia de Escualeno (descubierto en el aceite de hígado de tiburón) que no solo presenta actividad antioxidante [16], sino que es parte vital de la síntesis de los esteroides, incluyendo el colesterol, las hormonas esteroideas, y la vitamina D. La capacidad antioxidante del escualeno, se ve favorecida si se combina con algún alimento rico en α -Tocoferol o “vitamina E” (como espinacas, brócoli, huevo,

Capítulo 4

nueces, levadura de cerveza,...), ya que al combinar dichos compuestos, se produce un efecto sinérgico en sus capacidades antioxidantes [17], aun así, la cantidad real de vitamina E presente en una muestra es difícil de cuantificar por cromatografía de gases según nuestro método de trabajo establecido, debido a que presenta un punto de inflamación en torno a 110-115°C [18]. También presenta en su composición β -Sitosterol, que es un pro-oxidante [17].

4.4.3.2. Canela en polvo

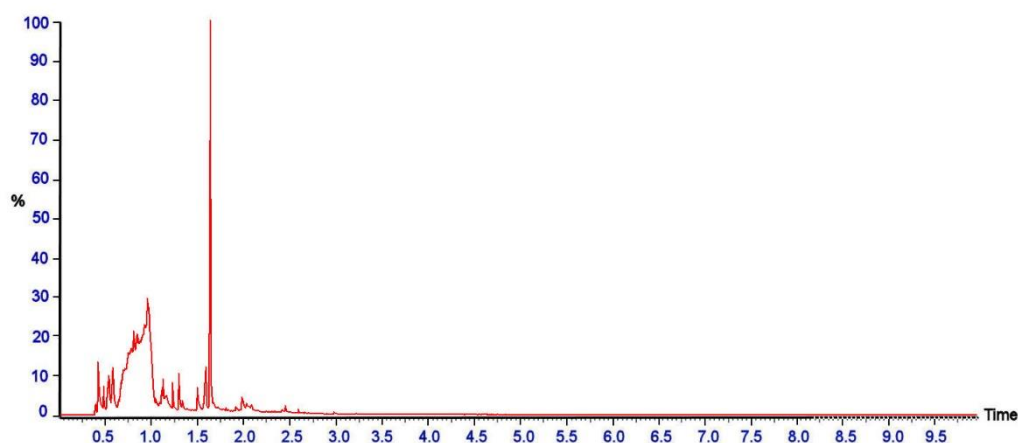


Figura 4.32. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Canela en polvo en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
2-Amino-1,3-propanodiol	0.4072 - 0.4203	7.545	43.63
2-Furanmetanol	0.526	2.741	15.85
Glicerina	0.6289 - 1.028	17.925	103.66
1,2-Bencenodiol + Resorcinol	1.037 - 1.0778	1.609	9.30
trans-tetrahidro-3,4-Furanodiol	1.1482 - 1.2028	2.886	16.69
Hidroquinona	1.2028	0.102	0.59
(E)-Cinamaldehído	1.2222	2.072	11.99
3-fenil-2-Propen-1-ol	1.2836 - 1.2905	2.377	13.74
1-Hidroxi,1-fenil-2-propanona	1.4374	0.052	0.30
3,4-dihidro-1-Benzopiran-2-ona	1.4913 - 1.5307	2.644	15.29
Ácido trans-Cinámico	1.5727 - 1.5782	5.915	34.21
1-Benzopiran-2-ona	1.6279 - 1.67	32.068	185.46
trans-4-Metoxi-Cinamaldehído	1.802	0.092	0.53
4-propil-1,3-Bencenodiol	1.976 - 2.0285	3.075	17.79

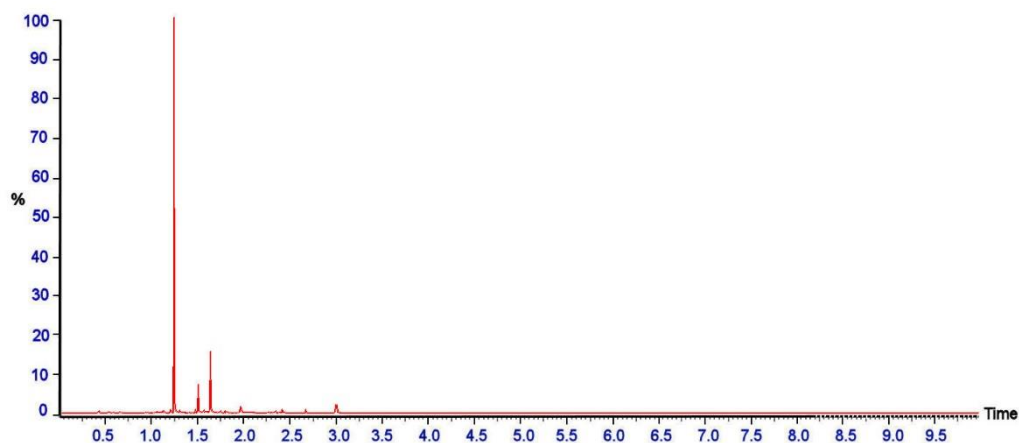
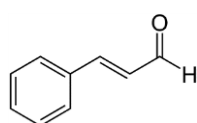


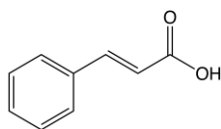
Figura 4.33. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Canela en polvo en metanol.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
1,2-Bencenodiol, mono(metilcarbamato)	1.0822	0.104	0.29
(E)-Cinamaldehído	1.0974 - 1.2831	73.349	205.55
Ácido trans-Cinámico	1.4834 - 1.5449	5.357	15.01
1-Benzopiran-2-ona	1.6146	11.844	33.19

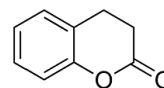
En el extracto acuoso para la Canela en polvo, se obtuvieron compuestos antioxidantes vistos anteriormente, como el 1,2-Bencenodiol, Resorcinol e Hidroquinona, además de los característicos de esta especie [5, 15], lo que proporciona a esta especie una alta capacidad antioxidante [19].



Cinamaldehído



Ácido Cinámico



Benzopiran-2-ona ó Cumarina

Debido a la baja solubilidad del Cinamaldehído en agua sólo una pequeña fracción de éste forma parte del extracto acuoso. El grupo carboxilo del ácido Cinámico, le confiere una mayor polaridad a la molécula, permitiendo una mejor extracción con agua que con metanol. El compuesto extraído en agua, de forma mayoritaria fue la Benzopiran-2-ona o Cumarina. Es una benzopirona presente en gran cantidad de plantas, entre ellas, la *Cinnamomum cassia*. Al contrario que ésta, la *Cinnamomum zeylanicum*, contiene muy bajas concentraciones de Cumarina [20-21].

En el extracto en metanol las proporciones de Cumarina y ácido Cinámico son menores y la del Cinamaldehído, mayor, por la menor polaridad del metanol respecto al agua.

Capítulo 4

4.4.3.3. Canela en rama

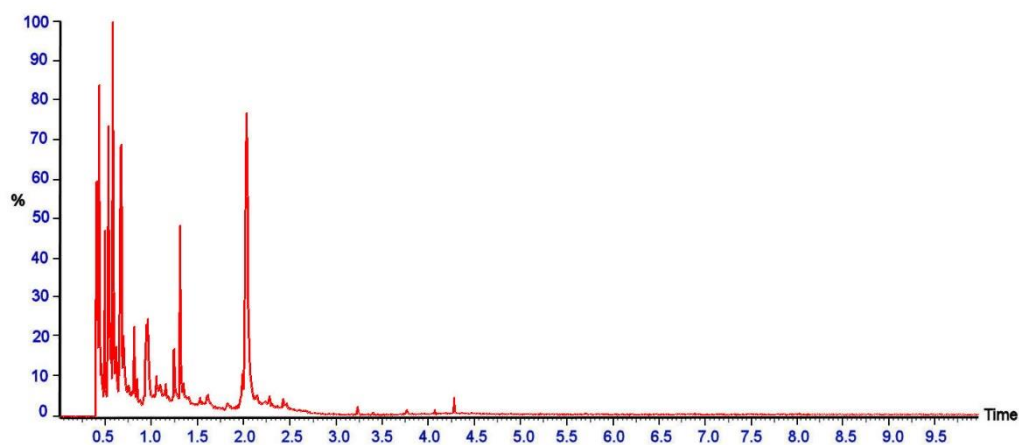


Figura 4.34. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Canela en rama en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
ácido 2-Propenoico, 2-Hidroxietil éster	0.4688	5.025	3.87
dl-Gliceraldehído	0.5095	8.863	6.83
Glicerina	0.642-0.655; 0.926	20.809	16.04
1,2-Bencenodiol + Resorcinol	1.0370-1.0777	2.107	1.62
Hidroquinona	1.1302	0.277	0.21
Cinamaldehído	1.2227	7.149	5.51
4-propil-1,3-Bencenodiol	1.962	1.355	1.04
(1 α ,2 β ,3 α ,5 β)-1,2,3,5-Ciclohexanotetrol	2.0076	24.650	19.00

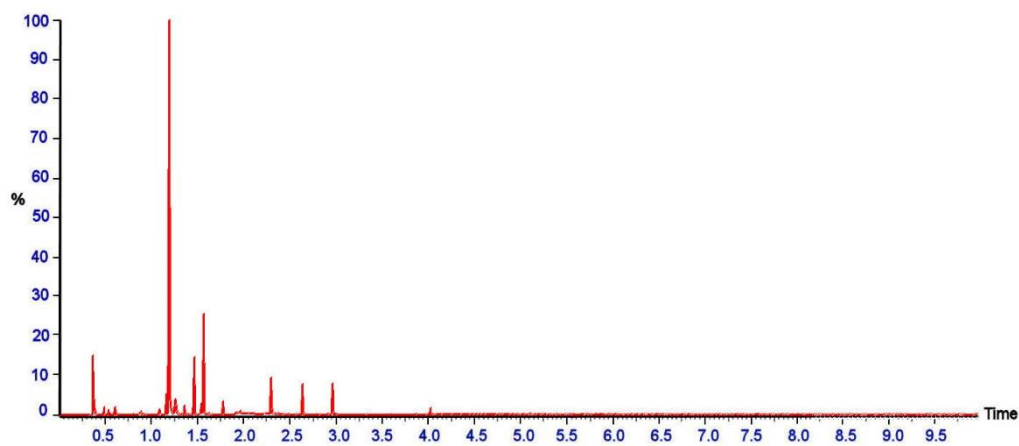


Figura 4.35. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Canela en rama en metanol.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
dl-Gliceraldehído	0.4687 - 0.8684	3.275	2.02
(E)-Cinamaldehído	1.1791; 1.4483	56.240	34.74
Eugenol	1.3454	0.839	0.52
(Z,Z)- α -Farneseno	1.525	0.982	0.61
3-fenil-2-Propen-1-ol, acetato	1.5525	11.235	6.94
Bencil Benzoato	2.285	4.450	2.75
ácido n-Hexadecanoico	2.6226	3.320	2.05
Etenil-Ciclooctano	2.947	3.554	2.20

Los extractos de Canela en rama, fueron mucho menos concentrados que los de Canela en polvo, lo que se hace evidente al comparar el pico del metanol en los cromatogramas.

Para el extracto acuoso, se obtuvieron de nuevo 1,2-Bencenodiol, Resorcinol e Hidroquinona, pero no ácido Cinámico, el cual proviene posiblemente de la oxidación del Cinamaldehído, por ruptura celular de la Canela en la molienda, proceso que no se da en la Canela en rama.

De nuevo, en esta muestra se obtiene una mayor cantidad de Cinamaldehído en el extracto en metanol; además, en este caso se obtuvo una pequeña cantidad de Eugenol.

4.4.3.4. Clavo

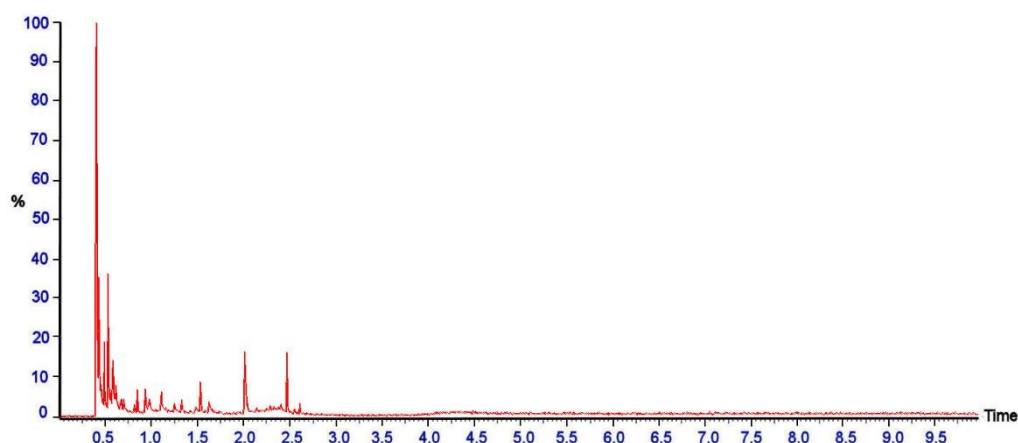


Figura 4.36. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Clavo en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Trimetilamina + Ácido Fórmico hidrazida	0.4079 – 0.4348	12.033	1.59
ácido 2-Propenoico, 2-Hidroxi-etil éster	0.4686	5.815	0.77
dl-Gliceraldehído	0.51	12.170	1.60
2-Amino-3-metil-1-butanol	0.5631	6.085	0.80
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	1.088	2.346	0.31
3-hidroxi-4-metoxi-Benzaldehído	1.5118	2.226	0.29

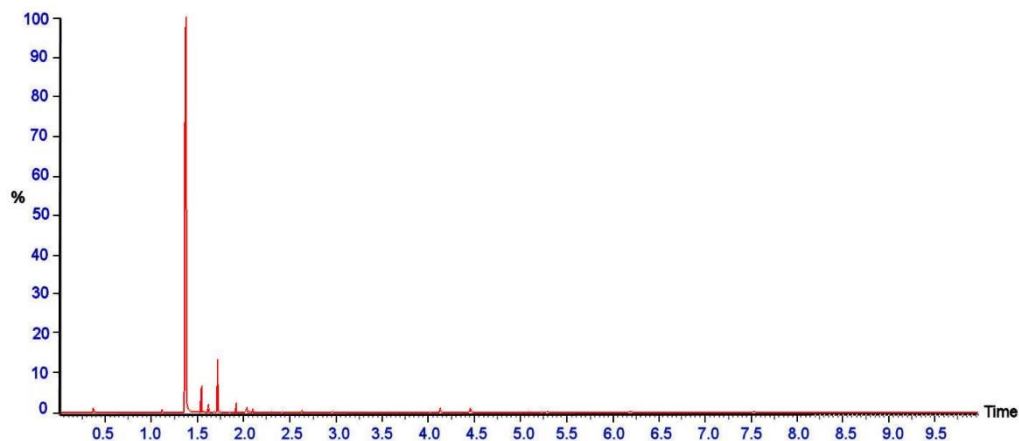


Figura 4.37. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Clavo en metanol.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Eugenol	1.3478-1.4079; 1.6979	90.905	1056.39
Cariofileno	1.519	1.568	18.22
α -Cariofileno	1.6012	0.695	8.08
α -Farneseno	1.6634	0.051	0.59
Óxido de Cariofileno	1.898; 078	1.173	13.63

El Clavo es de carácter leñoso (como la Canela en rama y la infusión de Rooibos) y el cromatograma del extracto en agua es especialmente pobre, ya que el componente mayoritario es el Eugenol [19]. Por el contrario, en el extracto en metanol, se obtuvieron dos picos correspondientes a este antioxidante natural [5], cuya abundancia fue superior al 90%.

4.4.3.5. Comino

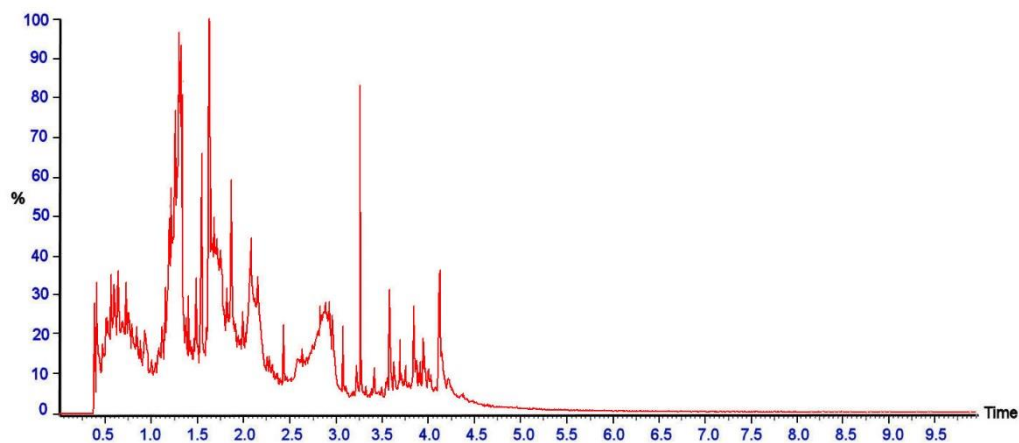


Figura 4.38. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Comino en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Bencenoacetaldehído	0.7605	0.277	0.80
Timina	0.7943	1.418	4.11
Mirtenol	1.1457	0.705	2.04
4-(1-metiletil)-Benzaldehído	1.158; 1.621-1.632	19.741	57.23
4-(1-metiletil)-Bencenometanol	1.2556	0.972	2.82
Alotreonina	1.2963	21.202	61.47
Trans-2-metil-5-(1-metiletil)-Ciclohexanona	1.3384	2.139	6.20
2,6-dimetil-Fenol	1.4081	0.608	1.76
Ácido 4-(1-metiletil)-benzoico	1.5454 - 1.5509	4.690	13.60
4-etil-2-metoxi-Fenol	1.5882	0.214	0.62
o-Metoxi- α,α -dimetilbenzyl alcohol	1.649	0.927	2.69
Fenol, 2-(1,1-dimetiletil)-6-metil-	1.8215	0.469	1.36
4-Metil-2,5-dimetoxiBenzaldehído	1.8636	0.528	1.53
3-Fenil-3-pentanol	1.8705	2.324	6.74
(1 α ,2 β ,3 α ,5 β)-1,2,3,5-Ciclohexanotetrol	2.0707 - 2.0845	4.995	14.48
4-((1E)-3-Hidroxi-1-propenil)-2-metoxiFenol	2.2571	0.092	0.27
2,5-O-Metilen-D-manitol	2.5739 - 2.5823	2.205	6.39
Inositol	2.8909 - 2.9813	6.727	19.50
4-(3,3-Dimetil-but-1-inil)-4-Hidroxi-2,6,6-trimetilciclohex-2-enona	3.2713	4.819	13.97
cis-Pinen-3-ol	3.4223	0.388	1.12

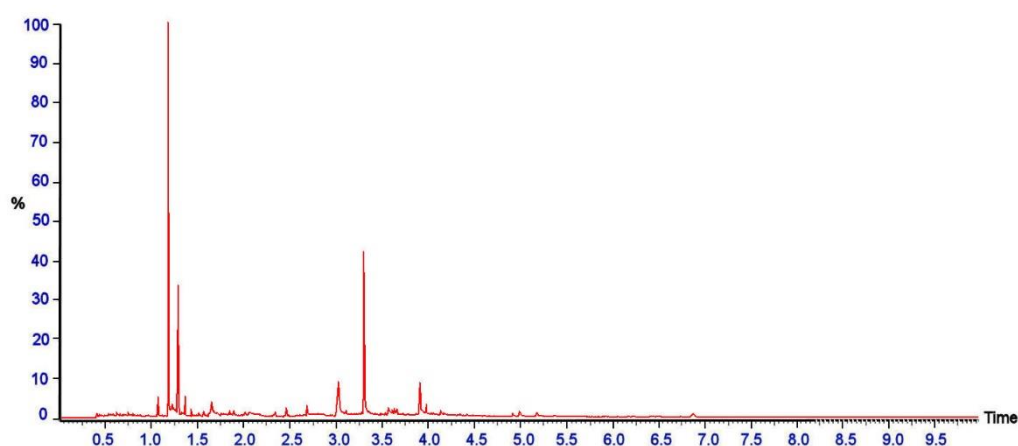
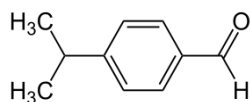


Figura 4.39. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Comino en metanol.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
β -Pino	0.6682	0.047	0.51
4-(1-metiletil)-Benzaldehído	1.159;1.545	38.816	416.43
1,2,4-Butanotriol	1.193	2.708	29.05
trans-Shisool	1.2005	0.489	5.25
4-(1-metiletil)-Bencenometanol	1.256-1.259	5.221	56.01

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
2-Caren-10-al	1.2619	12.650	135.72
4-(1-metiletil)-1,4-Ciclohexadieno-1-metanol	1.3386	1.815	19.48
Ácido 4-metil-benzoico, 2-hidroxi-2-fenilpropil éster	1.4911	0.251	2.70
Mequinol	1.5526	0.035	0.37
Ácido 3,4-diHidroxi-Bencenoacético	1.6272	1.285	13.79
2-(1,1-dimetiletil)-6-metil-Fenol	1.8219	0.361	3.90
Carotol	1.9883	0.124	1.33
2,4,6-trimetil-Fenol + 2,3,6-trimetil-Fenol	2.299-2.318	0.633	6.79
4-Hidroxi-2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído + 4-Hidroxi-3-metil-Benzaldehído	2.4634	0.030	0.33
Fitol	2.9404	0.107	1.15
Ácido Oleico	2.992-3.355	10.811	115.98
(Z)-9,17-Octadecadienal	3.8849	5.322	57.09
dl- α -Tocoferol	4.5932	0.068	0.73
Vitamina E	4.895-4.901	0.672	7.21
Estigmasterol	4.9714	0.967	10.37
β -Sitosterol	5.1578	0.721	7.74

Para el extracto de Comino, se cuantificaron una gran cantidad de compuestos aromáticos, siendo el principal, en el extracto en metanol donde es soluble, el 4-(1-metiletil)-Benzaldehído o Cuminaldehído, típico del Comino, y con carácter antioxidante [22, 23]:



4-(1-metiletil)-Benzaldehído o Cuminaldehído

4.4.3.6. Cúrcuma

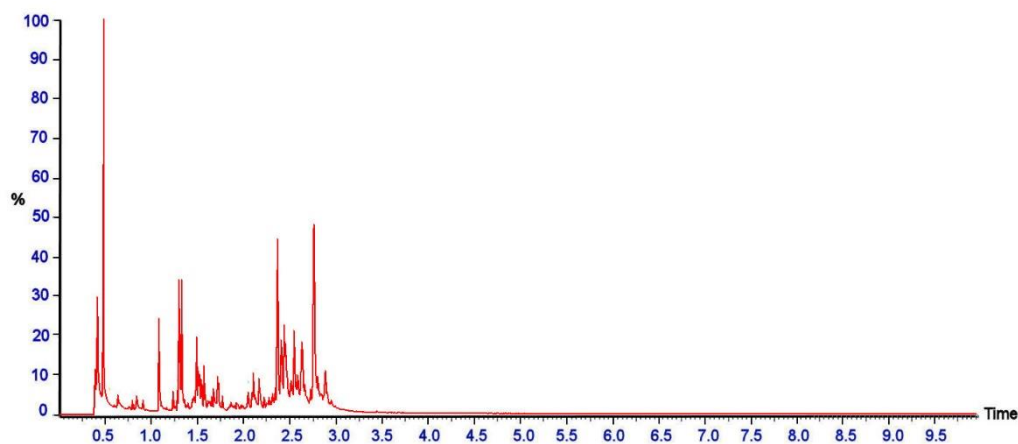


Figura 4.40. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Cúrcuma en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
(S)-1,3-Butanodiol + Ácido Propanoico, butil éster	0.4751	23.764	52.81
Fenol	0.6504	0.736	1.64
Ácido Málico	0.786-0.807	0.561	1.25
2-metoxi-Fenol	0.8361	1.366	3.04
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	1.0763	5.821	12.94
2-Metoxi-4-vinil-Fenol + Timol	1.298 - 1.3042	8.340	18.53
Eugenol	1.3946	0.141	0.31
(E)-3(10)-Caren-4-ol	1.49	3.434	7.63
2,4-dihidroxi-6-metil-Benzaldehído + 2-Hidroxi-4-metoxi-Benzaldehído	1.5052 - 1.5114	1.179	2.62
4-propil-2-metoxi-Fenol	1.6295	0.233	0.52
Biciclo[2.2.1]heptan-2-ol	1.9672	0.099	0.22
Inositol (varios tipos) + Glucosa	2.0362	0.239	0.53
4-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-2-Butanona + 4-(3-Hidroxi-2-metoxifenil)-2-Butanona	2.0507	0.768	1.71
Ar-tumerona	2.086-2.091; 2.397; 2.416- 2.511; 2.660- 2.948	27.812	61.81
Ácido 4-Hidroxi-3-metoxi-Bencenoacético, metil éster	2.1059	1.424	3.16
Ar Tumerona + Tumerona	2.4021	2.918	6.49
(Ar-Tumerona) + 1,7-bis(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-Heptadien-3,5-diona	2.4096	0.535	1.19
2,5-dimetil-Bencenometanol	2.5478	3.219	7.15

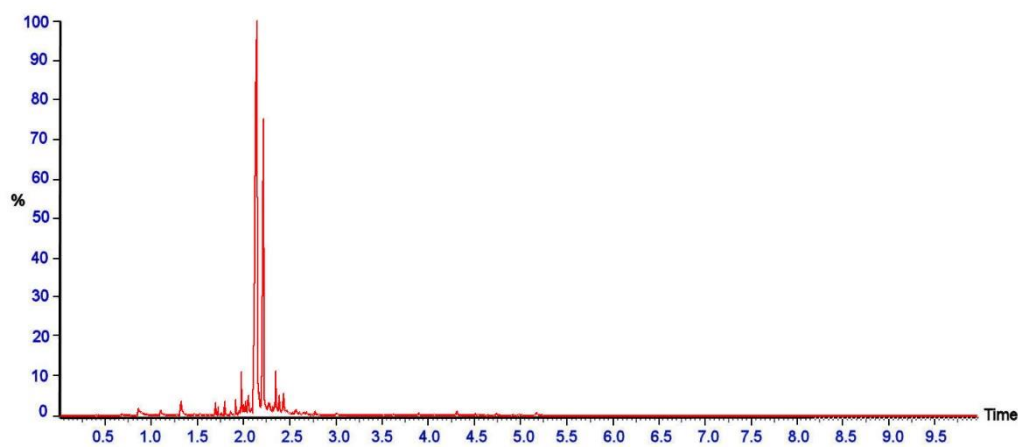
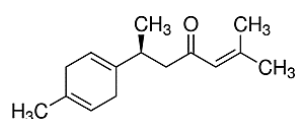


Figura 4.41. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Cúrcuma en metanol.

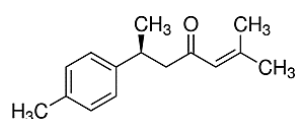
Capítulo 4

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
2-metoxi-Fenol	0.842 - 1.021	1.577	188.64
Mequinol	1.0279	0.030	3.60
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	1.078 - 1.152	0.016	1.87
Timol	1.241 - 1.263	0.055	6.54
2-Metoxi-4-vinil-Fenol + Timol	1.3075- 1.332	2.253	269.54
4-Hidroxi-Benzaldehído	1.4442	0.021	2.45
3-hidroxi-4-metoxi-Benzaldehído	1.5119	0.065	7.79
Z- α -trans-Bergamotol	1.787-1.850	0.784	93.75
o-(3-metilbut-2-enoil)-1,2-Bencenodiol	1.944; 2.322	0.099	11.88
8-Cedren-13-ol	1.954 - 1.972	2.204	263.67
Cedreno	1.9876	0.182	21.82
5-metil-2-(1-metil-1-feniletil)-Ciclohexanol	2.008 - 2.015	0.461	55.13
Curlona	2.0422	0.713	85.30
trans-Longipinocarveol	2.0725	0.251	30.00
Ar-tumerona	2.1042-2.1263; 2.1463-2.1587; 2.2092-2.2575	48.269	5775.72
Ar-tumerona + Tumerona	2.1305; 2.188-2.200; 2.284-2.305	34.300	4104.17
1-[3-(2,6,6-Trimetil-ciclohex-2-enil)-4,5-dihidro-3H-pirazol-4-il]-etanonea	2.339	2.255	269.77
1,7-bis(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-Heptadieno-3,5-diona	2.4232- 2.4273	1.023	122.38
Benzestrol	2.5254	0.017	1.99
Vitamina E	4.598	0.007	0.89
Estigmasterol	4.977	0.068	8.08
β -Sitosterol	5.1655	0.292	34.96
γ -Sitosterol	5.1676	0.291	34.76

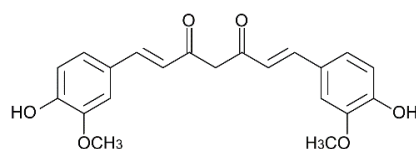
En los extractos de Cúrcuma se identifican antioxidantes como Eugenol, 2,4-dihidroxi-6-metil-Benzaldehído, 2-hidroxi-4-metoxi-Benzaldehído, Timol, 3-hidroxi-4-metoxi-Benzaldehído, Vitamina E, etc, aunque los principales compuestos extraídos fueron la Ar-Tumerona (o Ar-Turmerona); la Tumerona (o Turmerona) y la 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-Heptadieno-3,5-diona (o Curcumina), siendo los tres capaces de desarrollar una actividad antioxidante en el organismo [24-26].



Tumerona



Ar-Turmerona



Curcumina) (forma ceto)

Los compuestos curcuminoides actúan como eliminadores de radicales superóxido así como desactivadores del oxígeno molecular, de ahí que presenten actividad antioxidante [26]. Son también los responsables del color amarillo de la Cúrcuma [27].

4.4.3.7. Jengibre

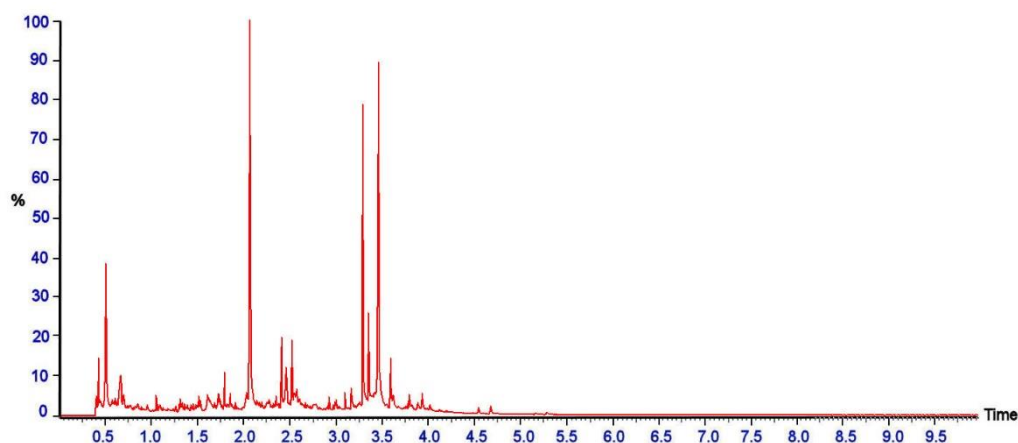


Figura 4.42. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Jengibre en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Hexanal	0.4886	7.334	41.56
Glicerina	0.6288-0.6432	4.126	23.38
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído + 3-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	1.076	0.235	1.33
Ácido BencenoPropanoico, α -Hidroxi-	1.1258	0.047	0.27
Vainillina	1.4978	0.518	2.94
3-metoxi-2,5,6-trimetil-Fenol	1.7111	0.399	2.26
α -Bisabolol	1.7733	1.342	7.60
Etil α -d-Glucopiranosido	2.0149	2.087	11.83
Gingerol	2.0494-2.055; 2.1254-2.1586; 2.9131-3.1484; 3.2775-3.9201	59.749	338.57
3,7,11-trimetil-6,10-Dodecadien-1-in-3-ol	2.3933	4.456	25.25
6-(p-Tolil)-2-metil-2-heptenol	2.5051	2.561	14.51
(-)-Nortraquelogenina	3.153; 4.534-5.276	2.110	11.96

Capítulo 4

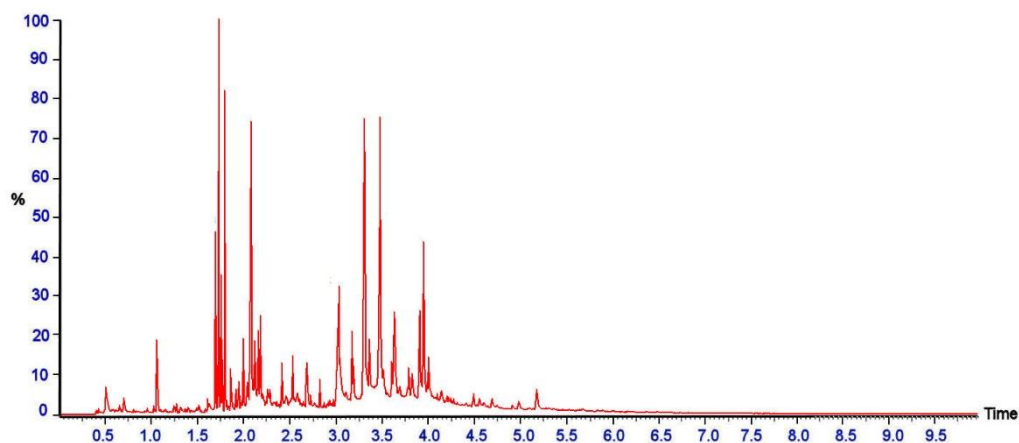
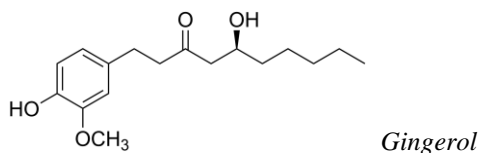


Figura 4.43. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Jengibre en metanol.

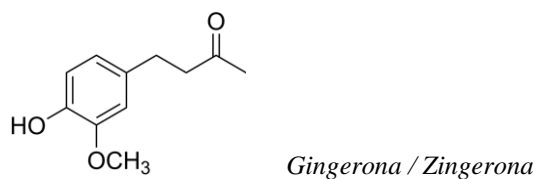
Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
2-metoxi-Fenol + Mequinol	0.8367	0.031	1.92
Borneol	1.0073	0.100	6.26
$\alpha,\alpha,4$ -trimetil-Bencenometanol	1.0211	0.008	0.48
2-metil-5-(1-metiletil)- Fenol + 2-etil-4,5-dimetil- Fenol	1.234 - 1.256	0.248	15.50
4-Hidroxi-2-metilacetofenona + 4-Hidroxi- 3-metilacetofenona	1.3 - 1.319	0.300	18.77
2-metoxi-4-(1-propenil)-Fenol + 2-metoxi- 3-(2-propenil)-Fenol + 2-metoxi-6-(2- propenil)-Fenol	1.3869	0.057	3.58
3-hidroxi-4-metoxi-Benzaldehído + 4- Hidroxi-2-metoxibenaldehído	1.5029	0.078	4.90
1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil- Benceno	1.6769	3.356	209.63
2,6-dimetil-6-(4-metil-3-pentenil)- Biciclo[3.1.1]hept-2-eno	1.699 - 1.711	7.905	493.81
(S)-1-metil-4-(5-metil-1-Metilen-4-hexenil)- Ciclohexeno	1.739	2.529	157.98
[S-(R*,S*)]-3-(1,5-dimetil-4-hexenil)-6- Metilen- Ciclohexeno	1.775 - 1.780	6.284	392.56
Hinesol	1.8432	0.507	31.70
4-(3-Hidroxi-1-propenil)-2-metoxi- Fenol	1.892 - 1.896	0.646	40.38
Gingerona / Zingerona	2.0421; 2.0504-2.0779; 2.0842 - 2.0911	8.316	519.50
Ácido 4-Hidroxi-3-metoxi-Bencenoacético, metil éster	2.2368	0.092	5.72
α -Bisabolol	2.5668	0.261	16.28
Z- α -trans-Bergamotol	2.7124	0.118	7.39
Ácido cis-13-Octadecenoico	3.0148	3.878	242.24
Gingerol	3.0783 - 3.1404; 3.2026 - 4.0841	40.772	2547.14

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
3-(3-Hidroxi-4-metoxifenil)-l-alanina	3.1612 - 3.1749	2.053	128.25
Piperina	4.2589	0.100	6.27
γ -Tocoferol	4.4342	0.023	1.41
γ -Sitosterol	5.1633	0.749	46.79

En los extractos de Jengibre, tanto en agua como en metanol, se han determinado una gran cantidad de compuestos aromáticos, principalmente fenólicos, siendo el compuesto mayoritario un antioxidante natural, el gingerol [5, 19, 28-29]:



Es el componente activo del Jengibre fresco. Tiene una estructura similar a la de la capsaicina y la piperina, compuestos que dan el grado de picor a los chiles y a la pimienta negra. Puro en estado natural, es un aceite de color amarillo penetrante, aunque también pueden presentarse en forma sólida cristalina de bajo punto de fusión (30°C). En el extracto en metanol, además de gingerol, también se obtuvo gingerona (o zingerona), que se produce a partir del gingerol al cocinar el Jengibre [30].



El Jengibre fresco no contiene zingerona; es en la cocción cuando el gingerol presente se transforma en zingerona a través de una reacción retro-aldólica. La zingerona, es menos picante y tiene un aroma dulce picante. Es un sólido cristalino escasamente soluble en agua, y soluble en disolventes apolares. Su estructura química es similar a las de otros compuestos que dan sabor, como la vainillina y el eugenol. Se utiliza como aditivo de sabor en los aceites de especias y para producir aromas picantes en perfumería [30].

Cuando se seca el Jengibre, el gingerol se deshidrata formando shogaoles, que son aproximadamente el doble de picantes que el gingerol [30]. Esto explica por qué el Jengibre seco es más picante que el Jengibre fresco.

Capítulo 4

4.4.3.8. Nuez Moscada

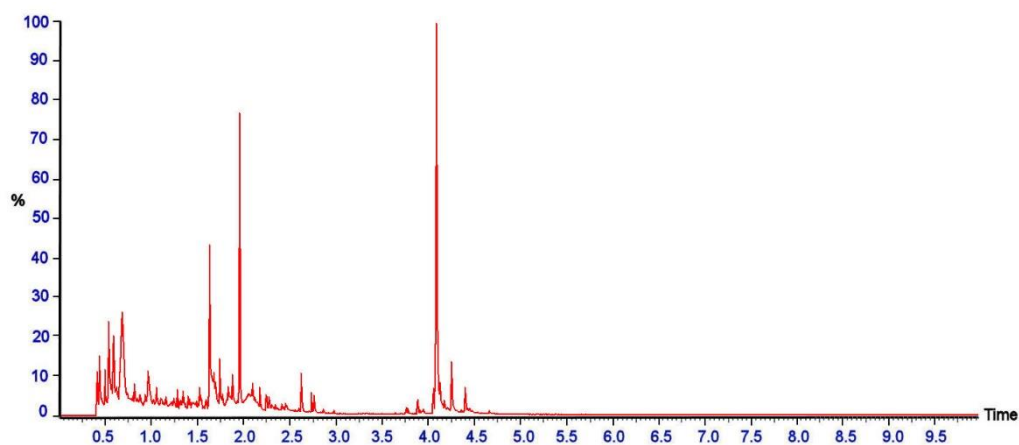


Figura 4.44. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Nuez Moscada en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Gliceraldehído	0.5101	4.725	9.91
Glicerina	0.6288 - 0.6834	21.113	44.26
1,2-Bencenodiol	1.0294	1.353	2.84
2-metoxi-4-(1-propenil)-Fenol	1.3875; 1.6078	7.712	16.17
Vainillina	1.498	0.947	1.98
1,5-Anhidro-d-manitol	1.8405	3.414	7.16
2,6-dimetoxi-4-(2-propenil)- Fenol	1.9323; 2.154; 4.066 - 4.2324	32.303	61.71
α -D-Glucopiranosido + β -D-Glucopiranosido	2.0229 - 2.038	2.052	4.30
4-hidroxi-3,5-dimetoxi-Benzaldehído	2.0712; 2.7133	1.266	2.65
Vinbarbital	2.2851	0.114	0.24

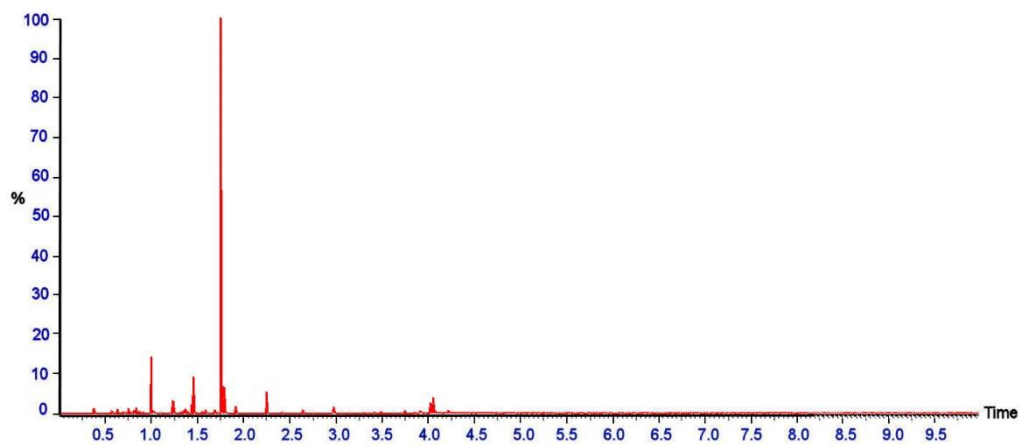
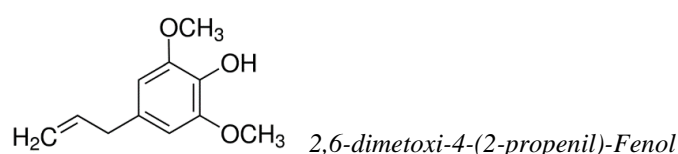


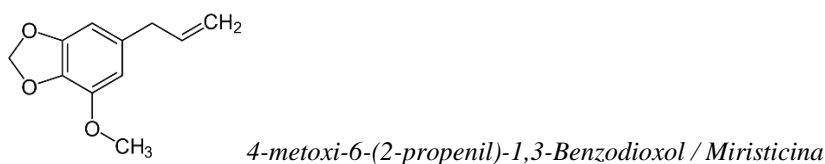
Figura 4.45. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Nuez Moscada en metanol.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
α -Felandreno	0.552 - 0.786	2.248	2.12
1S- α -Pinoeno	0.8014	0.137	0.13
β -Pinoeno	0.814 - 0.842	0.736	0.69
4-metil-1-(1-metiletil)-3-Ciclohexen-1-ol	0.9727	8.159	7.69
Eugenol	1.346; 1.567	0.907	0.86
β -Mirceeno	1.3733	0.285	0.27
α -Cubebeno	1.4147	1.167	1.10
1,2-dimetoxi-4-(2-propenil)-Benceno	1.4354	4.920	4.64
4-Metilen-1-(1-metiletil)-Biciclo[3,1,0]hexano	1.5286	0.256	0.24
4-metoxi-6-(2-propenil)-1,3-Benzodioxol	1.7323	57.663	54.36
1,2,3-trimetoxi-5-(2-propenil)-Benceno	1.7675	3.669	3.46
Ácido Tridecanoico	2.2281	4.715	4.45
Ácido Benzo[1,2,5]oxadiazol-5-carboxílico-1-óxido, metil éster	4.032- 4.199	4.903	4.62

En el extracto en agua de la Nuez Moscada, el componente mayoritario es:

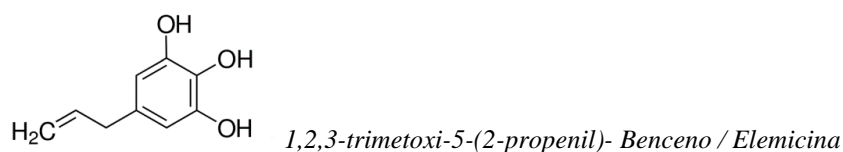


Este compuesto es la forma reducida del componente mayoritario del extracto en metanol, la Miristicina (4-metoxi-6-(2-propenil)- 1,3-Benzodioxol):



La miristicina actúa como un insecticida [31] y acaricida natural [32], como el eugenol. Es capaz de provocar efectos psicoactivos, en dosis más altas que las culinarias [33, 34].

Otro de los compuestos característicos de la Nuez Moscada [35], obtenidos en el extracto en metanol, es la Elemicina (1,2,3-trimetoxi-5-(2-propenil)-Benceno), cuya estructura similar a otros compuestos como 1,2,3-bencenotriol o ácido gálico, asegura su actividad antioxidante.



Capítulo 4

4.4.3.9. Orégano

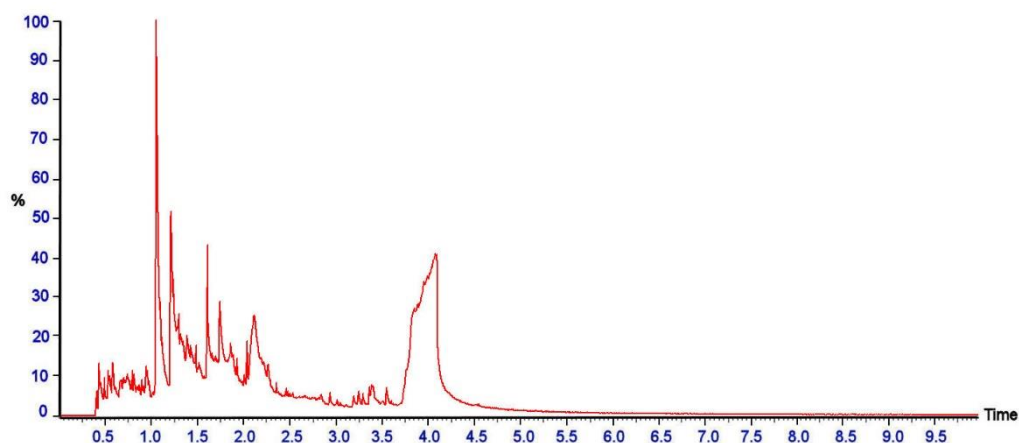


Figura 4.46. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Orégano en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
2,5-Norbornadieno	0.622	0.055	0.37
Bencenoacetaldehído	0.7587	0.083	0.56
1,3,8-p-Mentatrieno	0.8767 - 0.9251	0.757	5.09
1,2-Bencenodiol + Resorcinol	1.0349 - 1.0694	28.531	192.12
Hidroquinona	1.1896 - 1.1937; 1.6778 - 1.9885	22.219	149.62
Indol	1.2751	0.726	4.89
Carvacrol	1.2986-1.3256	0.966	9.49
4-Hidroxi-Bencenometanol	1.3671	1.256	8.46
2-hidroxi-6-metil-Benzaldehído	1.5873	4.488	30.22
Cariofileno	2.0161	1.050	7.07
1,2-Bencenodiol + Resorcinol + Hidroquinona	3.3861	24.557	165.36

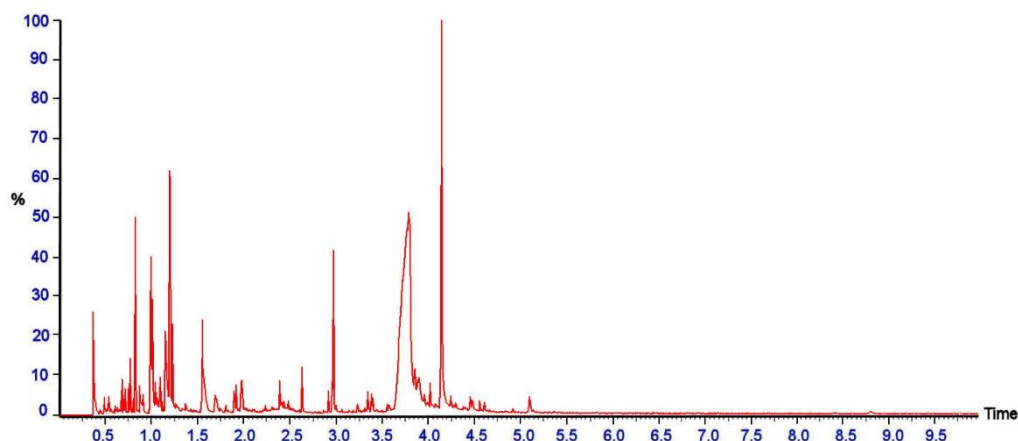
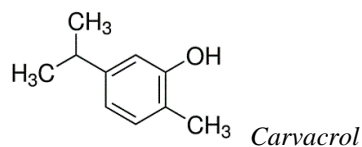


Figura 4.47. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Orégano en metanol.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
α -Felandreno	0.655-0.731	0.685	1.81
β -Felandreno	0.6965	0.365	0.97
(1 α ,2 β ,5 α)-2-metil-5-(1-metiletil)-Biciclo[3.1.0]hexan-2-ol	0.807	3.316	8.76
(1 α ,2 α ,5 α)-2-metil-5-(1-metiletil)-Biciclo[3.1.0]hexan-2-ol	0.8554	0.430	1.14
4-metil-1-(1-metiletil)-3-Ciclohexen-1-ol	0.9672	2.160	5.71
1,2-Bencenodiol	0.9748	3.850	10.18
α -Pino	1.0763	0.531	1.40
Resorcinol	1.1328	2.902	7.67
Carvacrol	1.181 -1.207	8.921	23.58
2-Hidroxi-5-metil-Benzaldehído	1.5327	1.804	4.77
Fitol	2.8992	0.392	1.04
Ácido (Z,Z,Z)-9,12,15-Octadecatrienoico	2.9544	2.849	7.53
1,2-Bencenodiol + Resorcinol + Hidroquinona	3.729- 4.128	61.521	162.61
Vitamina E	4.544; 4.591	0.349	0.92

Los extractos de Orégano se caracterizan por sus propiedades antioxidantes, antifúngicas, antibacterianas y antimicrobianas [36]. En este trabajo hay que destacar el elevado contenido (relativo), en 1,2-Bencenodiol, Resorcinol e Hidroquinona. Además se encontraron también Carvacrol (característico en extractos de Orégano) [19, 37] y Vitamina E [38, 39] aunque en menores cantidades, ambos compuestos de elevada capacidad antioxidante [5, 40]. El Carvacrol es muy poco soluble en agua por lo que se obtuvo una proporción mucho mayor en el extracto en metanol.



Capítulo 4

4.4.3.10. Romero

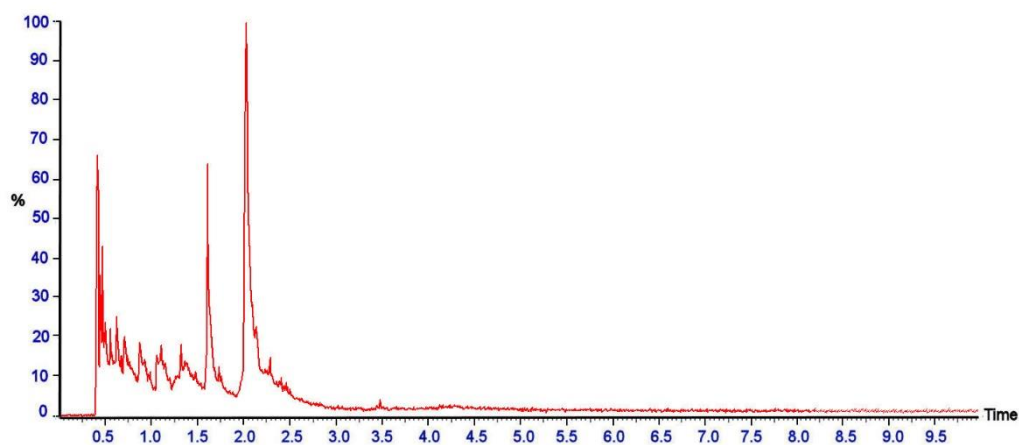


Figura 4.48. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Romero en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
2-Amino-1,3-propanodiol	0.4278	7.015	2.08
N-Nitrosodimetilamina	0.4478	3.379	1.00
2-Hidroxi-2-Ciclopenten-1-ona	0.6081	2.496	0.74
Ácido Formico, 2-propenil éster	0.6861	5.056	1.50
Resorcinol + Hidroquinona	1.0423 - 1.4573	4.588	1.36
2-hidroxi-6-metil-Benzaldehído + 3-Hidroxi-2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	1.5885	10.000	2.96
(1 α ,2 β ,3 α ,5 β)-1,2,3,5-Ciclohexanotetrol	2.0078	59.309	17.58

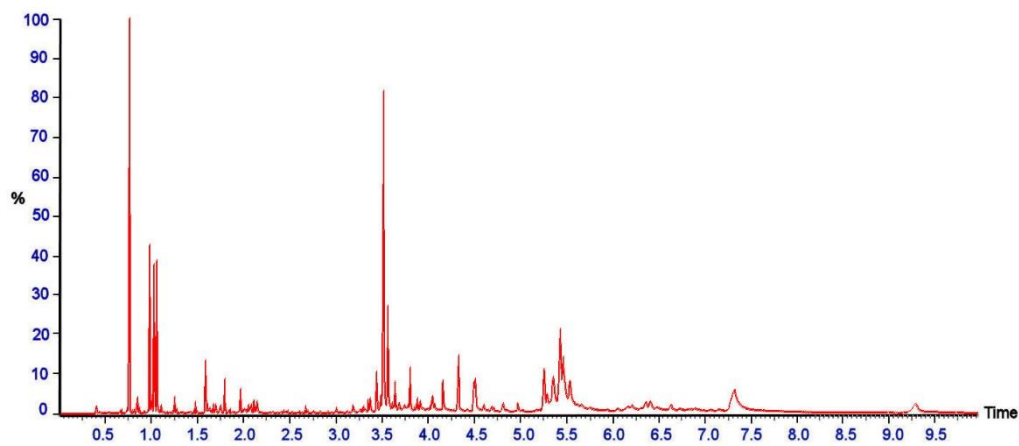
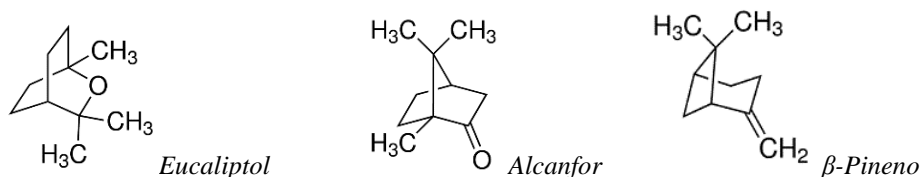


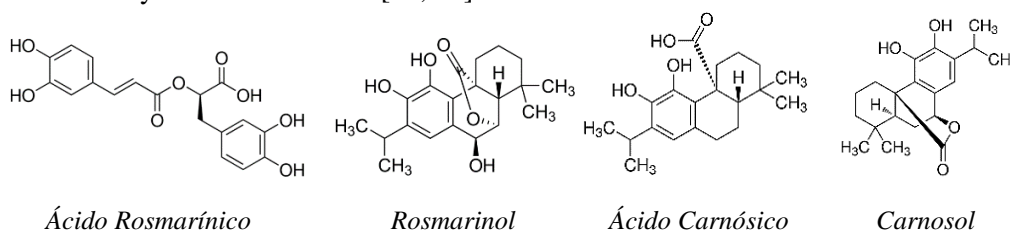
Figura 4.49. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Romero en metanol.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
β -Pinoeno	0.6551	0.047	1.07
Eucaliptol	0.7442	10.491	236.99
Alcanfor	0.9596	4.908	110.87
Borneol	1.0073	3.597	81.25
α,α -trimetil-3-Ciclohexeno-1-metanol	1.0418	3.764	85.03
4-(1-metiletil)-Benzaldehído	1.1523	0.022	0.50
2-metil-5-(1-metiletil)- Fenol	1.208; 1.256	0.141	3.20
3-(4-metoxiphenoxy)-Benzaldehído	3.4605	0.067	1.51
2-Phenanthrenol. 4b,5,6,7,8,8a,9,10-octahidro-4b,8,8-trimetil-1-(1-metiletil)-, (4bS-trans)- // Totarol	3.494-3.548	12.953	292.60
5-Hidroxi-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-1-Benzopiran-4-ona	4.299-4.313	2.241	50.62
Vitamina E	4.5909	0.160	3.62
4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-Octametil-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-octadecahidro-2H-picen-3-ona // α -Amirina	5.242-5.276; 5.415-5.418	31.601	713.85
3,5,6,7,8,8a-hexahidro-4,8a-dimetil-6-(1-metilethenil)- 2(1H)Naftalenona	5.448	2.285	51.62
Betulina	5.612-6.340	11.770	265.89

Mientras que el extracto en agua fue algo escaso en compuestos, el extracto en metanol fue mucho más rico. El Romero tiene un aroma dulce y fresco, levemente parecido al del eucalipto y alcanforado, debido a la presencia de Eucaliptol y Alcanfor. Entre los compuestos que forman los aromas y características organolépticas del Romero, se obtuvo también β -Pinoeno, responsable de matices semejantes a los que se encuentran en los pinos.

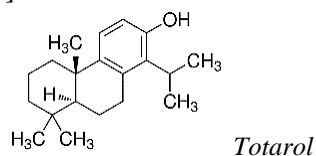


Los principales antioxidantes presentes en el Romero son carnosol, ácido carnósico, rosmarinol y ácido rosmarínico [19, 41]:



Capítulo 4

Éstos, no pudieron determinarse en estos ensayos debido a que sus puntos de ebullición son superiores a la temperatura de trabajo. Por esta razón no se ha podido estudiar la mayor parte de los antioxidantes presentes en los extractos de Romero con esta técnica. También se obtuvo totarol [41]:



4.4.3.11. Tomillo

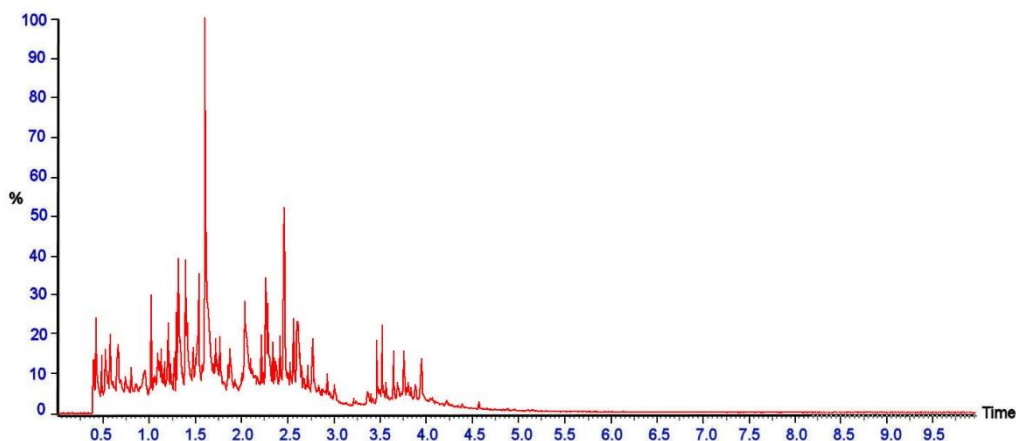


Figura 4.50. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Tomillo en agua.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
DL-Norvalina	0.4057	0.956	2.39
Glicerina	0.641	3.296	8.24
Timina	0.7936	0.948	2.37
Mequinol	0.8364	0.725	1.81
1,2-Bencenodiol	1.0373	2.827	7.06
Indol	1.2762	2.306	5.76
Timol	1.3038 - 1.3245	6.527	16.31
2,6-dimetoxi-Fenol	1.3805	5.887	14.71
2,4-dihidroxi-6-metil-Benzaldehído	1.5048	0.565	1.41
2-hidroxi-6-metil-Benzaldehído + 2-Hidroxi-4-metil-Benzaldehído	1.5938	16.467	41.15
4-(1,1-dimetiletil)-1,2-Bencenodiol + 2-(1,1-dimetiletil)-1,4-Bencenodiol	1.7042	1.259	3.15
4-(1-metiletil)-Benzaldehído	2.0224	0.947	2.37
(1 α ,2 β ,3 α ,5 β)-1,2,3,5-Ciclohexanotetrol	2.0286	7.942	19.85
3-Hidroxi-4-metil-Benzaldehído	2.0548	0.141	0.35
Megastigmatrienona	2.2496	3.431	8.57
Cariofileno	2.4435 - 2.4497	15.924	39.80
[2R-(2 α ,4 $\alpha\alpha$,8 $\alpha\beta$)]-decahidro- α , α ,4 α -trimetil-8-Metilen-2-Naftalenmetanol	2.4497	9.493	23.72

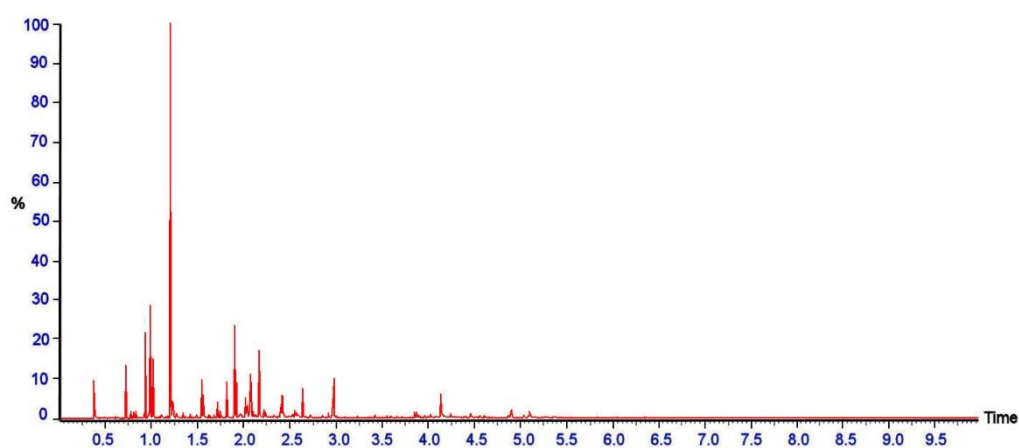
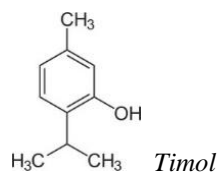


Figura 4.51. Cromatograma de gases correspondiente a la muestra de Tomillo en metanol.

Compuesto Identificado	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	p.p.m.
Eucaliptol	0.6964	3.837	4.55
β -Pino	0.7517	0.384	0.46
Alcanfor	0.9106	6.259	7.43
Borneol	0.944-0.959	9.122	10.83
α,α -4-trimetil-3-Ciclohexeno-1-metanol	0.9934	4.631	5.50
Timol	1.1798-1.2012	41.724	70.93
Camfeno	1.319;1.691	1.482	1.76
Cariofileno	1.5181	2.621	3.11
$\alpha,\alpha,4,8$ -tetrametil-[s-(Z,Z)]-3,7-Ciclodecadieno-1-metanol	1.7943	2.851	3.38
[1ar-(1 α ,4 α ,7 β ,7 α)-decahidro-1,1,7-trimetil-4-Metilen-1H-Cicloprop[e]azulen-7-ol	1.8771	6.306	7.48
Óxido de Cariofileno	1.8979	2.830	3.36
(2R-cis)-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahidro- $\alpha,\alpha,4a,8$ -tetrametil-2-Naftalenmetanol	1.9952	1.448	1.72
[2R-(2 $\alpha,4a\alpha,8a\beta$)]-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro- $\alpha,\alpha,4a,8$ -tetrametil-2-Naftalenmetanol,	2.0504	2.569	3.05
Carotol	2.1402	5.018	5.96
ácido n-Hexadecanoico	2.6159	2.264	2.69
Fitol	2.8982	0.427	0.51
Triciclo[4.3.1.0(2,5)]decano	2.9526	3.221	3.82
2-etil-2-metil-Tridecanol	4.114	2.268	2.69

Capítulo 4

Los principales antioxidantes que se encuentran en el Tomillo, son el Carvacrol (visto anteriormente en el Orégano) y el Timol [5], característicos del Tomillo [19, 29]:



En el extracto acuoso se obtuvo un grupo de compuestos antioxidantes formado principalmente por hidroxi-benzaldehídos, y en torno al 6,5 % del extracto, de timol, siendo esta cantidad mucho menor a la obtenida en el extracto en metanol, debido a que el timol es menos soluble en agua. Es un compuesto con propiedades antisépticas [42] e insecticidas [43] y es el que proporciona el distintivo sabor fuerte del Tomillo (*Thymus Vulgaris*). Debido a la similitud estructural y puntos de ebullición, es difícil diferenciar entre el Timol (punto de ebullición 231-233°C) y el Carvacrol (234-238°C), siendo identificado por el programa el Carvacrol (casi en la misma probabilidad que el Timol) para el Orégano, y el Timol para el Tomillo (estando este, también dentro del mismo grupo de compuestos probables que el Carvacrol).

4.5. Resultados de HPLC

A continuación se exponen los resultados obtenidos mediante el análisis de muestras de té, infusiones y especias.

En primer lugar se establecieron los tiempos de retención de una serie de estándares, a valores de concentración que proporcionaron picos bien visibles. Estas concentraciones oscilaron entre $5 \cdot 10^{-3}$ M y $100 \cdot 10^{-3}$ M, dependiendo del compuesto. De esta manera, se identificaron los picos correspondientes a los estándares:

Compuesto	Tiempo de Retención (min)
ácido gálico	1,222-1,403 (hombro)
Ácido Vanílico	1,59
Teobromina	2,816
Teofilina	3,646
Cafeína	5,146
Vainillina	6,962
Cinamaldehído	36,966
Eugenol	41,232
β -Cariofileno	44,571
β -Pino	45,872
Timol	47,149
Carvacrol	47,272
Miristicina	49,419
Linalol	51,781
P-Cimeno	56,595
α -Pino	57,637

Tabla 4.5. Tiempos de retención para estándares utilizados en HPLC.

De todos los compuestos descritos anteriormente, se pudieron identificar y cuantificar: ácido gálico, Cafeína, Teobromina y Vainillina en té y Cinamaldehído en Canela. Esto es debido a que el resto de estándares utilizados, eran compuestos minoritarios y no presentaban picos bien definidos a esos tiempos de retención, solapando con otros compuestos y/o proporcionando intensidades bajas y poco representativas.

Éstos, fueron identificados en función de su tiempo de retención. Para confirmar su presencia en las muestras, se prepararon unas alícuotas dopadas con estándares. En los casos en que los picos correspondieron al compuesto buscado, hubo una intensificación evidente en el pico de absorbancia correspondiente, mientras que si no era así, se observó el pico correspondiente al estándar separado del pico que presentaba la alícuota.

Capítulo 4

De esta manera, una vez identificados algunos de los compuestos presentes en las muestras a analizar, y teniendo estándares de éstos, se procedió a preparar las rectas de calibrado para cada uno de ellos a 254 nm, por ser una longitud de onda a la cual se obtenía una absorbancia suficientemente alta y monitorizable.

En varios casos, las rectas de calibrado no pasan por el origen de coordenadas porque existe una contribución a la absorbancia, de la propia fase móvil.

En todos los casos la relación entre absorbancia y concentración del estándar fue lineal, excepto en el caso de la vainillina, para la cual se obtuvo una relación polinómica:

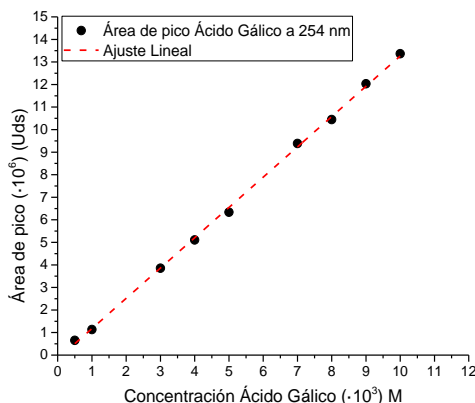


Figura 4.52. Recta de calibrado del ácido gálico y ecuación donde “y” es el Área del pico del estándar y “x” es la concentración.

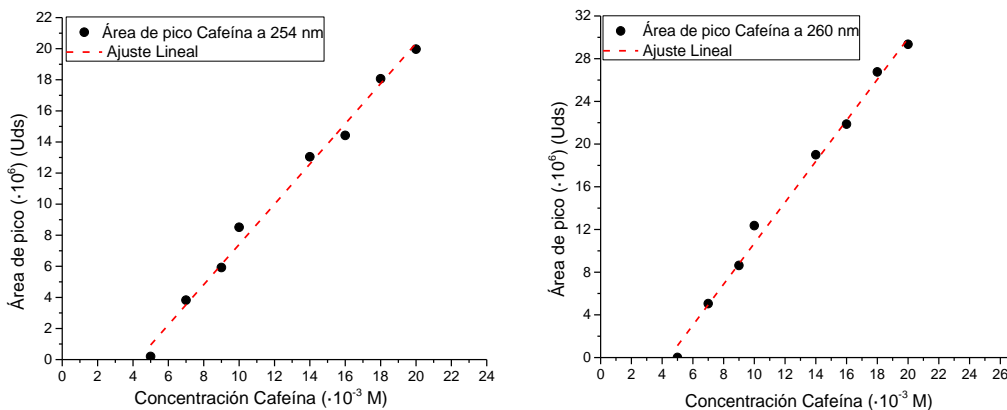


Figura 4.53. Rectas de calibrado de la Cafeína y ecuaciones donde “y” es el Área del pico del estándar y “x” es la concentración.

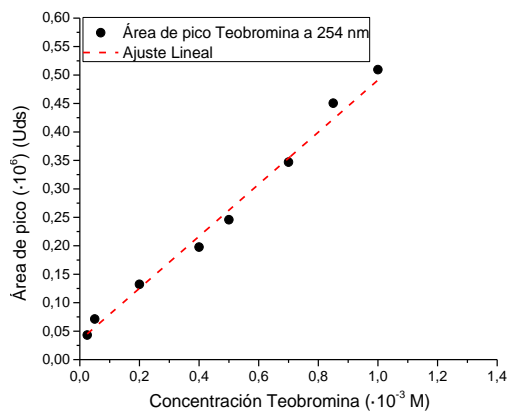


Figura 4.54. Recta de calibrado de la Teobromina y ecuación donde “y” es el Área del pico del estándar y “x” es la concentración.

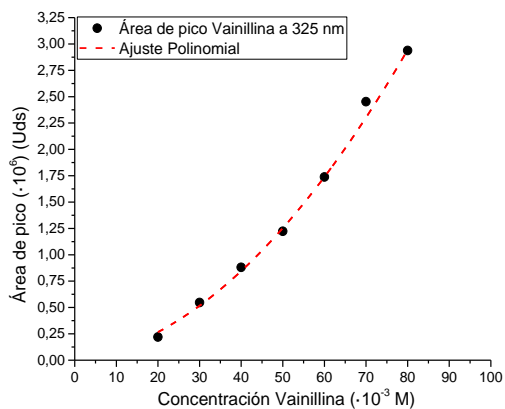


Figura 4.55. Curva de calibrado de la Vainillina, y ecuación donde “y” es el Área del pico del estándar y “x” es la concentración.

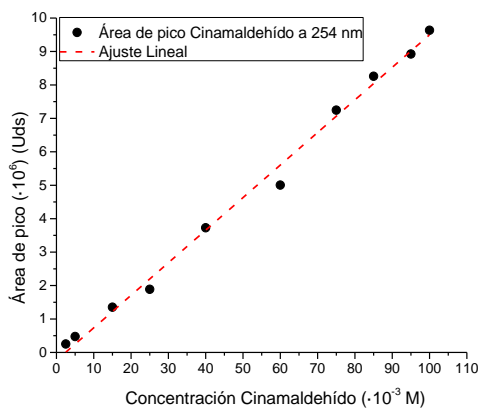


Figura 4.56. Recta de calibrado del Cinamaldehído y ecuación donde “y” es el Área del pico del estándar y “x” es la concentración.

Capítulo 4

Se comprobó que haciendo los extractos en agua ultrapura a 100°C, se obtenía una composición diferente a la obtenida al hacer los extractos en metanol a 60°C, ya que en el extracto acuoso era mayor la concentración de compuestos polares (obtenidos al principio de los cromatogramas, y entre ellos, los compuestos monitorizados), que en los extractos alcohólicos. En el caso de las infusiones y extractos de especias no se han detectado polifenoles en ninguno de los dos medios de extracción.

En algunas de las gráficas que se presentan a continuación (4.84, 4.93, 4.94 y 4.96), se observan bandas de absorbancias negativas correspondientes a fenómenos de emisión. Esto es debido a que el detector utilizado, como se indica en la parte experimental de este capítulo, es una matriz de diodos que iluminan la muestra simultáneamente con un conjunto de longitudes de onda. Esto provoca en algunas moléculas la fluorescencia, cuya emisión es detectada a una longitud de onda diferente de la de excitación, siendo este fenómeno por tanto responsable de las bandas de intensidad negativa. En algunos casos esto es una ventaja (por ejemplo, en la muestra de Cúrcuma, con la Curcumina) ya que permite una identificación inequívoca de un analito concreto.

4.5.1. Tés

A continuación se muestran los cromatogramas para los tés a las distintas longitudes de onda de trabajo, para el extracto acuoso, el extracto alcohólico y la alícuota dopada, donde se identificaron los picos de ácido gálico, teobromina, cafeína y vainillina. Esto permite la cuantificación de los compuestos de los que se dispone estándares. En todos los casos, la composición del extracto dopado consistió en 500 µL del extracto de té (en agua ultrapura o metanol), 300 µL de ácido gálico $20 \cdot 10^{-3}$ M, 300 µL de Teobromina $1 \cdot 10^{-3}$ M, 300 µL de Cafeína de $20 \cdot 10^{-3}$ M, 300 µL de Vainillina $80 \cdot 10^{-3}$ M y 300 µL de H₂O ultrapura.

Además, teniendo en cuenta que ninguno de los compuestos estándares utilizados en esta experiencia presentaban señales de absorbancia después de los 8 minutos de análisis, se ha optado por hacer un zoom en la zona $t < 8$ min para apreciar mejor los picos, aunque se dispone de los cromatogramas completos. Los estándares utilizados en el dopado se indican con los siguientes números, en las figuras: ácido gálico (1), Teobromina (2), Cafeína (3) y Vainillina (4).

4.5.1.1. Té Blanco

El Té Blanco es el único té estudiado con vainillina en su composición, puesto que el formato de venta incluye vainilla. El inconveniente para determinar la vainillina en el Té Blanco es que su pico de absorbancia solapa con el de la cafeína. Para discriminar

las señales de los dos compuestos, se recurrió a la colección de longitudes de onda que se hacía para cada medida, observándose que a 325 nm la señal obtenida para la cafeína, era constante y casi nula ($1,5 \cdot 10^{-4}$ veces la señal correspondiente a la vainillina) mientras que para la vainillina la señal obtenida a esta longitud de onda era igual a la obtenida a 260 nm, de manera que tomando la integral de la señal de la vainillina a 325 nm y restándola de la obtenida a 260 nm para la cafeína y la vainillina juntas, se obtiene la señal correspondiente a la cafeína a 260 nm, y así, su concentración en la muestra. La concentración de vainillina se calcula de la absorbancia obtenida a 325nm.

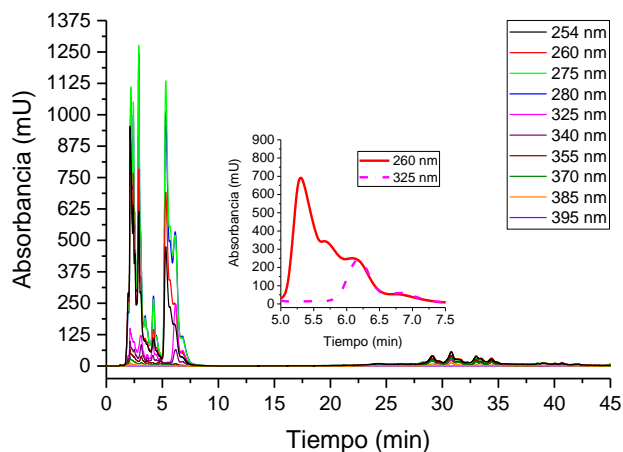


Figura 4.57. Cromatograma del extracto de Té Blanco en agua a diferentes longitudes de onda. Interior: *detalle de la discriminación de la señal producida por la cafeína y la vainillina a las longitudes de onda de 260 nm y 325 nm.*

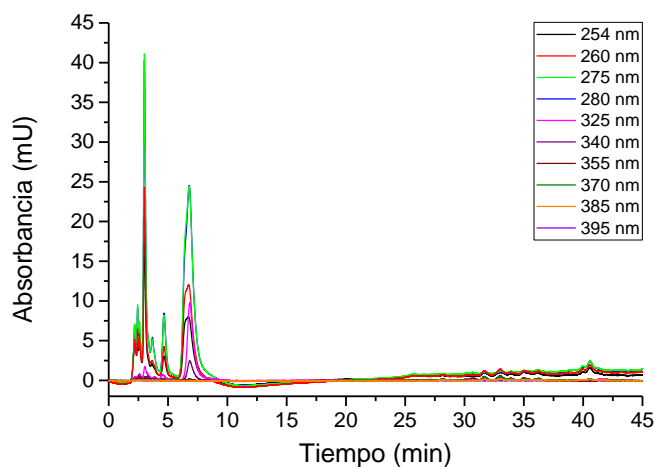


Figura 4.58. Cromatograma del extracto de Té Blanco en metanol a diferentes longitudes de onda.

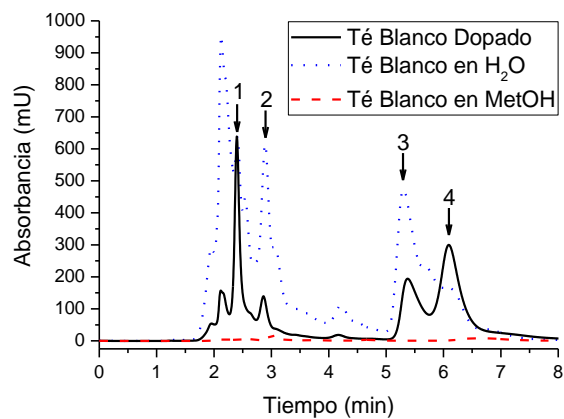


Figura 4.59. Comparativa de los cromatogramas a la longitud de onda de 254nm, para las muestras de: extracto de Té Blanco en agua, extracto de Té Blanco en metanol y extracto de Té Blanco dopado. Ácido Gálico (1), Teobromina (2), Cafeína (3) y Vainillina (4).

4.5.1.2. Té Negro

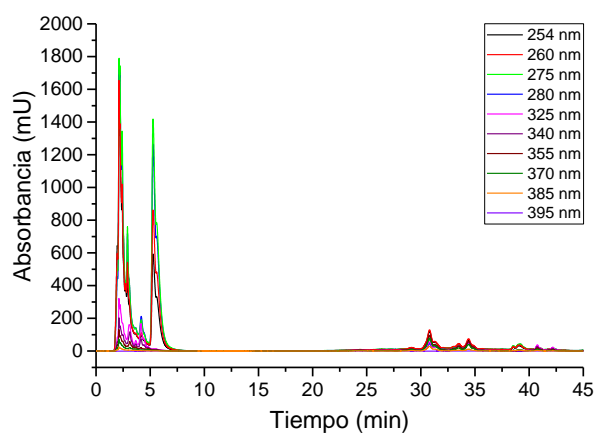


Figura 4.60. Cromatograma del extracto de Té Negro en agua a diferentes longitudes de onda.

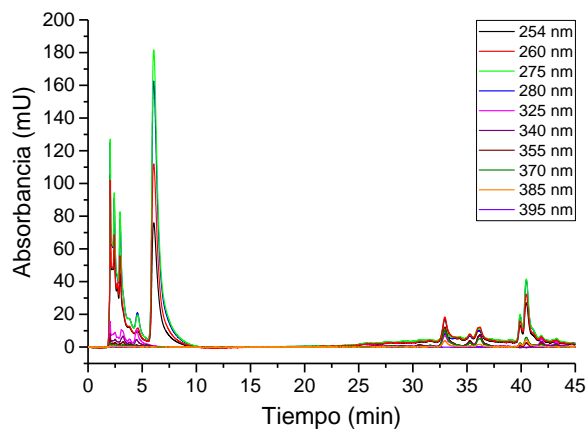


Figura 4.61. Cromatograma del extracto de Té Negro en metanol a diferentes longitudes de onda.

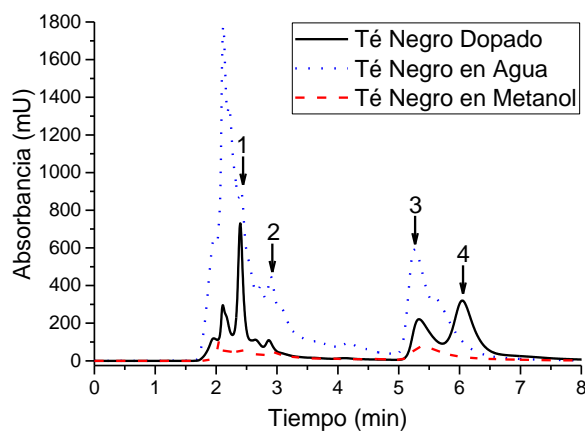


Figura 4.62. Comparativa de los cromatogramas a longitud de onda=254nm, para las muestras de: extracto de Té Negro en agua, extracto de Té Negro en metanol y extracto de Té Negro dopado. Ácido Gálico (1), Teobromina (2), Cafeína (3) y Vainillina (4).

Capítulo 4

4.5.1.3. Té Rojo

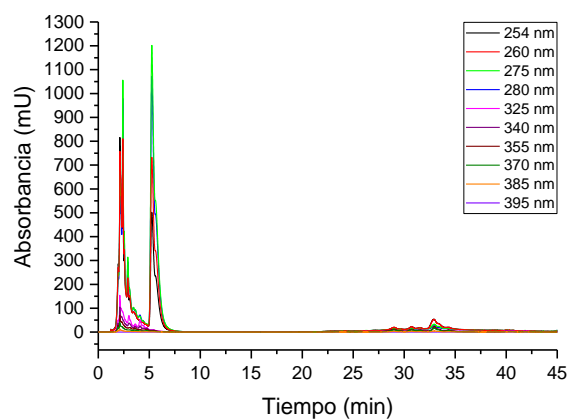


Figura 4.63. Cromatograma del extracto de Té Rojo en agua a diferentes longitudes de onda.

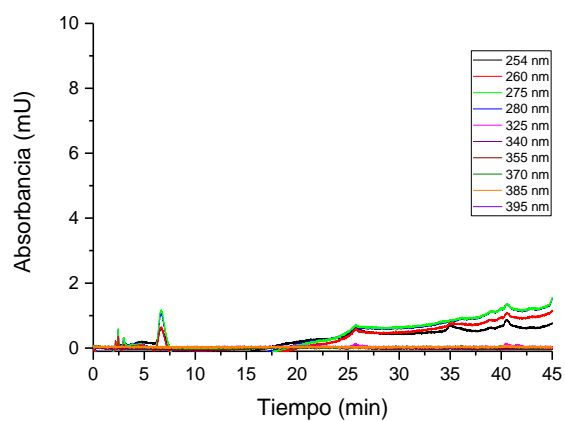


Figura 4.64. Cromatograma del extracto de Té Rojo en metanol a diferentes longitudes de onda.

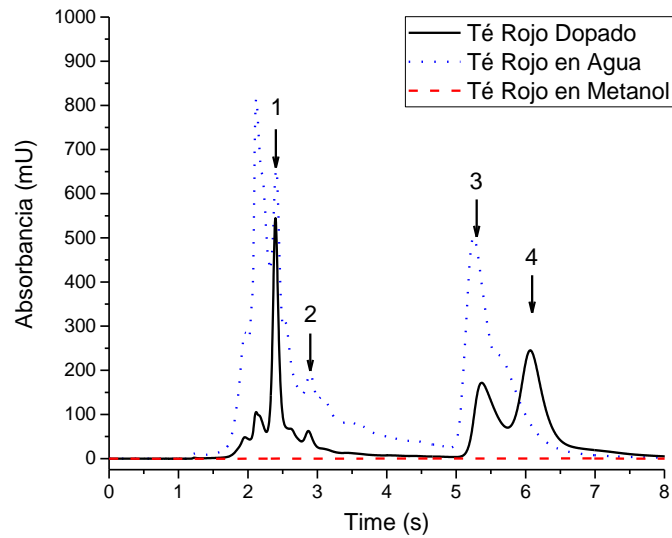


Figura 4.65. Comparativa de los cromatogramas a longitud de onda=254nm, para las muestras de: extracto de Té Rojo en agua, extracto de Té Rojo en metanol y extracto de Té Rojo dopado. Ácido Gálico (1), Teobromina (2), Cafeína (3) y Vainillina (4).

4.5.1.4. Té Verde

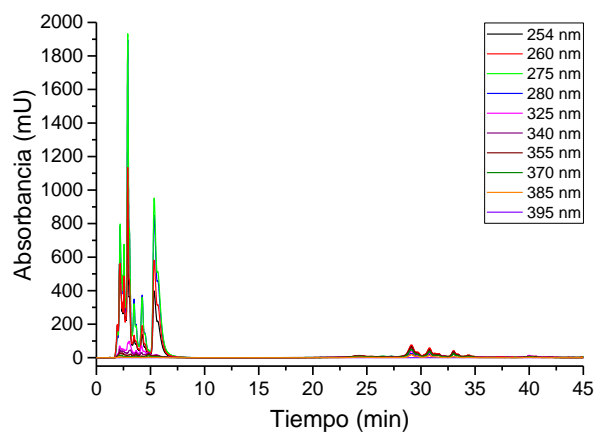


Figura 4.66. Cromatograma del extracto de Té Verde en agua a diferentes longitudes de onda.

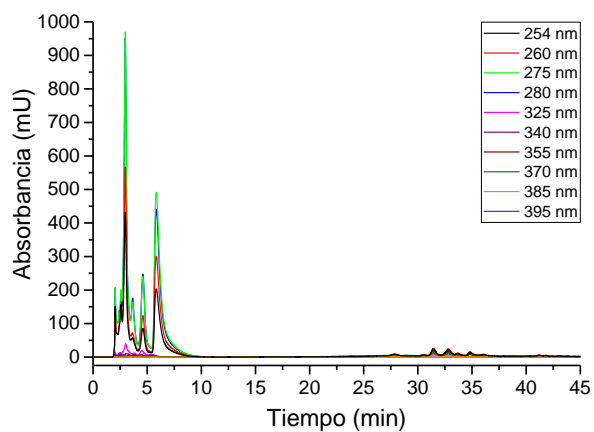


Figura 4.67. Cromatograma del extracto de Té Verde en metanol a diferentes longitudes de onda.

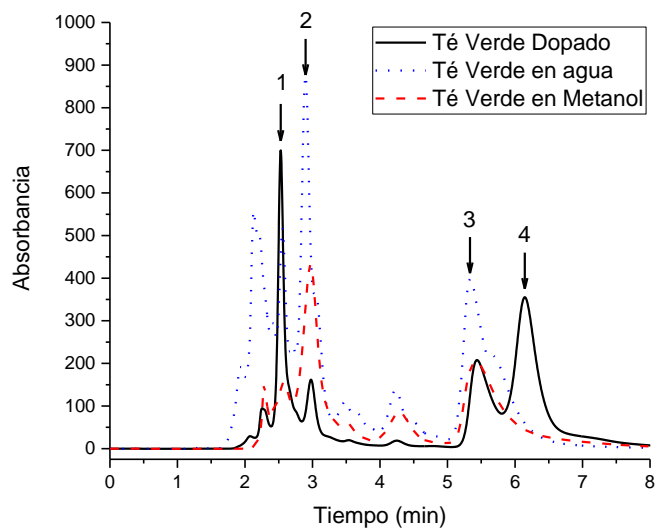


Figura 4.68. Comparativa de los cromatogramas a longitud de onda=254nm, para las muestras de: extracto de Té Verde en agua, extracto de Té Verde en metanol y extracto de Té Verde dopado. Ácido Gálico (1), Teobromina (2), Cafeína (3) y Vainillina (4).

4.5.1.5. Mezcla de 3 Tés

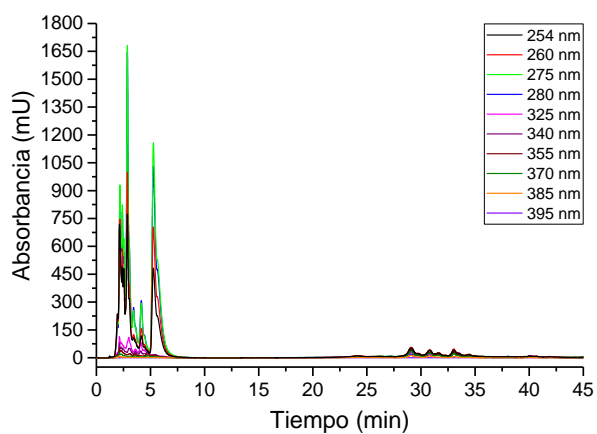


Figura 4.69. Cromatograma del extracto de Mezcla de 3 Tés en agua a diferentes longitudes de onda.

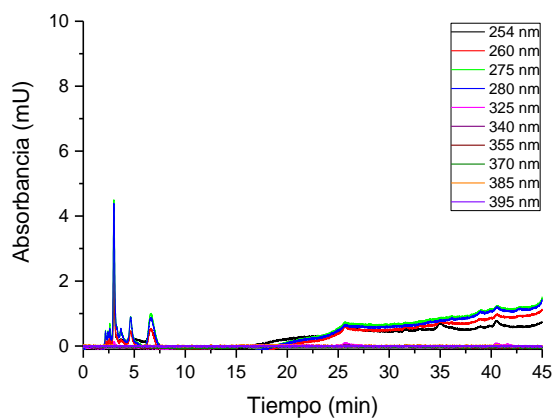


Figura 4.70. Cromatograma del extracto de Mezcla de 3 Tés en metanol a diferentes longitudes de onda.

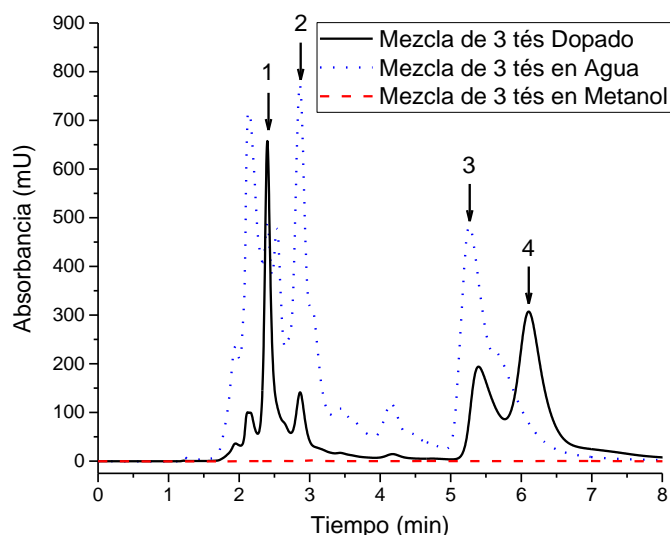


Figura 4.71. Comparativa de los cromatogramas a longitud de onda=254nm, para las muestras de: extracto de Mezcla de 3 Tés en agua, extracto de Mezcla de 3 Tés en metanol y extracto de Mezcla de 3 Tés dopado. Ácido Gálico (1), Teobromina (2), Cafeína (3) y Vainillina (4).

A continuación se muestran las tablas resumen comparativas entre los compuestos considerados más significativos de cada uno de los tés, en extracto en agua y en metanol.

		Muestras de té - Extracto en agua				
		Blanco	Negro	Rojo	Verde	Mezcla
Compuesto (p.p.m.)	Ácido Gálico	590.78	503.56	692.49	279.67	494.51
	Teobromina	1676.75	2047.64	881.32	2614.93	2594.96
	Cafeína	1343.96	1999.76	1719.18	1459.62	1723.88
	Vainillina	10837.64	-	-	-	-

		Muestras de té - Extracto en metanol				
		Blanco	Negro	Rojo	Verde	Mezcla
Compuesto (p.p.m.)	Ácido Gálico	13.07	84.65	12.69	179.85	10.84
	Teobromina	35.89	139.10	-	1670.76	82.90
	Cafeína	683.10	648.56	451.59	1105.10	444.54
	Vainillina	9222.57	-	-	-	-

En las muestras de HPLC de los tés, se identificaron más compuestos mayoritarios que en los ensayos con cromatografía de gases. Por una parte, el ácido gálico por debajo de

su punto de ebullición presenta un punto de inflamabilidad (271°C) [44], por lo que no aparece en los cromatogramas de gases. Por otra parte, como ya se dijo anteriormente, las cantidades de Teobromina y la Vainillina en CG-EM son tan solo una fracción de la cantidad real, debido a sus puntos de inflamabilidad.

La limitación en HPLC se presentó en la falta de estándares para identificar el resto de picos. Sin embargo, pudieron asignarse los picos de los compuestos utilizados como estándares externos, vistos en el apartado 4.5.

Para el contenido en polifenoles totales, se ha utilizado una variante del método descrito por J. González et al. [45], utilizando el área del pico de máxima absorbancia a $\lambda=280$ nm, y relacionándola con un estándar de ácido gálico.

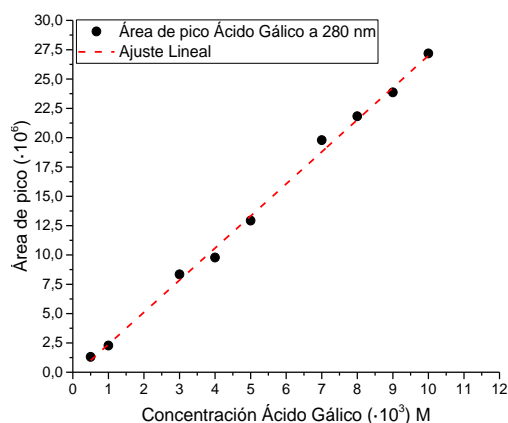


Figura 4.72. Recta de calibrado del ácido gálico a 280 nm para obtener el contenido en polifenoles totales, y ecuación donde “y” es el Área del pico del estándar y “x” es la concentración.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla siguiente.

		<u>Muestras de té</u>				
		Blanco	Negro	Rojo	Verde	Mezcla
<u>Contenido en Polifenoles Totales</u> (p.p.m. de Ác. Gálico)	Extracto en agua	1041.62	1520.07	1419.68	876.73	763.27
	Extracto en metanol	23.18	97.63	16.99	160.90	17.17

Puede observarse que en el extracto en agua, el té que presenta un mayor contenido en polifenoles totales es el Té Negro, mientras que en el extracto en metanol, es el Té Verde.

Capítulo 4

4.5.2. Infusiones

4.5.2.1. Manzanilla

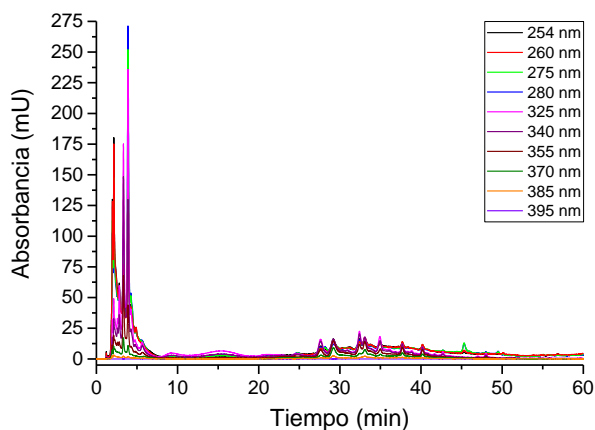


Figura 4.73. Cromatograma del extracto de Manzanilla en agua a diferentes longitudes de onda.

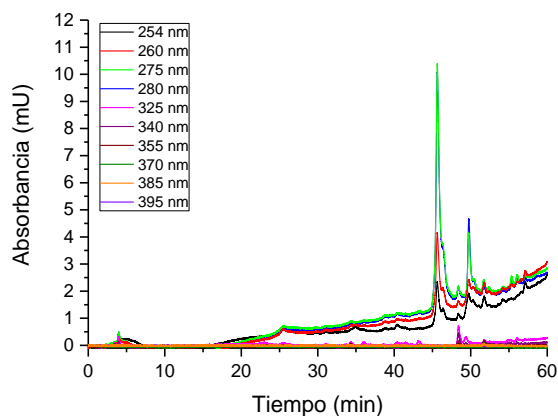


Figura 4.74. Cromatograma del extracto de Manzanilla en metanol a diferentes longitudes de onda.

Sobre la base de los resultados obtenidos en CG-EM, se deduce que el pico observado en el cromatograma del extracto en agua en HPLC a tiempo aproximadamente 4 minutos, se corresponde con la 7-metoxi-1-Benzopiran-2-ona, ya que es el compuesto mayoritario en el extracto en agua, y uno de los más abundantes en el extracto en metanol, aunque en mucha menor proporción en este caso. Utilizando las características del equipo y los coeficientes de extinción molar obtenidos en la bibliografía [46] se obtiene un contenido en esta especie de 208 p.p.m., muy similar al encontrado con CG-EM.

4.5.2.2. Menta-Poleo

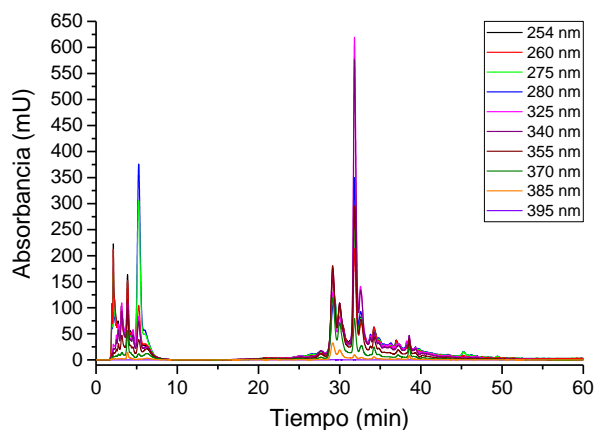


Figura 4.75. Cromatograma del extracto de Menta-Poleo en agua a diferentes longitudes de onda.

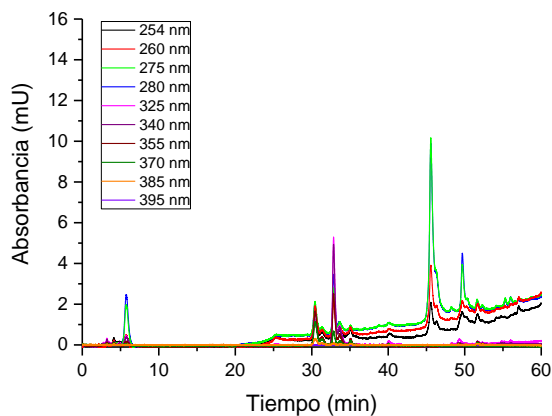


Figura 4.76. Cromatograma del extracto de Menta-Poleo en metanol a diferentes longitudes de onda.

Sobre la base de los datos obtenidos para la Menta-Poleo en CG-EM, y teniendo en cuenta que el Mentol se obtiene sólo en el extracto en metanol, se deduce que se corresponde con las señales obtenidas en el correspondiente cromatograma de HPLC, entre 30 y 35 minutos de tiempo de retención, ya que estas señales se asemejan mucho a las obtenidas en el extracto en metanol para la Tila, donde también se obtiene este compuesto.

4.5.2.3. Rooibos

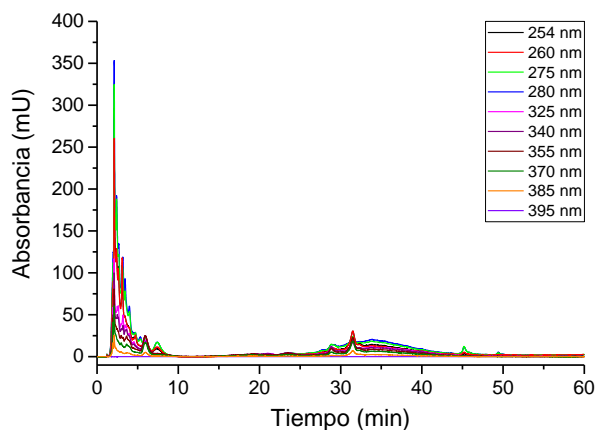


Figura 4.77. Cromatograma del extracto de Rooibos en agua a diferentes longitudes de onda.

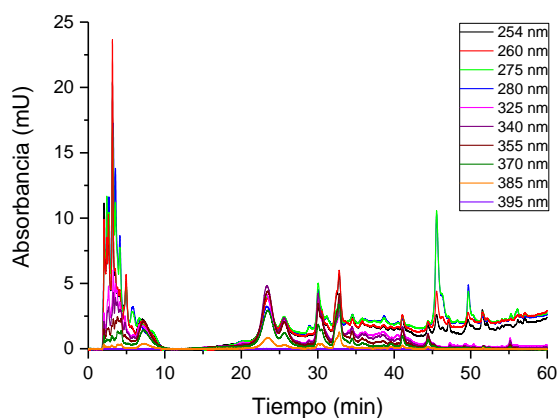


Figura 4.78. Cromatograma del extracto de Rooibos en metanol a diferentes longitudes de onda.

En el extracto de Rooibos, tanto para HPLC como para GC-EM, debido al carácter leñoso de la muestra. Presenta como pico común con otras muestras estudiadas, el pico correspondiente al Timol, pero debido a que es un compuesto presente en poca proporción en esta muestra, no ha podido estimarse su posición.

4.5.2.4. Salvia

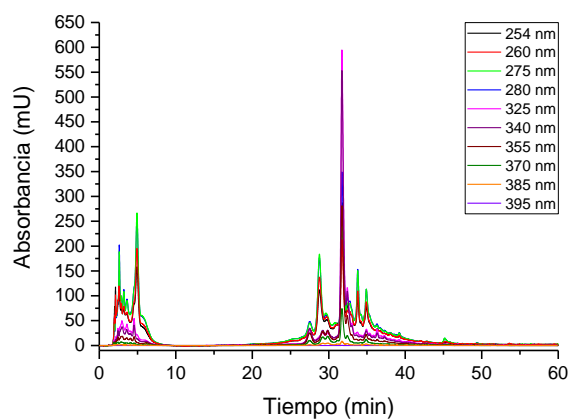


Figura 4.79. Cromatograma del extracto de Salvia en agua a diferentes longitudes de onda.

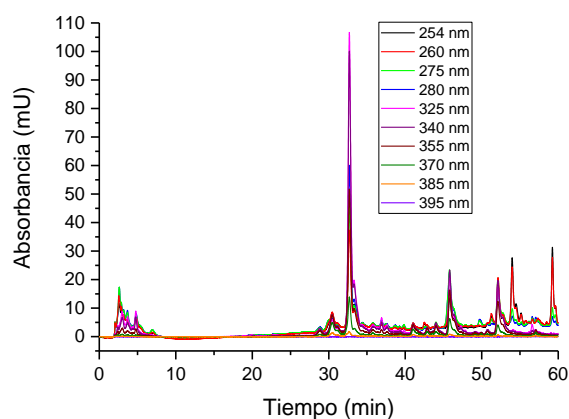


Figura 4.80. Cromatograma del extracto de Salvia en metanol a diferentes longitudes de onda.

En el caso de la Salvia, se observó una posible coincidencia, obteniéndose en ambos cromatogramas de HPLC el pico más intenso entre 31 y 33 minutos de tiempo de retención. No se encontró coincidencia en los cromatogramas de CG-EM, por lo que es posible que se trate del alcanfor, o uno de sus derivados hidroxilados, ya que todos ellos son termolábiles.

Capítulo 4

4.5.2.5. Tila

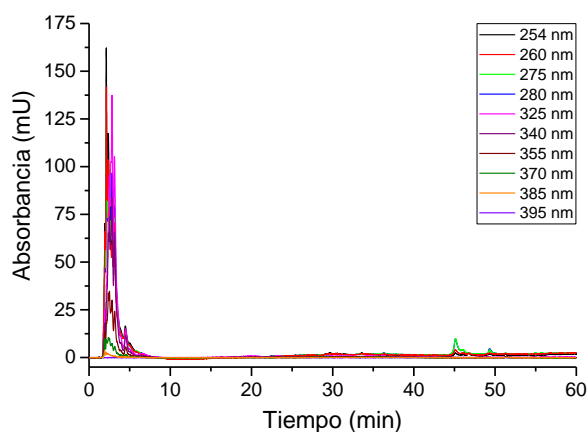


Figura 4.81. Cromatograma del extracto de Tila en agua a diferentes longitudes de onda.

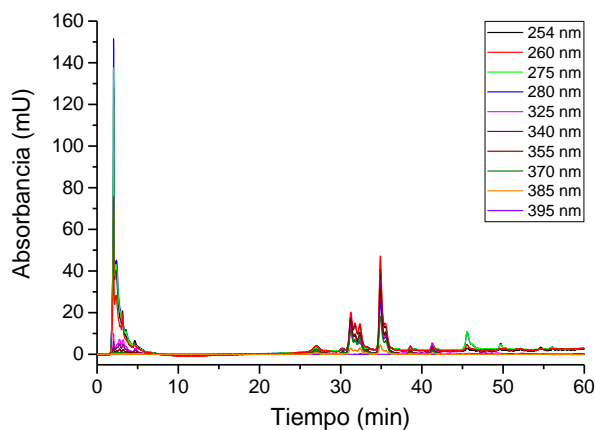


Figura 4.82. Cromatograma del extracto de Tila en metanol a diferentes longitudes de onda.

Sobre la base de los resultados obtenidos en CG-EM, y como se ha indicado anteriormente en el punto 4.5.2.2 *Menta-Poleo*, las señales obtenidas entre 31 y 35 minutos del tiempo de retención del cromatograma del extracto en metanol en HPLC, es muy posible que alberguen la señal correspondiente al Mentol. También, en la Tila se encuentran antioxidantes como en 1,2-Bencenodiol que, por su alta solubilidad en agua y su presencia en el extracto en metanol (aunque en mucha menor proporción), debe corresponderse con las señales obtenidas en ambos cromatogramas de HPLC, entre 3 y 5 minutos del tiempo de retención.

4.5.3. Especies

4.5.3.1. Albahaca

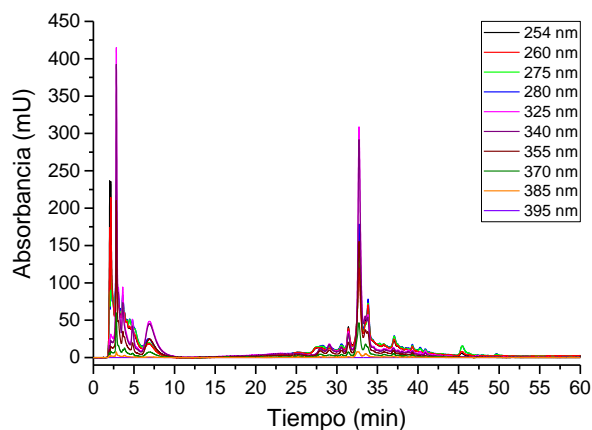


Figura 4.83. Cromatograma del extracto de Albahaca en agua a diferentes longitudes de onda.

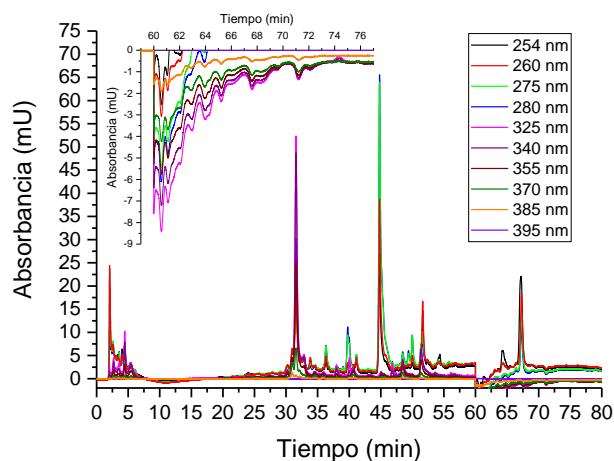


Figura 4.84. Cromatograma del extracto de Albahaca en metanol a diferentes longitudes de onda. Interior: detalle de picos de intensidad negativa.

Sobre la base de los datos obtenidos en CG-EM, se comprueba que, como se ha dicho anteriormente en el punto 4.5.2.5. *Tila*, es muy probable que compuestos como el 1,2-Bencenodiol, la Hidroquinona y el Resorcinol, presenten picos en el extracto en agua entre 2 y 5 minutos del tiempo de retención. No se han podido identificar los compuestos responsables del resto de picos presentes en los cromatogramas de HPLC, puesto que las composiciones de los extractos en agua y en metanol, obtenidos en CG-EM, son muy diferentes.

Capítulo 4

4.5.3.2. Canela en polvo

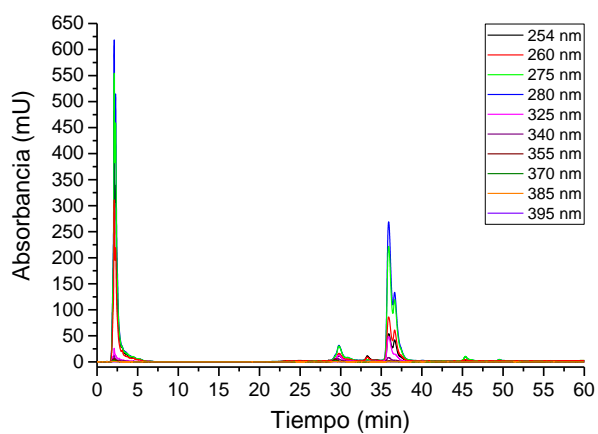


Figura 4.85. Cromatograma del extracto de Canela en Polvo en agua a diferentes longitudes de onda.

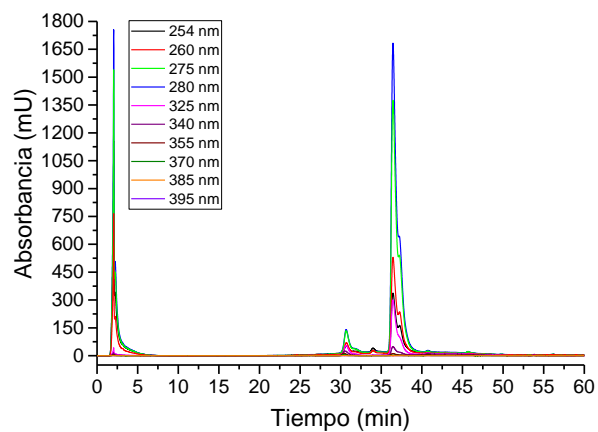
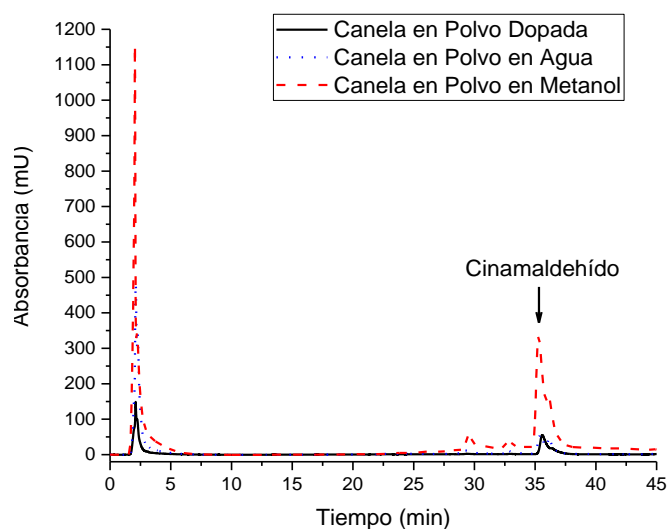


Figura 4.86. Cromatograma del extracto de Canela en Polvo en metanol a diferentes longitudes de onda.



Comparativa de los cromatogramas a longitud de onda=254nm, para las muestras de: extracto de Canela en polvo en agua, extracto de Canela en polvo en metanol y extracto de Canela en polvo dopada. La composición del extracto dopado consistió en 500 μL del extracto de Canela en agua ultrapura, 500 μL de Cinamaldehído en agua $15 \cdot 10^{-3}\text{M}$ y 1000 μL de H_2O ultrapura. Teniendo en cuenta que el Cinamaldehído es mucho más soluble en metanol, se obtuvo un pico más intenso para el extracto de Canela en polvo en metanol.

En la muestra de la Canela en Polvo se ha podido identificar el pico correspondiente al Cinamaldehído, obteniéndose para este 2372.72 p.p.m. en el extracto en agua y 12682.73 p.p.m. en el extracto en metanol.

Como puede observarse, el extracto en metanol de la Canela en polvo, es mucho más rico en Cinamaldehído, lo que es lógico, debido a que este compuesto es mucho más soluble en metanol que en agua, también por eso aparece cuando la Mezcla que compone la fase móvil es más rica en metanol.

Capítulo 4

4.5.3.3. Canela en rama

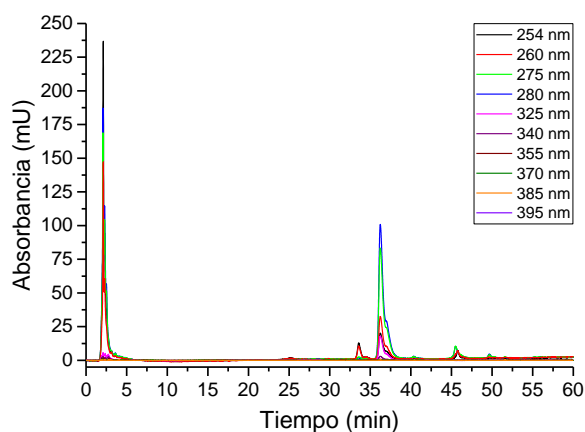


Figura 4.87. Cromatograma del extracto de Canela en Rama en agua a diferentes longitudes de onda.

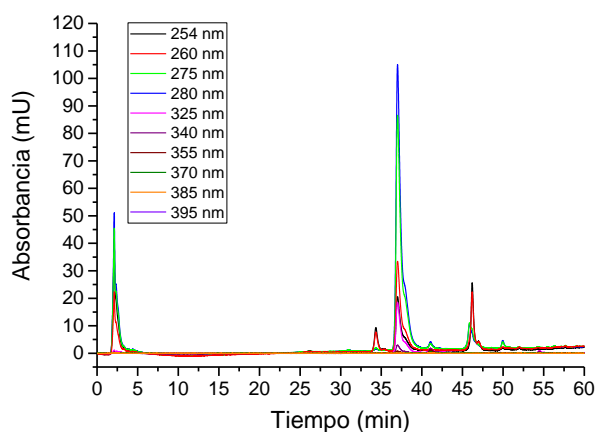


Figura 4.88. Cromatograma del extracto de Canela en Rama en metanol a diferentes longitudes de onda.

Hay 496.85 p.p.m. en el extracto en agua y 599.51 p.p.m. en el de metanol. Como se puede observar sobre la base de los resultados para las dos muestras de Canela (una en polvo y otra en rama), hay mucha diferencia en la cantidad de Cinamaldehído obtenida en el extracto acuoso y en el extracto en metanol para la muestra de Canela en polvo, mientras que para la de Canela en rama, ambas cantidades son prácticamente iguales, y también menores que en la muestra en polvo. Por tanto, se puede afirmar que el proceso

de pulverización de la Canela, favorece la extracción de sus compuestos, entre ellos, los antioxidantes.

En este caso, al igual que con las muestras de té y los compuestos Teobromina y Vainillina, el que aparezca mayor cantidad de Cinamaldehído en HPLC que en CG-EM, se debe a que el punto de inflamabilidad de este compuesto (131°C) se encuentra por debajo de su punto de ebullición (246-252°C) [47].

4.5.3.4. Clavo

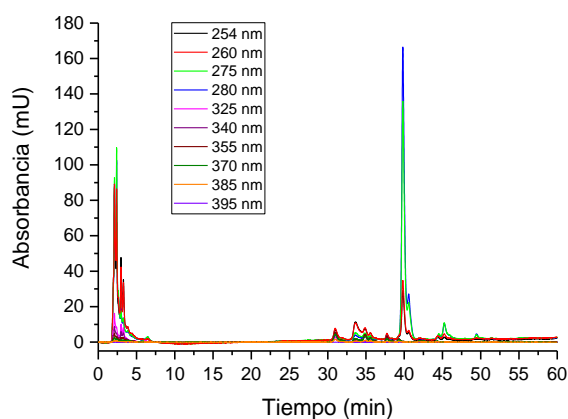


Figura 4.89. Cromatograma del extracto de Clavo en agua a diferentes longitudes de onda.

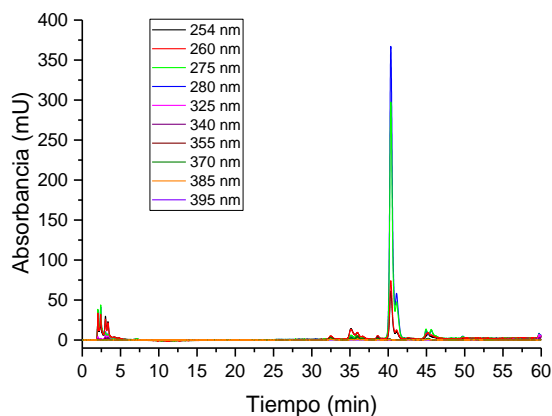


Figura 4.90. Cromatograma del extracto de Clavo en metanol a diferentes longitudes de onda.

Sobre la base de los datos obtenidos en CG-EM, se puede afirmar que el compuesto mayoritario en el Clavo, el Eugenol, se corresponde con el pico más intenso obtenido en cromatogramas de HPLC, siendo como era de esperar, mucho más intenso en el extracto en metanol. En CG-EM, este compuesto se pierde (o disminuye mucho su

Capítulo 4

concentración) en la muestra del extracto en agua, probablemente en el paso de secado. Señales similares a estas pero en menor proporción, pueden observarse en las muestras de Nuez Moscada y de Canela, especias que también presentan Eugenol en su composición, pero en menor proporción que el Clavo.

La cuantificación a partir de su coeficiente de extinción molar encontrado en la bibliografía indica que hay 541.23 p.p.m. en el extracto en agua y 1210.41 p.p.m. en el de metanol.

4.5.3.5. Comino

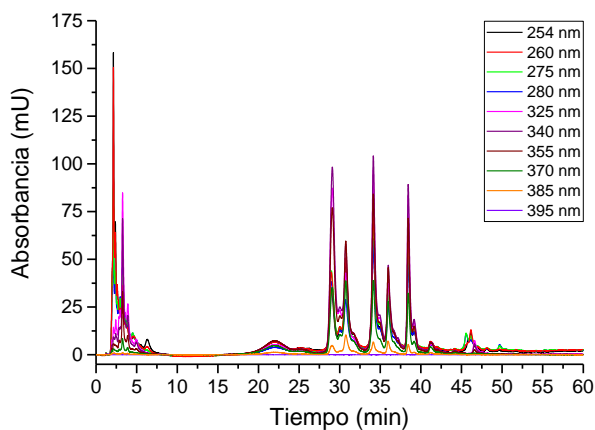


Figura 4.91. Cromatograma del extracto de Comino en agua a diferentes longitudes de onda.

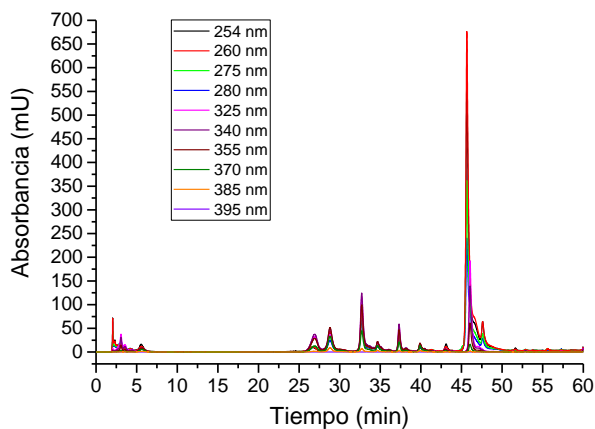


Figura 4.92. Cromatograma del extracto de Comino en metanol a diferentes longitudes de onda.

Los resultados obtenidos en CG-EM permiten asegurar que entre los picos obtenidos antes de los 10 minutos de tiempo de retención se encuentra el pico del 4-(1-metiletil)-Benzaldehído o Cuminaldehído, zona en la que también aparecen otros aldehídos aromáticos, y cuyo contenido es mucho mayor en la muestra del extracto acuoso que en la del extracto en metanol. En cuanto al resto del cromatograma no se han obtenido puntos comunes ni especialmente significativos, lo que dificulta la asignación de picos.

4.5.3.6. Cúrcuma

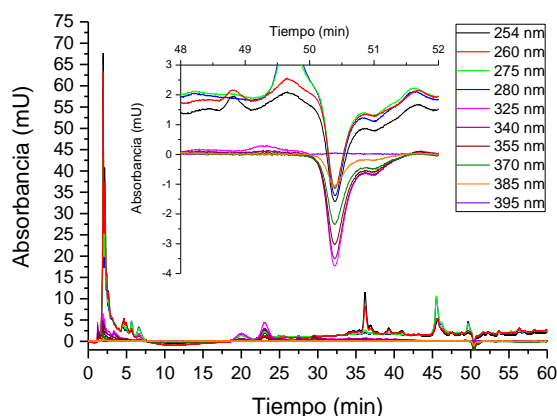


Figura 4.93. Cromatograma del extracto de Cúrcuma en agua a diferentes longitudes de onda. Interior: detalle de picos de intensidad negativa.

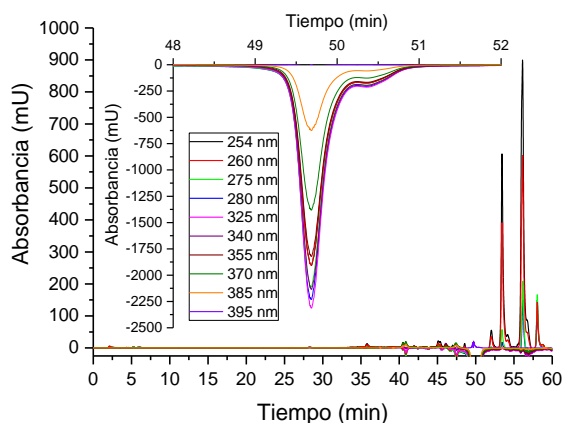


Figura 4.94. Cromatograma del extracto de Cúrcuma en metanol a diferentes longitudes de onda. Interior: detalle de picos de intensidad negativa.

Sobre la base de los datos obtenidos en CG-EM se puede identificar el pico obtenido a 49.7 minutos, el cual es inverso porque se debe a un fenómeno de fluorescencia (se

Capítulo 4

emite radiación en lugar de absorberla). El único compuesto que presenta esta propiedad en la Cúrcuma y los derivados de esta, es la Curcumina [27].

En el extracto en metanol de HPLC, se puede observar que como hay una muy pequeña proporción de aldehídos y alcoholes aromáticos, apenas hay señales antes de los 10 minutos de tiempo de retención.

4.5.3.7. Jengibre

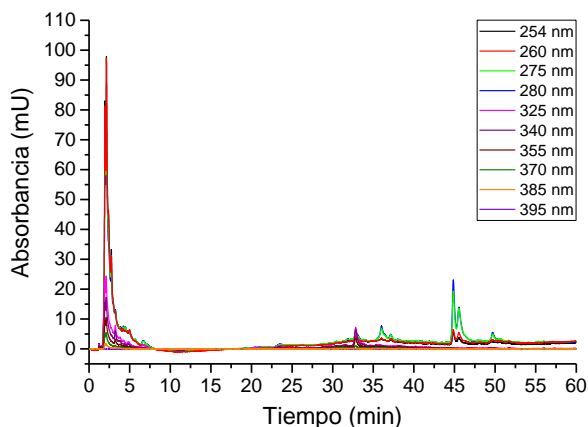


Figura 4.95. Cromatograma del extracto de Jengibre en agua a diferentes longitudes de onda.

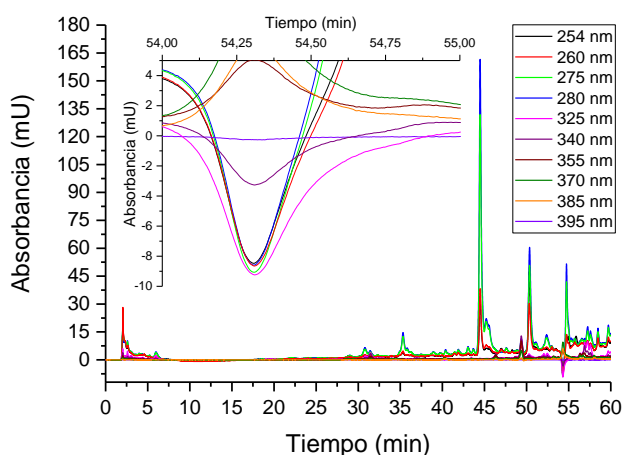


Figura 4.96. Cromatograma del extracto de Jengibre en metanol a diferentes longitudes de onda. Interior: detalle de picos de intensidad negativa.

Sobre la base de los datos de CG-EM podemos asignar en los cromatogramas de HPLC, el sistema de picos situado entre 44 y 47 minutos al Gingerol, que aparece en CG-EM

para ambos extractos, aunque se extrae mayor cantidad en metanol que en agua. Los picos situados entre 49 y 55 minutos en HPLC para el extracto en metanol pueden ser debidos a la Gingerona (al menos uno de ellos), la cual aparece en CG-EM sólo en el extracto en metanol, siendo un pico bastante significativo. Es ligeramente más apolar que el Gingerol, por lo que necesita algo más de metanol en la fase móvil para eluirse en la columna de HPLC, y tarda más en salir del sistema y ser detectado.

4.5.3.8. Nuez Moscada

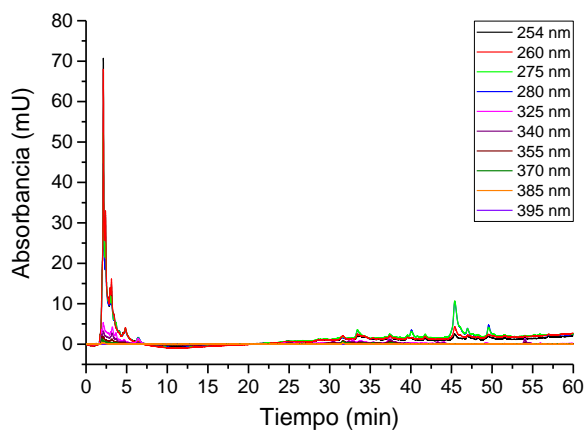


Figura 4.97. Cromatograma del extracto de Nuez Moscada en agua a diferentes longitudes de onda.

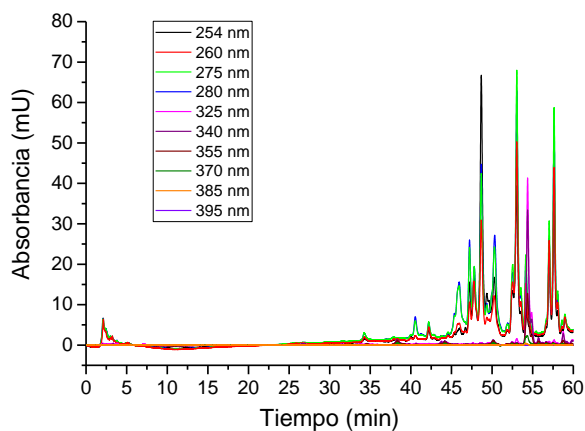


Figura 4.98. Cromatograma del extracto de Nuez Moscada en metanol a diferentes longitudes de onda.

Capítulo 4

Sobre la base de los datos obtenidos en CG-EM, y como se ha comentado anteriormente para el Clavo, se confirma la presencia de una pequeña cantidad de Eugenol, pero no se pueden asignar más picos debido al gran número de compuestos que aparecen en la muestra, y que hay pocos en común entre los extractos y las demás muestras.

4.5.3.9. Orégano

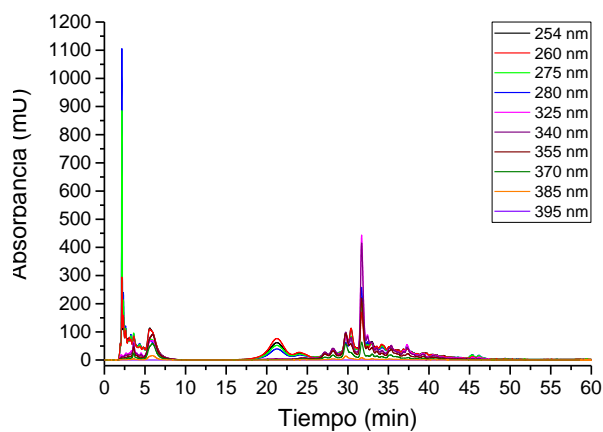


Figura 4.99. Cromatograma del extracto de Orégano en agua a diferentes longitudes de onda.

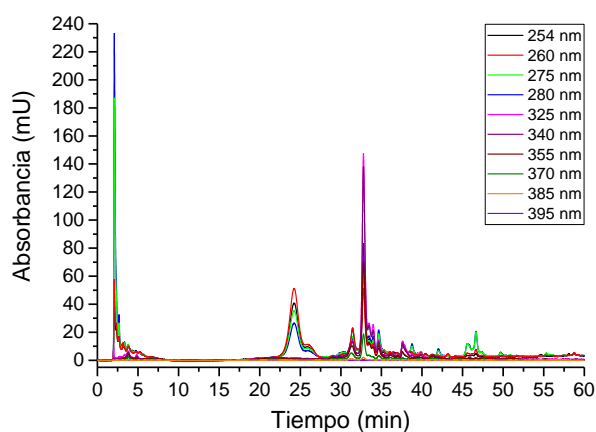


Figura 4.100. Cromatograma del extracto de Orégano en metanol a diferentes longitudes de onda.

Los resultados obtenidos en CG-EM indican que los compuestos más significativos en los extractos de Orégano son los antioxidantes Hidroquinona, Resorcinol y 1,2-Bencenodiol, difíciles de distinguir. Teniendo en cuenta la proporción obtenida en CG-

EM, la banda obtenida entre 17.8 y 26.5 minutos de tiempo de retención en el extracto en agua y la obtenida entre 21 y 27.8 minutos de tiempo de retención en el extracto en metanol en HPLC, se pueden asignar a este grupo de tres compuestos muy similares. Dado que en sus estructuras sólo varían las posiciones de los sustituyentes, cabe esperar la aparición de una banda ancha debida a la elución simultánea de los tres compuestos, durante un periodo de tiempo mayor al correspondiente a un pico bien definido, que se corresponde con un solo compuesto.

4.5.3.10. Romero

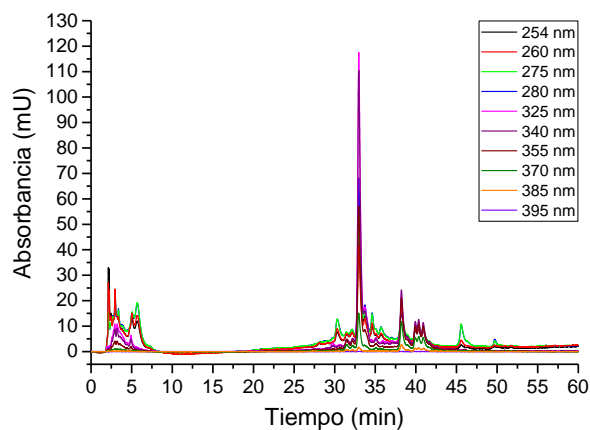


Figura 4.101. Cromatograma del extracto de Romero en agua a diferentes longitudes de onda.

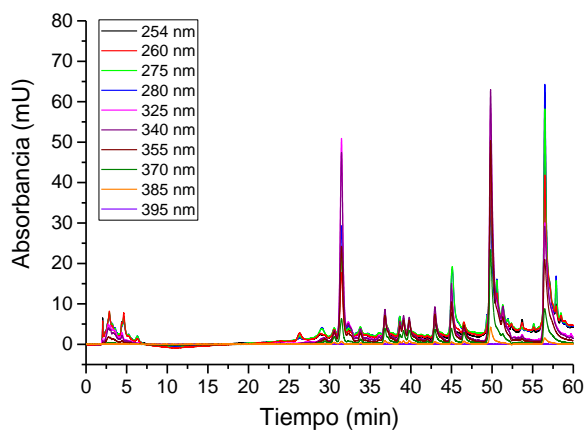


Figura 4.102. Cromatograma del extracto de Romero en metanol a diferentes longitudes de onda.

El eucaliptol es uno de los componentes obtenidos en mayor proporción para la muestra de Romero en CG-EM, y aparece también en la Salvia (aunque en menor proporción). De este modo, sobre la base de los resultados obtenidos en CG-EM se concluye que el eucaliptol es el pico obtenido en el extracto en metanol de HPLC a tiempo de retención entre 50 y 55 minutos, ya que es el único pico del cromatograma del extracto de Romero, que guarda la relación con las cantidades obtenidas en CG-EM, respecto de su correspondiente análogo en el cromatograma de la Salvia.

4.5.3.11. Tomillo

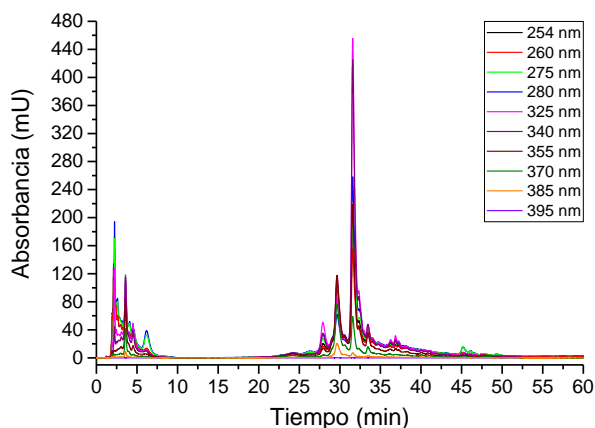


Figura 4.103. Cromatograma del extracto de Tomillo en agua a diferentes longitudes de onda.

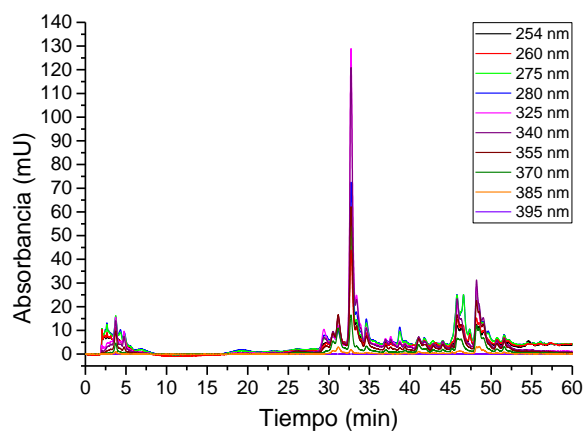


Figura 4.104. Cromatograma del extracto de Tomillo en metanol a diferentes longitudes de onda.

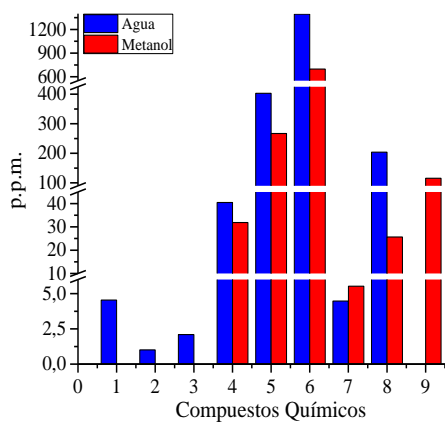
Sobre la base de los resultados obtenidos en CG-EM, se deduce, que tanto en carvacrol como el timol, presentes ambos en el Orégano y en el Tomillo, presentan picos muy similares (incluso bandas donde ambos pueden solapar), entre 45 y 50 minutos de tiempo de retención, estando limitada la cantidad obtenida en el extracto en agua, por su solubilidad, mientras que como en metanol son mucho más solubles, dan picos mayores, especialmente en el cromatograma correspondiente al Tomillo. Se ha observado que se mantiene la relación entre las cantidades obtenidas en CG-EM y las integrales de los picos entre 45 y 50 minutos de tiempo de retención, de los cromatogramas en HPLC para el Tomillo y el Orégano.

Capítulo 4

4.6. Comparativa de los extractos en agua y en metanol obtenidos en CG-EM

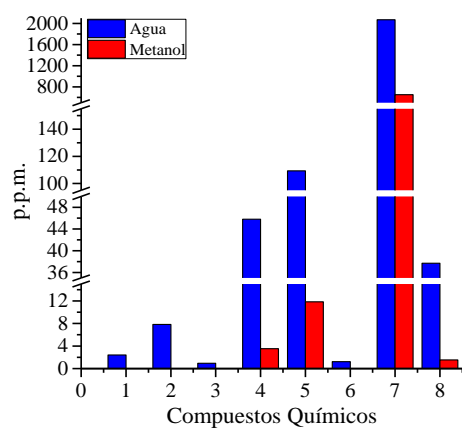
4.6.1. Tés

4.6.1.1. Té Blanco



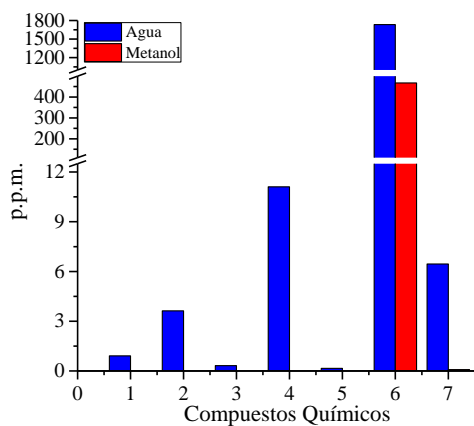
Compuesto químico	Número
Resorcinol	1
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	2
3-metoxi-1,2-Bencenodiol	3
1,2,3-Bencenotriol	4
Vainillina	5
Cafeína	6
Teobromina	7
Sacarosa	8
2-fenil-1H-Pirrolol[2,3-b]piridina	9

4.6.1.2. Té Negro



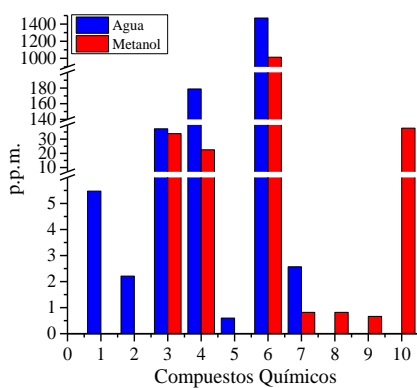
Compuesto químico	Número
Resorcinol	1
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	2
3-metoxi-1,2-Bencenodiol	3
1,2,3-Bencenotriol	4
Sacarosa	5
Ácido 4-hidroxi-benzoico	6
Cafeína	7
Teobromina	8

4.6.1.3. Té Rojo



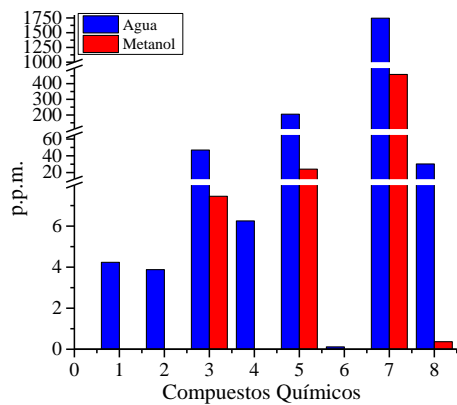
Compuesto químico	Número
Resorcinol	1
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	2
3-metoxi-1,2-Bencenodiol	3
1,2,3-Bencenotriol	4
Ácido 4-hidroxi-benzoico	5
Cafeína	6
Teobromina	7

4.6.1.4. Té Verde



Compuesto químico	Número
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	1
3-metoxi-1,2-Bencenodiol	2
1,2,3-Bencenotriol	3
Sacarosa	4
Ácido 4-hidroxi-3-metoxi-Bencenoacético	5
Cafeína	6
Teobromina	7
2-metoxi-1,4-Bencenodiol	8
4-propil-1,3-Bencenodiol	9
(1 α ,2 β ,3 α ,5 β)-1,2,3,5-Ciclohexanotetrol	10

4.6.1.5. Mezcla de 3 Té

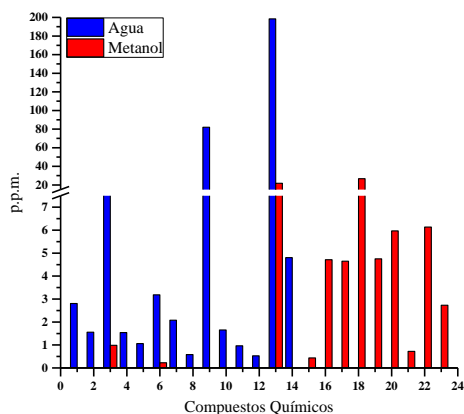


Compuesto químico	Número
Resorcinol	1
3-metoxi-1,2-Bencenodiol	2
1,2,3-Bencenotriol	3
Vainillina	4
Sacarosa	5
4-propil-1,3-Bencenodiol	6
Cafeína	7
Teobromina	8

Capítulo 4

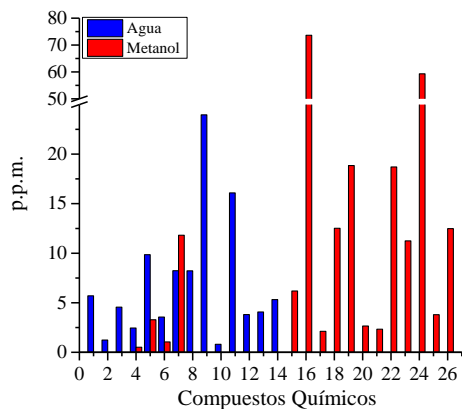
4.6.2. Infusiones

4.6.2.1. Manzanilla



Compuesto químico	Número
DL-Norvalina	1
Butirolactona	2
Glicerina	3
2,4-dihidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furan-3-ona	4
Bencenoacetaldehído	5
Timina	6
1,2-Bencenodiol	7
Indol	8
3-Metil-p-anisalaldehído	9
3-hidroxi-4-metoxi-Benzaldehído	10
Megastigmatrienona	11
4-hidroxi-3,5-dimetoxi-Benzaldehído	12
7-metoxi-1-Benzopiran-2-ona	13
2-metil-5-Pirimidinol	14
Isoxazol	15
2,6-Dimetil-4-hidroxibenzaldehído	16
tetrahydro-2,2,6-trimetil-6-(4-metil-3-ciclohexen-2H-Piran-3-ol	17
2-(2,4-hexadiinilideno)-1,6-Dioxaspiro[4.4]non-3-eno	18
ácido n-Hexadecanoico	19
Etenil-Ciclooctano	20
Clindamicina	21
Heptacosano	22
Nonadecano	23

4.6.2.2. Menta-Poleo



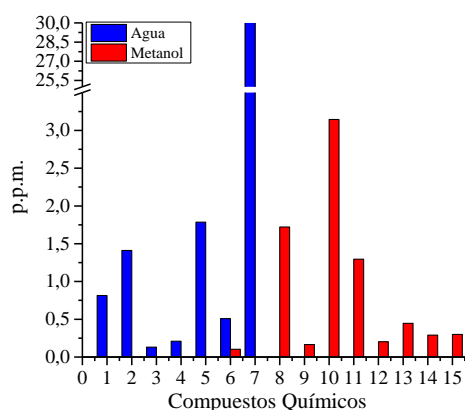
Compuesto químico	Número
Glicerina	1
Bencenoacetaldehído	2
Timina	3
Ácido benzoico	4

Compuesto químico	Número
1,2-Bencenodiol + Resorcinol	5
4-metil-Benzaldehído	6
2-isopropil-5-metil-3-Ciclohexen-1-ona	7
4-Hidroxi-2-metilacetofenona	8
2-hidroxi-6-metil-Benzaldehído	9
1,2,3-Bencenotriol	10
(1 α ,2 β ,3 α ,5 β)-1,2,3,5-Ciclohexanotetrol	11
α -D-Glucopiranosido, α -D-Glucopiranosilo	12
Crotonic acid, menthyl éster	13
Ácido 2-(acetiloxi)-propanoico, 5-metil-2-(1-metiletil)-ciclohexil éster	14
Ciclohexanona, 5-metil-2-(1-metiletil)-, trans-	15
Ciclohexanol, 5-metil-2-(1-metiletil)-, [1R-(1 α ,2 β ,5 α)]-(MENTOL)	16

Compuesto químico	Número
Mercaptofenol	17
Salicilaldehído hidrazona	18
Sacarosa	19
Óxido de Cariofileno	20
Veridiflorol	21
3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	22

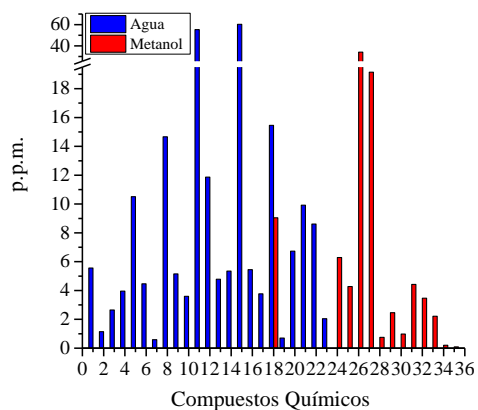
Compuesto químico	Número
α -D-Glucopiranososa	23
Ácido 11,14,17-Eicosatrienoico, metil éster	24
Geranilgeraniol	25
γ -Sitosterol	26

4.6.2.3. Rooibos



Compuesto químico	Número
Gliceraldehído	1
1,2-Bencenodiol + Resorcinol	2
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	3
Ácido Bencenoacético	4
Timol	5
2,4-dihidroxi-6-metil-Benzaldehído	6
2-C-metil-Myo-Inositol	7
3,6-dietil-1,2,4,5-Tetrazina	8
Bencenoacetaldehído	9
Ácido 4-butoxi-Butanoic acid	10
Ácido n-Hexadecanoico	11
Isomentol	12
Etenil-Ciclohexano	13
Farnesol isómero a	14
3,3-dimetil-Hexano	15

4.6.2.4. Salvia

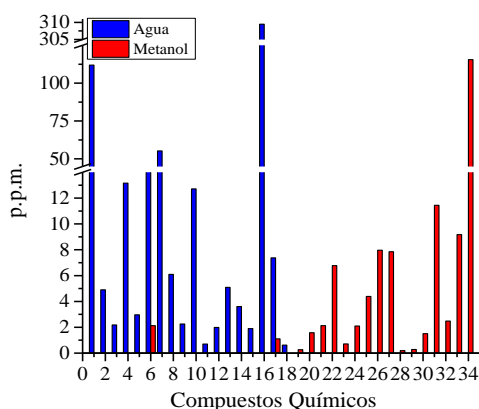


Compuesto químico	Número
Glicerina	1
2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-Piran-4-ona	2
Maltol	3
1,2-Bencenodiol	4
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	5
1,3,3-trimetil-2-Oxabiciclo[2.2.2]octan-6-ol	6
trans-p-Menta-2,8-dienol	7
2-Metoxi-4-vinil-Fenol	8
trans-p-Menta-2,8-dienol	9
4-Hidroxi-Bencenoetanol	10
3-Hidroxi-2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído + 2-hidroxi-6-metil-Benzaldehído	11
3,5-Dimetilanisol	12

Compuesto químico	Número
1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)- Etanona	13
Ácido 4-hidroxi-3-metoxi- benzoico	14
2-Hidroximetil-5-(1-hidroxi-1- isopropil)-2-ciclohexen-1-ona	15
1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)- Etanona	16
7-Acetil-2-hidroxi-2-metil-5- isopropilbicyclo[4.3.0]nonano	17
Óxido de Cariofileno	18
Ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxi- benzoico	19
6-Isopropenil-4,8a-dimetil- 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro- naftalen-2-ol	20
exo-2-Hidroxicineol	21
5-Sec-butilpirogalol	22

Compuesto químico	Número
2-metoxi-4-(1-propenil)-Fenol	23
Eucaliptol	24
α -Pino	25
Tujona	26
Borneol	27
(S)- $\alpha,\alpha,4$ -trimetil-3-Ciclohexen-1- metanol	28
Bornyl Acetato	29
1-metoxi-4-(1-propenil)-Benceno	30
p-Menta-1(7),8(10)-dien-9-ol	31
Veridiflorol	32
Ciclopropanecarboxilic acid, 2,2- dimetil-3-(2-metil-1-propenil)-,2- metil-4oxo-3-(2,4-pentadienil)-2- ciclopenten-1-il éster, [1R- [1 α [S*(Z)],3 β]]-	33
Pectolinaringenina	34
4-metil-Benzaldehído	35

4.6.2.5. Tila



Compuesto químico	Número
Sacarosa + Xilitol	1
Ftalano	2
2-metoxi-Fenol	3
2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6- metil-4H-Piran-4-ona	4
Ácido benzoico	5
1,2-Bencenodiol	6

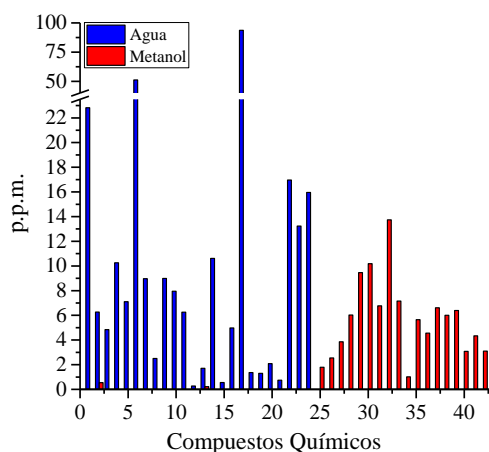
Compuesto químico	Número
2-metil-Benzaldehído + 4-metil- Benzaldehído+ 3-metil- Benzaldehído + 4-metil- Benzaldehído	7
1,2,4-Bencenotriol + 1,3,5- Bencenotriol	8
Hidroquinona	9
1-(2-hidroxi-5-metilfenil)-Etanona	10
3-hidroxi-4-metoxi-Benzaldehído	11
Ácido 4-(1-metiletil)-benzoico	12
2-hidroxi-6-metil-Benzaldehído	13
Ácido 4-hidroxi-benzoico	14
Ácido 4-hidroxi-3-metoxi- Bencenoacético	15
(1 α ,2 β ,3 α ,5 β)-1,2,3,5- Ciclohexanotetrol	16
Cafeína	17
Desaspidinol	18
Timina	19
Mentol	20
4-metil-Benzaldehído	21
Eugenol	22
Hexilresorcinol	23
2-Hidroxi-5-metilsoftalaldehído	24
Isomentol	25
Mirtenol	26

Compuesto químico	Número
Inositol	27
Bencenoacetaldehído	28
α -D-Glucosa	29
Lauroil peróxido	30

Compuesto químico	Número
Farnesol	31
Vitamina E	32
γ -Sitosterol	33
β -Amirina	34

4.6.3. Especies

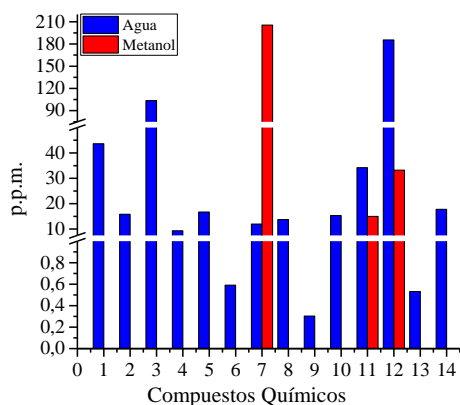
4.6.3.1. Albahaca



Compuesto químico	Número
Glicerina	1
β -Pinoeno	2
3,4-Dimetildihidrofuran-2,5-diona	3
α -Pinoeno	4
Bencenoacetaldehído	5
2(1H)- 6-hidroxi-Piridinona	6
2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-Piran-4-ona	7
BenzoylÁcido Formico	8
1,2-Bencenodiol + Resorcinol	9
3-metil-Benzaldehído	10
4-(2-propenil)- Fenol // 4-(2-propenil)- Fenol, acetato	11
Hidroquinona	12
Indol	13
Ethanone, 1-(2-hydrxy-5-metilfenil)-	14
Ácido Cinámico	15
Ácido trans-Cinámico	16

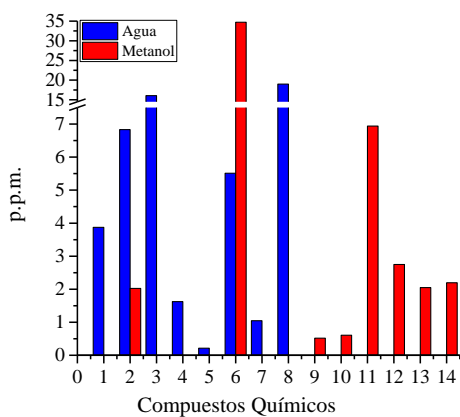
Compuesto químico	Número
2-hidroxi-6-metil-Benzaldehído + 2-Hidroxi-5-metil-Benzaldehído+ 2-Hidroxi-4-metil-Benzaldehído	17
Ácido 3-Hidroxi-4-metoxi-benzoico	18
Ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoico	19
Ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoico	20
β -Mirceno	21
Benzyl β -d-glucoside	22
4-(2-propenil)-Fenol	23
2-metoxi-4-(2-propenil)-Fenol, acetato + 2-metoxi-4-(1-propenil)-Fenol	24
Eugenol	25
Ácido benzoico, 4-etenil, metil éster	26
Cadinol	27
Bergamoteno	28
3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	29
ácido n-Hexadecanoico	30
Fitol	31
cis,cis,cis-7,10,13-Hexadecatrienal	32
Ácido 3-fenil-2-Propenoico, metil éster	33
Acetil eugenol	34
Eicosano	35
2-metilen-Ciclododecanona	36
Escualeno	37
2-metil-Octadecano	38
HenEicosano	39
2-metil-Dodecano	40
β -Sitosterol	41
Ácido (+)-3-oxo-Urs-12-en-24-oico, metil éster	42

4.6.3.2. Canela en Polvo



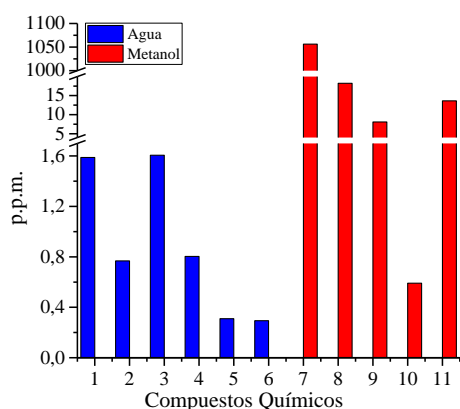
Compuesto químico	Número
2-Amino-1,3-propanodiol	1
2-Furanmetanol	2
Glicerina	3
1,2-Bencenodiol + Resorcinol	4
trans-tetrahidro-3,4-Furanodiol	5
Hidroquinona	6
(E)-Cinamaldehído	7
3-fenil-2-Propen-1-ol	8
1-Hidroxi,1-fenil-2-propanona	9
3,4-dihidro-1-Benzopiran-2-ona	10
Ácido trans-Cinámico	11
1-Benzopiran-2-ona	12
trans-4-Metoxi-Cinamaldehído	13
4-propil-1,3-Bencenodiol	14

4.6.3.3. Canela en Rama



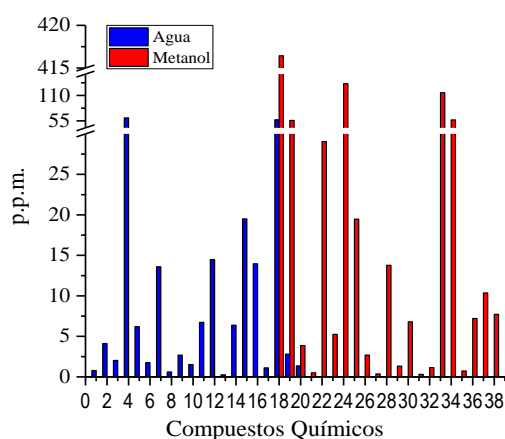
Compuesto químico	Número
ácido 2-Propenoico, 2-Hidroxietil éster	1
dl-Gliceraldehído	2
Glicerina	3
1,2-Bencenodiol + Resorcinol	4
Hidroquinona	5
Cinamaldehído	6
4-propil-1,3-Bencenodiol	7
(1 α ,2 β ,3 α ,5 β)-1,2,3,5-Ciclohexanotetrol	8
Eugenol	9
(Z,Z)- α -Farneseno	10
3-fenil-2-Propen-1-ol, acetato	11
Bencil Benzoato	12
ácido n-Hexadecanoico	13
Etenil-Ciclooctano	14

4.6.3.4. Clavo



Compuesto químico	Número
Trimetilamina + Ácido Fórmico hidrazida	1
Ácido 2-Propenoico, 2-Hidroxi-etil éster	2
dl-Gliceraldehído	3
2-Amino-3-metil-1-butanol	4
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	5
3-Hidroxi-4-metoxi-Benzaldehído	6
Eugenol	7
Cariofileno	8
α -Cariofileno	9
α -Farneseno	10
Óxido de Cariofileno	11

4.6.3.5. Comino



Compuesto químico	Número
Bencenoacetaldehído	1
Timina	2
Mirtenol	3
Alotreonina	4
Trans-2-metil-5-(1-metiletil)-Ciclohexanona	5
2,6-dimetil-Fenol	6
Ácido 4-(1-metiletil)-benzoico	7
4-etil-2-metoxi-Fenol	8
o-Metoxi- α,α -dimetilbenzil alcohol	9
4-Metil-2,5-dimetoxi-Benzaldehído	10

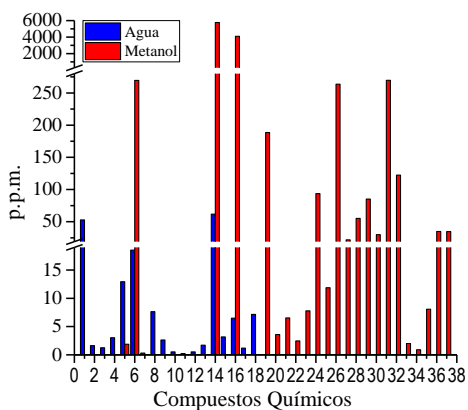
Compuesto químico	Número
3-Fenil-3-pentanol	11
(1 α ,2 β ,3 α ,5 β)-1,2,3,5-Ciclohexanotetrol	12
4-((1E)-3-Hidroxi-1-propenil)-2-metoxi-Fenol	13
2,5-O-Metilen-D-manitol	14
Inositol	15
4-(3,3-Dimetil-but-1-inil)-4-Hidroxi-2,6,6-trimetilciclohex-2-enona	16
cis-Pinen-3-ol	17
4-(1-metiletil)-Benzaldehído	18
4-(1-metiletil)-Bencenometanol	19
2-(1,1-dimetiletil)-6-metil-Fenol	20
β -Pinenol	21
1,2,4-Butanotriol	22
trans-Shisool	23
2-Caren-10-al	24
4-(1-metiletil)-1,4-Ciclohexadieno-1-metanol	25
Ácido 4-metil-benzoico, 2-Hidroxi-2-fenilpropil éster	26
Mequinol	27
Ácido 3,4-diHidroxi-Bencenoacético	28
Carotol	29
2,4,6-trimetil-Fenol + 2,3,6-trimetil-Fenol	30
4-Hidroxi-2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído+ 4-Hidroxi-3-metil-Benzaldehído	31
Fitol	32

Capítulo 4

Compuesto químico	Número
Ácidos Oleicos	33
(Z)-9,17-Octadecadienal	34
dl- α -Tocopherol	35

Compuesto químico	Número
Vitamina E	36
Estigmasterol	37
β -Sitosterol	38

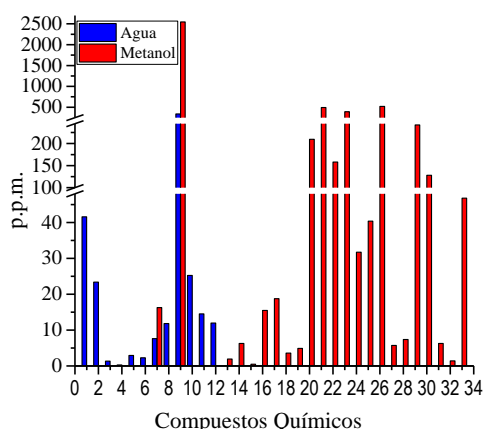
4.6.3.6. Cúrcuma



Compuesto químico	Número
(S)-1,3-Butanodiol+ Ácido Propanoico, butil éster	1
Fenol	2
Ácido Málico	3
2-metoxi-Fenol	4
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	5
2-Metoxi-4-vinil-Fenol + Timol	6
Eugenol	7
(E)-3(10)-Caren-4-ol	8
2,4-dihidroxi-6-metil-Benzaldehído + 2-Hidroxi-4-metoxi-Benzaldehído	9
4-propil-2-metoxi-Fenol	10
Biciclo[2.2.1]heptan-2-ol	11
Inositol (varios tipos) + Glucosa	12
4-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-2-Butanona + 4-(3-Hidroxi-2-metoxifenil)-2-Butanona	13

Compuesto químico	Número
Ar-tumerona	14
Ácido 4-Hidroxi-3-metoxi-Bencenoacético, metil éster	15
Ar-tumerona + Tumerona	16
(Ar-Tumerona) + (1,6-Heptadieno-3,5-diona, 1,7-bis(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-)	17
2,5-dimetil-Bencenometanol	18
2-metoxi-Fenol	19
Mequinol	20
Timol	21
4-Hidroxi-Benzaldehído	22
3-hidroxi-4-metoxi-Benzaldehído	23
Z- α -trans-Bergamotol	24
o-(3-metilbut-2-enil)-1,2-Bencenodiol	25
8-Cedren-13-ol	26
Cedreno	27
5-metil-2-(1-metil-1-feniletil)-Ciclohexanol	28
Curlona	29
trans-Longipinocarveol	30
1-[3-(2,6,6-Trimetil-ciclohex-2-enil)-4,5-dihidro-3H-pyrazol-4-yl]-etanona	31
1,7-bis(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-Heptadieno-3,5-diona	32
Benzestrol	33
Vitamina E	34
Estigmasterol	35
β -Sitosterol	36
γ -Sitosterol	37

4.6.3.7. Jengibre

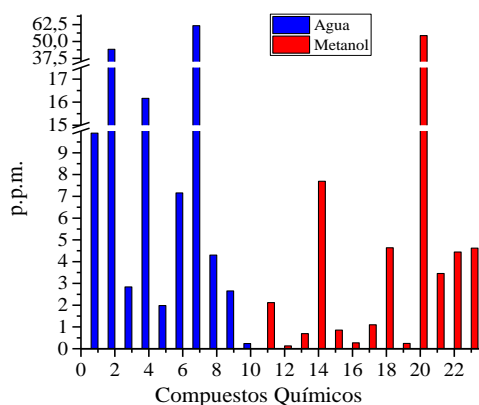


Compuesto químico	Número
Hexanal	1
Glicerina	2
2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído+ 3-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	3
Ácido α -Hidroxi-Bencenopropanoico,	4
Vainillina	5
3-metoxi-2,5,6-trimetil-Fenol	6
α -Bisabolol	7
Etil α -d-Glucopiranosido	8
Gingerol	9
3,7,11-trimetil-6,10-Dodecadien-1-yn-3-ol	10
6-(p-Tolil)-2-metil-2-heptenol	11

Compuesto químico	Número
(-)-Nortraquelogenina	12
2-metoxi-Fenol + Mequinol	13
Borneol	14
$\alpha,\alpha,4$ -trimetil-Bencenometanol	15
2-metil-5-(1-metiletil)-Fenol + 2-etil-4,5-dimetil-Fenol	16
4-Hidroxi-2-metilacetofenona + 4-Hidroxi-3-metilacetofenona	17
2-metoxi-4-(1-propenil)-Fenol + 2-metoxi-3-(2-propenil)-Fenol + 2-metoxi-6-(2-propenil)-Fenol	18
3-hidroxi-4-metoxi-Benzaldehído + 4-Hidroxi-2-metoxibenaldehído	19
1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil-Benceno	20
2,6-dimetil-6-(4-metil-3-pentenil)-Biciclo[3.1.1]hept-2-eno	21
(S)-1-metil-4-(5-metil-1-Metilen-4-hexenil)-Ciclohexeno	22
[S-(R*,S*)]-3-(1,5-dimetil-4-hexenil)-6-Metilen- Ciclohexeno	23
Hinesol	24
4-(3-Hidroxi-1-propenil)-2-metoxi-Fenol	25
Gingerona / Zingerona	26
Ácido 4-Hidroxi-3-metoxi-Bencenoacético, metil éster	27
Z- α -trans-Bergamotol	28
Ácido cis-13-Octadecenoico	29
3-(3-Hidroxi-4-metoxifenil)-l-alanina	30
Piperina	31
γ -Tocoferol	32
γ -Sitosterol	33

Capítulo 4

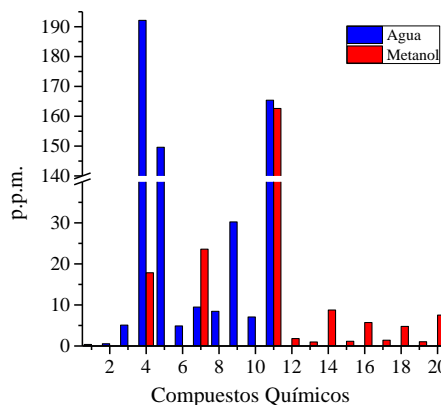
4.6.3.8. Nuez Moscada



Compuesto químico	Número
Gliceraldehído	1
Glicerina	2
1,2-Bencenodiol	3
2-metoxi-4-(1-propenil)-Fenol	4
Vainillina	5
1,5-Anhidro-d-manitol	6
2,6-dimetoxi-4-(2-propenil)-Fenol	7

Compuesto químico	Número
α -D-Glucopiranosido + β -D-Glucopiranosido	8
4-hidroxi-3,5-dimetoxi-Benzaldehído	9
Vinbarbital	10
α -Felandreno	11
1S- α -Pino	12
β -Pino	13
4-metil-1-(1-metiletil)-3-Ciclohexen-1-ol	14
Eugenol	15
β -Mirceno	16
α -Cubebeno	17
1,2-dimetoxi-4-(2-propenil)-Benceno	18
4-Metilen-1-(1-metiletil)-Biciclo[3,1,0]hexano	19
4-metoxi-6-(2-propenil)-1,3-Benzodioxol	20
1,2,3-trimetoxi-5-(2-propenil)-Benceno	21
Ácido Tridecanoico	22
Ácido Benzo[1,2,5]oxadiazol-5-carboxílico-1-óxido, metil éster	23

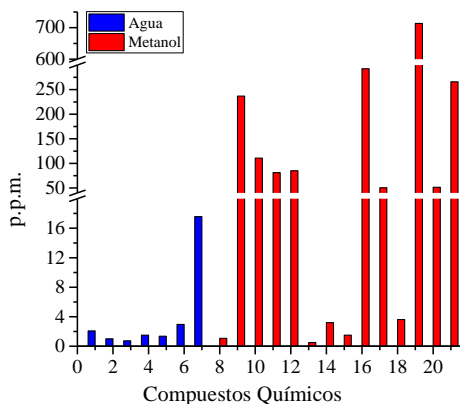
4.6.3.9. Orégano



Compuesto químico	Número
2,5-Norbornadieno	1
Bencenoacetaldehído	2
1,3,8-p-Mentatrieno	3
1,2-Bencenodiol + Resorcinol	4
Hidroquinona	5

Compuesto químico	Número
Indol	6
Carvacrol	7
4-Hidroxi-Bencenometanol	8
2-hidroxi-6-metil-Benzaldehído	9
Cariofileno	10
1,2-Bencenodiol+Resorcinol + Hidroquinona	11
α -Felandreno	12
β -Felandreno	13
(1 α ,2 β ,5 α)-2-metil-5-(1-metiletil)-Biciclo [3.1.0]hexan-2-ol	14
(1 α ,2 α ,5 α)-2-metil-5-(1-metiletil)-Biciclo [3.1.0]hexan-2-ol	15
4-metil-1-(1-metiletil)-3-Ciclohexen-1-ol	16
α -Pino	17
2-Hidroxi-5-metil-Benzaldehído	18
Fitol	19
Ácido (Z,Z,Z)-9,12,15-Octadecatrienoico	20
Vitamina E	

4.6.3.10. Romero

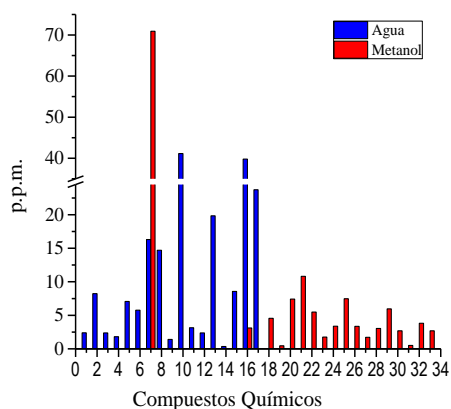


Compuesto químico	Número
2-Amino-1,3-propanodiol	1
N-Nitrosodimetilamina	2
2-Hidroxi-2-Ciclopenten-1-ona	3
Ácido Formico, 2-propenil éster	4
Resorcinol + Hidroquinona	5
2-hidroxi-6-metil-Benzaldehído + 3-Hidroxi-2-metil-Benzaldehído + 4-metil-Benzaldehído	6

Compuesto químico	Número
(1 α ,2 β ,3 α ,5 β)-1,2,3,5-Ciclohexanotetrol	7
β -Pino	8
Eucaliptol	9
Alcanfor	10
Borneol	11
α,α ,4-trimetil-3-Ciclohexeno-1-metanol	12
4-(1-metiletil)-Benzaldehído	13
2-metil-5-(1-metiletil)-Fenol	14
3-(4-metoxifenoxi)-Benzaldehído	15
2-Fenantrenol, 4b,5,6,7,8,8a,9,10-octahidro-4b,8,8-trimetil-1-(1-metiletil)-, (4bS-trans)- // Totarol	16
5-Hidroxi-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-1-Benzopiran-4-ona	17
Vitamina E	18
4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-Octametil-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-octadecahidro-2H-picen-3-one // α -Amirina	19
3,5,6,7,8,8a-hexahidro-4,8a-dimetil-6-(1-metiletenil)- 2(1H)Naftalenona	20
Betulina	21

Capítulo 4

4.6.3.11. Tomillo



Compuesto químico	Número
DL-Norvaline	1
Glicerina	2
Timina	3
Mequinol	4
1,2-Bencenodiol	5
Indol	6
Timol	7
Fenol, 2,6-dimetoxi-	8
2,4-dihidroxi-6-metil-Benzaldehído	9
2-hidroxi-6-metil-Benzaldehído + 2-Hidroxi-4-metil-Benzaldehído	10
4-(1,1-dimetiletil)-1,2-Bencenodiol + 2-(1,1-dimetiletil)-1,4-Bencenodiol	11
4-(1-metiletil)-Benzaldehído	12

Compuesto químico	Número
(1 α ,2 β ,3 α ,5 β)-1,2,3,5-Ciclohexanotetrol	13
3-Hidroxi-4-metil-Benzaldehído	14
Megastigmatrienona	15
Cariofileno	16
[2R-(2 α ,4 α ,8 $\alpha\beta$)]-decahidro- α , α ,4 α -trimetil-8-Metilen-2-Naftalenmetanol	17
Eucaliptol	18
β -Pino	19
Alcanfor	20
Borneol	21
3-Ciclohexene-1-metanol, α , α 4-trimetil-	22
Camphene	23
3,7-Ciclododecadieno-1-metanol, α , α ,4,8-tetrametil-, [s-(Z,Z)]	24
[1 α -(1 α ,4 α ,7 β ,7 $\alpha\beta$)]-decahidro-1,1,7-trimetil-4-Metilen-1H-Cicloprop[e]azulen-7-ol	25
Óxido de Cariofileno	26
(2R-cis)-1,2,3,4,4 α ,5,6,7-octahidro- α , α ,4 α ,8-tetrametil-2-Naftalenmetanol	27
[2R-(2 α ,4 α ,8 $\alpha\beta$)]-1,2,3,4,4 α ,5,6,8 α -octahidro- α , α ,4 α ,8-tetrametil-2-Naftalenmetanol	28
Carotol	29
ácido n-Hexadecanoico	30
Fitol	31
Triciclo[4.3.1.0(2,5)]decano	32
2-etil-2-metil-Tridecanol	33

4.6.4. Comentarios sobre los resultados obtenidos en CG-EM y HPLC

A pesar de que la técnica de CG-EM proporciona gran cantidad de información, se ve limitada por la descomposición térmica y por las temperaturas de ebullición de los componentes de la muestra. Esto fue lo que ocurrió con algunos de los antioxidantes más extendidos en la naturaleza y presentes en algunas de las muestras, como el ácido gálico y la vainillina de los tés, el mentol de la menta poleo, el cinamaldehído de la canela y la vitamina E presente en gran cantidad de muestras (té blanco, té verde, tila, comino, cúrcuma, orégano y romero), así como otros compuestos característicos como la teobromina y el epigallocatequin-galato de los tés, y el alcanfor de la salvia y el romero. Como contrapartida, pudieron monitorizarse otros muchos compuestos realmente interesantes y que presentan actividad antioxidante así como compuestos característicos de determinadas muestras y otros que se utilizaron como factores comunes y comparativos para la composición de las diferentes muestras de té.

En los extractos de tés, tanto acuosos como alcohólicos, el principal componente es la cafeína, siendo su contenido, en el menor de los casos, superior al 69 %. Hay que destacar la similitud en la composición de los diferentes tipos de té, aunque la cantidad de los compuestos varía en función del té. También hay que tener en cuenta, como ya se ha comentado, que algunos de los compuestos que más interesan, no solo no alcanzan el punto de ebullición en el rango de temperaturas que permite el equipo, sino que muchos de ellos, antes de alcanzar ese punto, se inflaman, provocando un error por defecto, si es que se obtiene parte de la señal correspondiente a ellos. Los tés son las únicas muestras estudiadas en esta tesis que presentaban mayor número de compuestos comunes en los dos tipos de extractos realizados, aun así la mayor de compuestos antioxidantes se extrajeron en agua.

Las infusiones presentan una gran variedad en su composición y entre ellas, siendo esta mucho más compleja que la de los tés. Abundan los compuestos relativos a hierbas y plantas aromáticas, así como algunos presentes en la madera. Los extractos que se obtienen son muy diferentes, dependiendo de si el extractante es agua o metanol. Algunos de los compuestos más característicos de las plantas utilizadas en las infusiones y presentes en sus aceites esenciales, se pueden extraer sólo en metanol, y por tanto se encuentran en cantidades muy pequeñas (si se extraen) en las infusiones que se consumen como bebida, donde el extractante utilizado es el agua. En cuanto a la cantidad de polifenoles, se ha comprobado que es muy baja o nula, sin ser una parte significativa de los extractos. Los compuestos antioxidantes extraídos de las infusiones, varían en función de la infusión que se trate.

Para las especias se ha comprobado que los extractos son muy diferentes en función de si se realizan en agua o en metanol, siendo muy pocos los compuestos comunes a ambos extractos, y si los hay, aparecen en cantidades muy dispares. La cantidad de compuestos antioxidantes extraídos de las especias varía mucho en función de la especia de la que

Capítulo 4

se trate, presentando un contenido mayor en el extracto acuoso aquellas especias de hoja verde, como la Albahaca, el Orégano y el Tomillo, y un mayor contenido en antioxidantes en el extracto en metanol el resto de especias.

Debido a la termolabilidad y/o la dificultad para llegar al punto de ebullición de algunos de los componentes de la muestra, se optó por utilizar la técnica de HPLC. Esta técnica es mucho menos agresiva y la temperatura de trabajo es baja, por lo que no afecta la termolabilidad, siendo además independiente del punto de ebullición, ya que los factores determinantes son la solubilidad y la polaridad de los diferentes compuestos.

Gracias a esta técnica se ha determinado el contenido en algunos antioxidantes de alto interés como ácido gálico, vainillina y cinamaldehído mediante el método del patrón externo. También se cuantificaron los polifenoles mediante una variante del método descrito por *J. González-Rodríguez et al.* [45]. De esta forma, se pudo llevar a cabo la cuantificación de compuestos con carácter antioxidante de cada muestra. Además, esto permitió obtener valores más exactos para la teobromina, ya que en HPLC no se altera por acción de la temperatura. Los resultados obtenidos para la cafeína son consistentes con los obtenidos en CG-EM. No obstante, la carencia de estándares dificultó la identificación de algunos compuestos, algo que se pudo compensar en parte, con los resultados obtenidos en CG-EM, ya que las proporciones y características de estos permitieron asignar picos en HPLC.

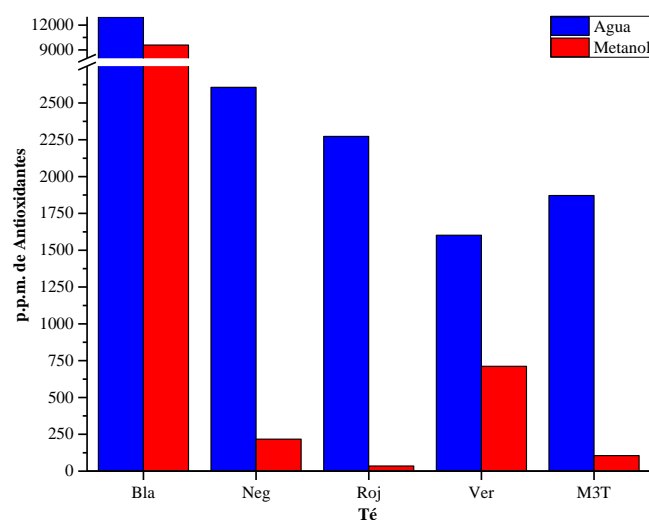
Las composiciones de las infusiones son muy variadas, mucho más complejas que las de los té. Abundan los componentes habituales de hierbas y de plantas aromáticas, así como algunos integrantes de fracciones solubles de la madera. Los extractos que se obtienen son muy diferentes dependiendo de si la extracción se realiza en agua o en metanol. Algunos de los compuestos más característicos de las plantas utilizadas en las infusiones y presentes en sus aceites esenciales, se pueden extraer sólo en metanol, y por tanto se encuentran en cantidades muy pequeñas, si es que llegan a extraerse, en las infusiones que se consumen como bebida, donde la extracción se realiza en agua. En cuanto a la cantidad de polifenoles, se ha comprobado que es muy baja o nula, sin ser una parte significativa de los extractos. Los compuestos antioxidantes extraídos de las infusiones, varían en función de la infusión que se trate. Al igual que ocurre con las infusiones, en las muestras de especias tampoco se ha encontrado ácido gálico ni polifenoles.

Hay que destacar que los extractos de rooibos fueron menos ricos en compuestos extraídos en general, y en antioxidantes en particular, debido al carácter leñoso de la muestra, que dificulta la extracción de los compuestos.

4.7. Comparativa del Contenido en Antioxidantes de los extractos en agua y en metanol

En esta sección se discuten los contenidos en antioxidantes determinados por CG-EM, fundamentalmente, a los que se ha añadido los obtenidos e identificados en HPLC.

4.7.1. Tés



En la gráfica de barras puede observarse la comparativa entre el contenido total en antioxidantes, expresado en p.p.m. de antioxidantes totales para cada tipo de té: Blanco (*Bla*), Negro (*Neg*), Rojo (*Roj*), Verde (*Ver*) y Mezcla de 3 Tés (*M3T*). En estos datos se han incluido los antioxidantes volátiles y los polifenoles totales, la vainillina y el ácido gálico obtenidos en HPLC.

En primer lugar, se observa que el té con mayor contenido en antioxidantes es el Té Blanco, debido a la vainillina añadida artificialmente a este té. El segundo té más rico en antioxidantes totales es el Té Negro, debido al elevado contenido que presenta este té en polifenoles, así como antioxidantes volátiles.

El Té Verde es el que presenta mayor contenido en antioxidantes en el extracto en metanol (sin contar el Té Blanco que cuenta con la vainillina añadida).

La Mezcla de 3 Tés, cuya composición contiene Té Blanco, Té Rojo y Té Verde, presenta una composición más o menos media entre el Té Rojo y el Té Verde, sin poder llegar a determinarse el contenido relativo a cada uno, ya que no se disponía del Té Blanco utilizado para preparar esta Mezcla.

Se puede apreciar que, a excepción del Té Verde donde el contenido en antioxidantes de ambos extractos es parecido, en el resto de tés, hay una mayor cantidad de

Capítulo 4

antioxidantes en el extracto en agua que en el extracto en metanol. Esto es debido a que los principales polifenoles que encontramos en los tés son las epicatequinas, los epicatequin-galatos, las epigalocatequinas y los epigalocatequin-galatos [48, 49]. El té que presenta un mayor contenido en estos compuestos, especialmente en epigalocatequin-galato, es el Té Verde, y teniendo en cuenta las solubilidades de estos [50, 52-55], podemos apreciar que el epigalocatequin-galato es entre 4 y 10 veces más soluble en alcohol que en agua [54, 55], por lo que se extraerá más con ese disolvente y más aún en el Té Verde. En CG-EM, no aparece ninguno de estos polifenoles, ya que sus puntos de ebullición son muy altos (499°C para la epicatequina [51] y 909.1 para el epigalocatequin-galato [54, 55]), teniendo algunos como el epigalocatequin-galato un punto de inflamabilidad a 320°C [54], de manera que no pasa a estado gaseoso sino que se inflama antes (aunque en nuestro método no hemos alcanzado dicha temperatura).

La cantidad total de antioxidantes, no implica necesariamente, que ese extracto tenga una mayor capacidad antioxidante, ya que hay que considerar también la naturaleza de los antioxidantes propiamente dicha.

La secuencia en el ensayo de DPPH para los extractos acuosos es [57]:

Blanco > Verde \approx Negro > Rojo

Mientras que en el ensayo de VPD con H₂O₂ es:

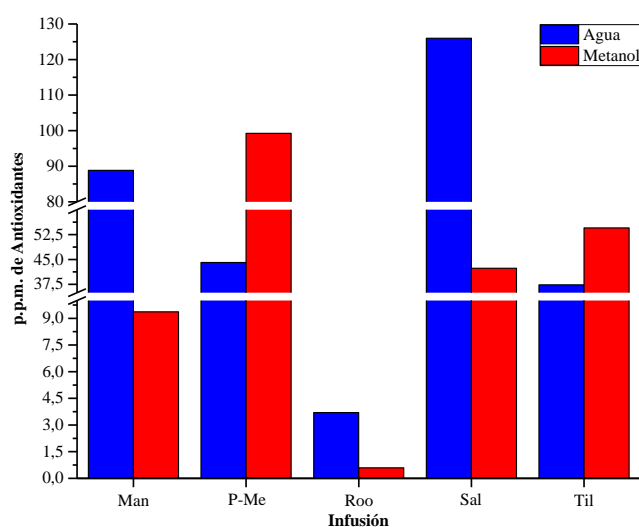
Verde > Blanco > Negro > Rojo

En cuanto al contenido total en antioxidantes, la secuencia es:

Blanco > Negro > Rojo > Verde

Todas las secuencias son diferentes. Esto es debido a que los dos ensayos miden distinta reactividad de los antioxidantes, siendo el VPD más específico para antioxidantes secundarios, esto es, para evaluar la capacidad de atrapamiento de radicales (ensayo tipo HAT), mientras que el DPPH evalúa otras reacciones (ensayo tipo HAT y tipo SET). En cualquier caso, los contenidos totales de antioxidantes tampoco dan cuenta completamente de la capacidad antioxidante de los mismos, de lo cual se puede concluir que, independientemente del tipo de ensayo empleado, la naturaleza de las moléculas contenidas en los extractos es un factor determinante.

4.7.2. Infusiones



En la gráfica de barras puede observarse la comparativa entre el contenido total en antioxidantes, expresado en p.p.m. de antioxidante por gramo, de diferentes infusiones: Manzanilla (*Man*), Menta-Poleo (*P-Me*), Rooibos (*Roo*), Salvia (*Sal*) y Tila (*Til*).

Hay que indicar que en ningún caso se han encontrado ácido gálico ni polifenoles en la composición de las infusiones.

En el caso de las infusiones, se observa que el extracto de Salvia en agua es el que presenta un mayor contenido en antioxidantes. En el caso de la Menta-Poleo, es mayor el contenido del extracto en metanol, debido a que el mentol (su principal antioxidante), es mucho más soluble en medios orgánicos.

Hay que destacar que, como ya se ha dicho, los extractos de Rooibos fueron menos ricos en compuestos extraídos en general, y en antioxidantes totales en particular, debido al carácter leñoso de la muestra.

En cuanto a la actividad antioxidante de los extractos acuosos, las secuencias son [57]:

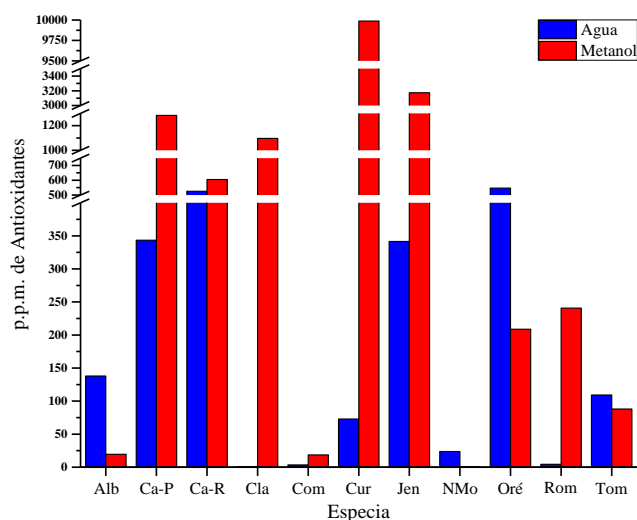
Salvia > Menta-Poleo > Rooibos > Tila > Manzanilla (Ensayo DPPH)

Tila > Menta-Poleo > Rooibos > Salvia > Manzanilla (Ensayo VPD)

En ambos casos, las secuencias son muy diferentes de las obtenidas para los contenidos totales de antioxidantes, lo que indica que en este caso la naturaleza de los antioxidantes también es muy importante.

Capítulo 4

4.7.3. Especias



En la gráfica de barras puede observarse la comparativa entre el contenido total en antioxidantes, expresado en p.p.m. de antioxidante por gramo de las especias: Albahaca (*Alb*), Canela en Polvo (*Ca-P*), Canela en Rama (*Ca-R*), Clavo (*Cla*), Comino (*Com*), Cúrcuma (*Cúr*), Jengibre (*Jen*), Nuez Moscada (*NMo*), Orégano (*Oré*), Romero (*Rom*) y Tomillo (*Tom*).

Al igual que para las infusiones, en ningún caso se han encontrado ácido gálico ni polifenoles en la composición de los extractos de las especias.

Como se puede observar en la gráfica, el contenido total en antioxidantes es muy diferente entre las especias, obteniéndose datos de lo más dispares:

- En algunos casos, el contenido total en antioxidantes es mucho mayor en el extracto en metanol, simplemente debido a que los compuestos de estas muestras que presentan actividad antioxidante, son muy poco solubles o insolubles en agua. Este es el caso del Clavo (el más extremo), donde el principal antioxidante es el Eugenol; la Cúrcuma, con la Tumerona, la Ar-Tumerona y la Curcumina y el Jengibre con el Gingerol y la Gingerona.

También es el caso de la Canela, tanto en polvo como en rama. Esto es debido a que el Cinamaldehído es mucho más soluble en el metanol que en agua. La cantidad de Cinamaldehído que se ha tenido en cuenta, es la obtenida en HPLC, ya que como se ha dicho previamente, este compuesto se descompone con la temperatura. En las muestras de Canela podemos encontrar otro compuesto antioxidante muy característico, el Ácido Cinámico, que es más soluble en agua, pero se encuentra en mucha menor proporción

que el Cinamaldehído. También hay que destacar, que el hecho de que la muestra esté pulverizada, facilita mucho la extracción de sus componentes.

En el caso del Romero, ocurre lo mismo que en los anteriores: el extracto en metanol es más rico en antioxidantes. Aun así, como se ha explicado en el punto 4.4.3.10., algunos compuestos con cualidades antioxidantes que se obtienen en el extracto en metanol, no han podido determinarse debido a que sus puntos de ebullición son muy altos. El carnosol además presenta un punto de inflamabilidad en torno a 187°C [56], muy por debajo de su punto de ebullición, lo que implica que se descompone mucho antes de que pase a estado gaseoso.

- Al contrario de lo que se ha expuesto para las muestras anteriores, en otros casos, el contenido total en antioxidantes es mucho mayor en el extracto en agua, como cabe esperar, debido a la solubilidad de los compuestos antioxidantes y a que esta vez son más polares. En este grupo, podrían incluirse la Albahaca, el Orégano y el Tomillo, curiosamente todos ellos, especias de hoja verde. Estas tres especias presentan una gran cantidad de compuestos aromáticos hidrox-sustituídos y solubles en agua, en su composición. La Albahaca es el caso más extremo, siendo casi siete veces mayor el contenido en antioxidantes del extracto acuoso respecto del extracto en metanol. El Orégano, presenta el mayor contenido en antioxidantes del extracto acuoso de las especias estudiadas, siendo aproximadamente 2,5 veces mayor con respecto de su extracto en metanol. El Tomillo, por su parte, presenta poca diferencia entre las cantidades de antioxidantes obtenidas en ambos extractos, diferenciándose tan solo alrededor de un 20%.

- Por último, encontramos las especias cuyo contenido total en antioxidantes es bajo, tanto en el extracto en agua como en metanol. Estas especias poseen un bajo contenido en antioxidantes, sirviendo perfectamente para aderezar guisos y comidas, dando unas notas sensoriales de olor y sabor características, pero sin actuar especialmente como fuente de antioxidantes. Entre estas, encontramos al Comino y a la Nuez Moscada. El Comino, dentro de los bajos valores que proporciona, tiene como predominante la fracción extraída en metanol, mientras que para la Nuez Moscada es la acuosa. El hecho de tener una pequeña cantidad de antioxidantes no significa necesariamente que tengan poca capacidad antioxidante.

De esta forma, se puede afirmar que para especias como el Clavo, la Cúrcuma, el Jengibre, la Canela, el Romero y el Comino, se aconseja utilizar fracciones lipídicas (como aceites) y/o alcohólicas (vinos, whisky, etc.) para la preparación de platos donde se quiera aprovechar al máximo su contenido en antioxidantes. Mientras que para especias como la Albahaca, el Orégano, el Tomillo y la Nuez Moscada, es suficiente con añadir agua cuando se cocine con ellos, para extraer la mayor parte de su contenido en antioxidantes.

4.8. Bibliografía

- [1] CRC Handbook of Chemistry and Physics, 91th Edition (2010) 8-47.
- [2] A. C. Eslami, W. Pasanphan, B. A. Wagner, G. R. Buettner, *Chem. Cent. J.* (2010) 4:15.
- [3] K. Y. Tama, K. Takács-Novák, *Anal. Chim. Acta* 434 (2001) 157-167.
- [4] S. T. Saito, A. Welzel, E. S. Suyenaga, F. Bueno, *Food Sci. Tech.-Brazil* 26 (2) (2006) 394-400.
- [5] J. F. Arteaga, M. Ruiz-Montoya, A. Palma, G. Alonso-Garrido, S. Pintado, J. M. Rodríguez-Mellado, *Molecules* 17 (2012) 5126-5138.
- [6] Teobromina: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5236.html?rid=0d5b3b48-3bc5-4284-85b3-30b02dfb2546>
- [7] Vainillina: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.13860434.html?rid=f187cd60-e772-4848-b3d6-b80c1b63bce0>
- [8] A. Tai, T. Sawano, F. Yazama, H. Ito, *Biochim. Biophys. Acta* 1810 (2011) 170-177.
- [9] W. Reynolds, R. Naf-Muller, U. Keller, B. Willhalm, G. Ohloff, *Helv. Chim. Acta* 57 (5) (1974) 1301-1308.
- [10] N. D. Ghasemi, G. Asghari, A. Mostajeran, A. M. Najafabadi, *J. Curr. Chem. Pharm.* 3(1) (2013) 54-59.
- [11] R.S. Verma, L. Rahman, R. K. Verma, A. Chauhan, A. K. Yadav, A. Singh, *Open Access Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 1(1) (2010) 13-18.
- [12] Mentol: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.15803.html>
- [13] A. Raal, A. Orav, E. Arak, *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* 21 (5) (2007) 406-411.
- [14] P. A. G. M. De Smet, K. Keller, R. Hänsel, R. F. Chandler, *Adverse Effects of Herbal Drugs* 2 (1993) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 303-306.
- [15] M.S. Brewer, *Compr. Rev. Food Sci. F.* 10 (2011) 221-247.
- [16] R. Amarowicz, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111 (2009) 411-412.
- [17] E. Finotti, M. D'Ambrosio, F. Paoletti, V. Vivanti, G. Quaglia, *Nahrung* 44 (2000) 373-374.
- [18] Tocoferol o Vitamina E: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.14265.html>
- [19] B. Shan, Y. Z. Cai, M. Sun, H. Corke, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 7749-7759.
- [20] C. Sproll, W. Ruge, C. Andlauer, R. Godelmann, D. W. Lachenmeier, *Food Chem.* 109 (2008) 462-469.
- [21] K. G. Miller, C. F. Poole, T. M. P. Pawlowski, *Chromatographia* 42 (1996) 639-646.
- [22] I. B. Rebey, N. Zakhama, I. J. Karoui, B. Marzouk, *J. Food Sci.* 77 (6) (2012) C734-C739.

- [23] D. Morshedi, F. Aliakbari, A. Tayaranian-Marvian, A. Fassihi, F. Pan-Montojo, H. Pérez-Sánchez, *J. Food Sci.* 80 (10) (2015) H2336-H2345.
- [24] D. K. Gounder, J. Lingamallu, *Ind. Crop. Prod.* 38 (2012) 124-131.
- [25] G. Singha, I.P.S. Kapoora, P. Singha, C. S. de Heluanib, M. P. de Lampasonab, C. A. N. Catalanb, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 1026-1031.
- [26] G. S. Kumar, H. Nayaka, S. M. Dharmesh, P.V. Salimath, *J. Food Compos. Anal.* 19 (2006) 446-452.
- [27] S. M. Khopde, K. I. Priyadarsini, D. K. Palit, T. Mukherjee, *Photochem. Photobiol.* 72 (5) (2000) 625-631.
- [28] S. Dugasani, M. R. Pichika, V. D. Nadarajah, M. K. Balijepalli, S. Tandra, J. N. Korlakunta, *J. Ethnopharmacol.* 127 (2010) 515-520.
- [29] R. Aeschbach, J. Loliger, B. C. Scott, A. Murcia, J. Butler, B. Halliwell, O. I. Aruoma, *Food Chem. Toxic.* 32 (1994) 31-36.
- [30] H. Mc. Gee, *McGee on Food and Cooking. A survey of tropical spices.* Hodder and Stoughton. (2004) 426.
- [31] E. P. Lichtenstein, J. E. Casida, *J. Agric. Food Chem.* 11 (5) (1963) 410-415.
- [32] C. Pasay, K. Mounsey, G. Stevenson, R. Davis, L. Arlian, M. Morgan, D. Vyszenski-Moher, K. Andrews, J. McCarthy, *PLoS ONE* 5 (8) (2010) e12079.
- [33] James A. Bourgeois, Usha Parthasarathi, A. Hetegan, *Current Psychiatry* 13 (4) (2014) 21-32.
- [34] B. K. Lee, J. H. Kim, J. W. Jung, J. W. Choi, E. S. Han, S. H. Lee, K. H. Ko, J. H. Ryu, *Toxicology Letters* 157 (1) (2005) 49-56.
- [35] A. C. de Mello, E. A. Carlini, *Psychopharmacologia* 31 (4) (1973) 349-363.
- [36] D. J. Charles, *Sources of Natural Antioxidants and Their Activities*, Springer New York (2012) página 452.
- [37] D. J. Charles, *Sources of Natural Antioxidants and Their Activities*, Springer New York (2012) página 74.
- [38] D. J. Charles, *Sources of Natural Antioxidants and Their Activities*, Springer New York (2012) página 451.
- [39] Anna Podsedek, *LWT* 40 (2007) 1–11.
- [40] A. – M. Lampi, A. Kamal-Eldin, V. Piironen, *Functional Foods, Biochemical and Processing Aspects*, Vol. 2 CRC Press, Tocopherols and Tocotrienols from Oil and Cereal Grains, páginas 19-20.
- [41] L. Pérez-Fons, M. T. Garzon, V. Micol, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 161-171.

Capítulo 4

- [42] G. Zarrini, Z. Bahari-Delgosha, K. Mollazadeh-Moghaddam, A. R. Shahverdi
Pharmaceutical biology 48 (6) (2010) 633-636.
- [43] A. F. Traboulsi, K. Taoubi, S. El-Haj, J. M. Bessiere, S. Rammal, Pest. Manag. Sci. 58
(2002) 491-495.
- [44] Ácido Gálico: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.361.html>
- [45] J. González-Rodríguez, P. Pérez-Juan, M. D. Luque de Castro, Talanta 56 (2002) 53-59.
- [46] F. C. De Schryver, J. Put, L. Leenders, H. Loos, J. Am. Chem. Soc. 96 (22) (1974)
6994-7000.
- [47] Cinamaldehído: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.553117.html?rid=75f28a7d-d685-45d5-9d27-4dbaf1b83857>
- [48] H. Sakakibara, Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida, K. Kanazawa, J. Agric. Food Chem.
51 (2003) 571-581.
- [49] C. T. Ho, Q. Chen, H. Shi, K.-Q. Zhang, R. T. Rosen, Prev. Med. 21 (1992) 520-525.
- [50] Epicatequina: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.65230.html?rid=ad0b15da-d5ec-482d-b32c-d87e6c79762e>
- [51] Epicatequina: http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB0454852_EN.htm
- [52] Epicatequin-Galato: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.97034.html?rid=450311d4-1496-40dd-8324-74f107052bbb&page_num=0
- [53] Epigalocatequina: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.65231.html?rid=258f8742-2d89-447a-afec-af3b32fd4708&page_num=0
- [54] Epigalocatequin-Galato: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.58575.html?rid=50004df9-a281-4e3b-862d-f4062b24bb70&page_num=0
- [55] Epigalocatequin-Galato: <http://www.scbt.com/datasheet-200802.html>
- [56] Carnosol: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.390568.html>
- [57] A. Palma, Tesis Doctoral, Universidad de Huelva (2015).

Summary:

This chapter focuses on the determination of the composition of the aqueous and methanol extracts of different samples of tea, infusions and spices. The most common way for preparing tea and herbal infusions is by using hot water (approximately at its boiling point). In the case of spices, it is also interesting to study the aqueous fraction because it is usually the basis for many foods. Methanol was also used as extractant to compare the results, due to its polarity, slightly lower than that of the water, and for this reason, there are many organic compounds more soluble in methanol than in water. Furthermore, spices in foods are frequently used together alcoholic beverages as seasoning or as relevant ingredients, which influence the extraction of the nutrients. The solubility of the components of the samples in the solvent used as extractant determines the composition of the extract and, therefore, gives an idea about the compounds ingested. The difference in antioxidant activity of these extracts depends precisely of such compositions.

The analysed teas were: White Tea with a touch of vanilla and Black Tea, both from *Hornimans* brand, Red Tea, Green Tea and Teas Mix 3 from *Hacendado* brand. Infusions analyzed were: Camomile, Pennyroyal Mint, Rooibos with Plum taste, Sage and Lime Blossom Tea from *Hacendado* brand. Spices analyzed were: Basil, Cinnamon powder, Cinnamon sticks, Clove, Cumin, Turmeric, Ginger, Nutmeg, Oregano, Rosemary and Thyme, all from *Hacendado* brand. Two techniques were used for this investigation: Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

The GC-MS analyses were performed with a Gas Chromatograph-Mass Spectrometer “*Gas Chromatography-Mass Spectrum Perkin-Elmer Clarus 500*” equipped with an automatic injector for 100 samples. The method consisted of a temperature ramp from 100 °C to a 300 °C (in 4 minutes). This last temperature was constant during 5.95 minutes to ensure that all the components of the samples passed through both the column and the mass spectrometer, using helium as carrier. The sample preparation was done by weighing 0.4 g of each type of tea, infusion or spice, which were added to 10 mL of ultrapure water previously heated to 100°C in a Kettle type heater, or 10 mL of methanol at 60°C, depending on the type of extract. Samples were stirred during 3 minutes at 300 r.p.m. Then a drying step was performed by taking 4 mL of each extract, filtered and, finally, transferred to vials where the solvent was removed by passing a nitrogen stream while gently heating. Next, the solid residue obtained was dissolved in 100 µL of methanol with the aid of an ultrasonic bath.

GC-MS technique provides lots of information but it is limited by the thermal decomposition of the sample components. This happened with some of the antioxidants

Capítulo 4

most widespread in nature, and present in some of the samples, such as Gallic Acid and Vanillin in teas, Menthol in Pennyroyal Mint, Cinnamaldehyde in Cinnamon, Vitamin E in many samples (White Tea, Green Tea, Lime Blossom Tea, Cumin, Turmeric, Oregano and Rosemary) and other characteristic compounds such as Theobromine and Epigallocatechin Gallate in teas, or Camphor in Sage and Rosemary. In return, many others and really interesting antioxidant compounds were monitored.

The components found in the teas were the same (with the exception of the vanillin of White tea, which in reality was externally added) but the proportion of the different components was different. In addition, some of the most interesting compounds not only do not reach the boiling point in the temperature range allowed by the equipment, but many of them decomposed before reaching that point, causing errors by default. The compositions of the extract of the infusions are much more complex than those of the teas, and lower proportions of antioxidant compounds than in teas or spices were obtained. For spices, the compositions obtained depended strongly of the extractant, water or methanol. Just a few compounds are common in both extracts, appearing in very different quantities.

The thermal lability and/or the difficulty to reach the boiling point of some of the components of the sample led us use HPLC. This technique is much less aggressive and is independent of the boiling and flash points, being the determinant factors solubility and polarity of the compounds.

HPLC analyses were performed using a *High Performance Liquid Chromatography Perkin-Elmer Flexar*. The method used to improve the separation of the substances present in the samples, was based mainly on their polarity. A fast method avoiding expensive and not easily accessible solvents was used, consisting of a mobile phase in two-component gradient formed by aqueous and methanolic parts. The stationary apolar phase was a C-18 column. The aqueous portion of the mobile phase, Acid Mobile Phase (AMP), was optimized according to pH, peak resolution and simplicity in composition, and consisted of a hydrochloric acid aqueous solution of $44 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and glycine $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, being the final pH=2.01. Four methods were designed, depending on whether the samples were tea (measuring time, t_m , 45 min), infusions or spices ($t_m = 60$ min), standards that showed a signal in less than 12 min (Gallic Acid, Caffeine, Theobromine and Vanillin), or standards that showed a signal before 42 min (Cinnamaldehyde). All methods needed a 5 min equilibration step previous to the run, with a composition of the mobile phase of a 60% AMP and 40% methanol. After this step the instrument automatically injected 10 μl of sample and the run steps began, the mobile phase gradually changing from a majority percentage in AMP to a majority percentage in methanol.

The sample preparation for HPLC, was performed by weighing 1.0 g of each tea, infusion and spice, passing each aliquot to a beaker containing 10 mL of ultrapure water at 100°C, preheated with the help of a Kettle type water heater, or 10 mL of methanol at 60°C, depending on the type of extract, and stirring at 300 r.p.m. for 3 minutes. Then, a part of each of the extract was filtered to remove the sludge, leaf debris and suspended particles. The resulting liquid was transferred to sample vials.

Using this technique, the contents of Gallic Acid, Vanillin, and Cinnamaldehyde were determined by the external standard method. Total polyphenols were determined with a modification of the method described by J. Gonzalez-Rodriguez et al. (see bibliography). HPLC permitted the quantification of compounds with antioxidant character. Furthermore, more accurate values of theobromine were obtained because this compound is not thermally altered as in GC-MS. On the other hand, the results obtained for caffeine were very similar to those obtained in GC-MS. However, the lack of standards difficult the identification of some compounds.

The White tea contained the higher quantity of antioxidants due to the presence of Vanillin. In the second place in water is found the Black tea, due to its content in low-molecular weight polyphenols, soluble in water, whereas in methanol the second place is for the green tea, due to the epigallocatechin gallate and similar polyphenols, soluble in methanol but not in water (or slightly soluble). It must be noted the low content in antioxidants of the alcoholic extract of the red tea in contrast with the aqueous extract. The sequence obtained from the total amount of antioxidant does not match the antioxidant capacity obtained either with DPPH or VPD-H₂O₂ assays. This is due to the influence of the type of antioxidants, not just quantity.

The compositions of the infusions are much more complex than those of the teas. There are many compounds related to herbs and aromatic plants, as well as some present in wood. There are significant differences between the aqueous and methanolic extracts, both in the compositions and in the total antioxidant contents. The more characteristic compounds present in the essential oils of the plants are extracted almost exclusively in methanol and, therefore, in very low quantities in water. In all cases, the polyphenol content was null or very low. Antioxidants extracted from infusions vary depending on the infusion analysed.

The aqueous extract of Sage presented the higher antioxidant content, followed by Pennyroyal-Mint and Linden. The methanolic extract of Pennyroyal-Mint presented the higher antioxidant content due to the presence of Menthol in significant quantities, much more soluble in the alcoholic medium than in water. Finally, the Rooibos extracts were

Capítulo 4

poor in antioxidants, in comparison with the rest on infusions, due to the woody character of the samples, which prevents in part the extraction.

For infusions, as for teas, the sequence based on the total antioxidant content, does not match with those obtained for the antioxidant capacity by DPPH and VPD-H₂O₂ methods, this confirming again that the antioxidant capacity depends on the type of antioxidants rather than on its quantity.

Gallic Acid or polyphenols were not found in the samples of spices, as occurred for the infusions. The total antioxidant contents are very different depending on the type of spice, ranging from very high values for Cinnamon, Clove, Turmeric and Ginger, to lower values for Cumin and Nutmeg.

In some cases, the total antioxidant content is much higher in the methanol extract, simply because the antioxidant compounds of these samples are either poorly soluble or insoluble in water: Clove (the most extreme), which main antioxidant is Eugenol, Turmeric, with Tumerone, Ar-tumerone and Curcumin, and Ginger with Gingerol and Gingerone. It is also the case of Cinnamon, both powder and sticks, because the Cinnamaldehyde is more soluble in methanol than in water. The amount of Cinnamaldehyde taken into account was obtained from the HPLC measurements, because this compound decomposes at the working GC-MS temperature. Cinnamic Acid, another characteristic antioxidant, found in Cinnamon, is more soluble in water than in methanol, but is less abundant than Cinnamaldehyde. When the sample is powdered, the extraction of components is greatly facilitated. The methanol extract of Rosemary is also rich in antioxidants, but the major antioxidants (Carnosol, Carnosic Acid, Rosmarinol and Rosmarinic Acid) could not be determined because their boiling points, much greater than the working temperature, or their flash points, below the boiling points.

For Basil, Oregano and Thyme, green leafy spices, the total antioxidant content is much higher in the water extracts due to the solubility of the more polar antioxidants that they contain. The compositions of these spices present a large amount of water soluble hydroxy-substituted aromatic compounds. Basil is the most extreme case, being the antioxidant content of the aqueous extract nearly seven times that of the methanol extract. The aqueous extract of Oregano presents the highest antioxidant content of the spices, being c.a. 2.5 times greater than that of the methanol extract. For Thyme difference between the amounts of antioxidants obtained in both extracts is low, differing only around a 20%.

Finally, Cumin and Nutmeg are spices whose total antioxidant contents are low both in water and in methanol; so they are useful to flavour food and meals, giving a sensory

odour notes and taste characteristics, but without acting especially as sources of antioxidants. For Cumin predominates the fraction extracted with methanol, whereas for Nutmeg is that aqueous. But a small amount of antioxidants does not necessarily imply a low antioxidant capacity.

For spices like Clove, Turmeric, Ginger, Cinnamon, Rosemary and Cumin it is recommended the use of lipid (such as oils) and/or alcoholic (wine, whisky, etc.) fractions for the food preparation, if one want to take advantage of their antioxidant contents. For spices such as Basil, Oregano, Thyme and Nutmeg, only water must be added in the food cooking to extract most of their antioxidant content.

The total amount of antioxidants, does not necessarily imply that the extract has a higher antioxidant capacity, because the nature of the antioxidants must be also considered.

CAPÍTULO IV



CONCLUSIONS

CONCLUSIONS:

1- The electrochemical immobilization of purines on carbon electrodes, specifically the adenosine and guanosine nucleosides, allows the development of a bio-recognition sensor, based on the formation of stable layers, for the voltammetric detection of antioxidant capacity of different compounds.

2- The optimal variables for the immobilization of adenosine and guanosine on GCE and CPE were:

- adenosine on GCE: $E_{\text{optimal}} = 1.2 \text{ V}$; $\text{pH}_{\text{optimal}} = 5.0$; $t_{\text{optimal}} = 180 \text{ seconds}$; $[\text{Adenosine}] = 0.056 \text{ mM}$

- guanosine on GCE: $E_{\text{optimal}} = 0.4 \text{ V}$; $\text{pH}_{\text{optimal}} = 5.0$; $t_{\text{optimal}} = 180 \text{ seconds}$; $[\text{Adenosine}] = 0.035 \text{ mM}$

- guanosine FPC: $E_{\text{optimal}} = 0.4 \text{ V}$; $\text{pH}_{\text{optimal}} = 5.0$; $t_{\text{optimal}} = 150 \text{ seconds}$; $[\text{Adenosine}] = 1.0 \text{ mM}$

- adenosine on the CPE: $E_{\text{optimal}} = 1.2 \text{ V}$; $\text{pH}_{\text{optimal}} = 5.0$; $t_{\text{optimal}} = 180 \text{ seconds}$; $[\text{Adenosine}] = 0.8 \text{ mM}$

3- Fenton's reagent (oxidant) acts on the immobilized nucleosides on the surface of carbon electrodes. When the concentration of added Fe^{2+} increases (keeping the concentration of H_2O_2 constant and in large excess) the reduction signal of the nucleoside decreases, because more OH^\cdot radicals are generated, which attack the nucleoside immobilized on the electrode surface. The addition of an antioxidant as ascorbic or gallic acids causes an increase in the signal because the OH^\cdot reacts faster with the antioxidant than with the nucleoside. The signal recovery is related to the protective effect of the antioxidant.

4- CPE sensitivity to the presence of antioxidant is much less than the sensitivity of the GCE.

5- Oxidation of cumene hydroperoxide on GCE involves an irreversible one-electron transfer originating peroxy and/or phenoxy radicals, being the main final products hydroquinone and acetone. The general mechanism of the oxidation occurs in two steps: the formation of acetone and a phenoxy radical, and reaction of the phenoxy radical with water, to originate hydroquinone, which is finally oxidized to ortho- and para-benzoquinone.

6- The interaction of the radicals with antioxidants such as ascorbic and gallic acids, causes a decrease in the oxidation signal of cumene hydroperoxide in differential pulse voltammetry. This decrease is due to the scavenging of radicals formed after the electron transfer, which is related to the antioxidant activity of these compounds. In the case of ascorbic acid, the peak intensity in differential pulse voltammogram decreases in a 10% for a concentration around $7.9 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. For gallic acid, the decrease in a 10% is

Capítulo 5

achieved at a concentration of about $10.5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, indicating that the antioxidant activity of gallic acid is less than that of ascorbic acid.

7- It can be used the oxidation of cumene hydroperoxide in GCE to determine the antioxidant capacity related to the radical scavenging capacity of different compounds and mixtures. This is an alternative to the hydrogen peroxide oxidation, which requires the use of mercury electrodes.

8- The pK_a value of sesamol, corresponding to the dissociation of the hydroxyl group in position 5, was 10.1 ± 0.1 , obtained from the dependence of the UV-visible spectra with the acidity of the medium.

9- Sesamol oxidation on glassy carbon electrodes at potential corresponding to the peak 1 implies the transfer of two electrons per molecule though a very similar mechanism to the oxidation of 1,4-dihydroquinone. At pH values lower than this pK_a the first step corresponds to the dissociation of sesamol to give an anion which undergoes a first electron transfer, with the ring opening, followed by a second electron transfer, this being the rate-determining step, r.d.s. The fourth step is the addition of the radical cation obtained after the r.d.s. and contemplates the possibility of reaction with other hydroxyl ions or water, depending on whether the pH is basic or acidic, respectively. The oxidation product is 1,4-benzoquinone substituted at the position 3. At pH values higher than pK_a the first dissociation step does not occur.

10- At potentials corresponding to the peak 2 the reagent for the oxidation process must be the substituted 1,4-benzoquinone. The H^+ or OH^- ions do not take part in the process, at least before the r.d.s. It can be postulated that the substituted 1,4-benzoquinone is hydrolyzed by one molecule of water to give formaldehyde and 3-hydroxy-1,4-benzoquinone, which is then oxidized to the corresponding peroxide involving another water molecule.

11- For sesamol, the radical scavenging capacity against ROS measured by differential pulse voltammetry using hydrogen peroxide oxidation is medium-low. The radical formation occurring in the break of the ring may partially explain the ability of ROS to interact with sesamol.

12- The pK_a obtained for 2,4-DHB by UV-visible spectroscopy were 6.94 ± 0.03 and 9.28 ± 0.03 , corresponding to the loss of H^+ ions of the hydroxyl groups in positions 4 and 2, respectively. The 2,5-DHB pK_a values were 8.42 ± 0.03 and 10.93 ± 0.03 for the dissociation of H^+ ions of the hydroxyl groups in positions 5 and 2, respectively.

13- The analysis of the antioxidant activity obtained by the measurement of the radical scavenging capacity against ROS, indicates that at pH 10.5 the antioxidant capacity of the 2,4- isomer is approximately twice of that obtained for the 2,5- isomer. However, at pH 12.5 the antioxidant activities of both compounds are similar, although slightly

lower in the case of 2,5DHB. The pH at which the assays of antioxidant capacity are performed is therefore very important from the perspective of the dissociation of hydroxyl groups, due to the differences in the values of the dissociation constants of the different isomers.

14- Oxidation of 2,5-DHB on glassy carbon electrodes corresponds to the transfer two electrons per molecule, being the final oxidation product 1,4-benzoquinone substituted in position 1.

15- At potentials corresponding to peak 1 and at pH values below the first pKa, the mechanism involves a first step corresponding to the output of an H⁺ ion from the -OH group in position 5, followed by a first electron transfer, which is quasi-reversible, to give a radical who losses an H⁺ ion in a third step, corresponding to the r.d.s. Then, it takes place the second electron transfer resulting the substituted 1,4-benzoquinone.

16- At pH values higher than pK₁ but lower than pK₂, the electroactive species changes to the anion, which loses an H⁺ ion to give the dianion. The process is now of CEE type, that is, two electron transfers occur at different potentials, preceded by a fast chemical step. A pH > pK₂ the process becomes of EE type, and no H⁺ ions are involved in the process.

17- The main antioxidants obtained for the aqueous extracts of tea analysed by GC-MS, are Resorcinol, 2-methyl and 4-methyl-Benzaldehyde, 3-methoxy-1,2-Benzenediol and 1,2,3-Benzenetriol (more abundant than the rest), in varying amounts depending on the type of tea. In the extracts in methanol the 1,2,3-Benzenetriol was the only antioxidant obtained. The water extracts were much richer in quantity and types of compounds than those obtained in methanol. The most significant peak in GC-MS corresponds to Caffeine. The White Tea presents the highest antioxidant content by the Vanillin artificially added.

18- The compounds with low flash points, lower than both the boiling point and the working temperature in GC-MS analysis, are deteriorated before evaporating, and are not detected (or only a fraction of them is detected). Theobromine, and antioxidants such as Gallic Acid and Vanillin are some examples.

19- The compounds with high boiling points, as the most characteristic tea polyphenols, Epicatechin, Epicatechin-Gallate, Epigallocatechin and Epigallocatechin-Gallate, are not detected in the GC-MS analysis.

20- In HPLC, for tea samples were determined and quantified Gallic Acid, Theobromine, Caffeine and Vanillin. The water extracts are much richer in antioxidants, and compounds in general, than those obtained in methanol. It was quantified the polyphenol fraction of the samples, which contributes significantly to the antioxidant capacity. In this case, the White Tea also had the higher total antioxidant content due to

Capítulo 5

the added Vanillin. Water extract of Black Tea presented the highest total polyphenols value. This is the case of the methanol extracts of Green Tea, probably due to the presence of high amounts of Epigallocatechin-Gallate, much more soluble in methanol than in water.

21- From the combining data from HPLC with GC-MS, it was obtained the total antioxidant content for each tea, so that the sequence was: White Tea > Black Tea > Red Tea > Mix 3 Teas > Green Tea. This sequence does not match with the reported of antioxidant capacity, determined with DPPH or VPD with H₂O₂ assays. This is due to the influence of the type of antioxidant, not just quantity.

22- The composition of the infusions (obtained by GC-MS) was more varied than in the case of teas, although the proportion of antioxidant compounds was lower. Also for these samples were problems with flashpoints, as with Menthol for Pennyroyal-Mint and Camphor for Sage. There are great differences between the extracts obtained in water and in methanol, because there are few common compounds or their proportions are very different. There are many compounds related to herbs and aromatic plants, as well as some on the wood.

23- In HPLC, for infusions, very different chromatograms were again obtained for extracts in water and methanol, presenting many peaks. Some of them, together with the results of GC-MS, have led to the identification and quantification of some compounds, as for example 7-methoxy-1-benzopyran-2-one for the Camomile water extract, Menthol in the methanol extract of Pennyroyal-Mint, Camphor for water extract and Camphor and Eucalyptol for methanol extract in the case of Sage, and 1,2-Benzenediol for Lime Blossoms extracts.

24- The total polyphenols in infusions is very low or zero. The extracted antioxidants greatly vary on the infusion. The Sage extract in water has a higher antioxidant content, while for the extracts in methanol, the Pennyroyal-Mint is that contains a greater amount of these compounds because Menthol (its major antioxidant) is much more soluble in alcoholic media than in aqueous media. Rooibos extracts were less rich in compounds extracted in general, and in particular in antioxidants, because the woody character of the sample complicates the extraction.

25- For infusions, like with the teas, the sequence of the total antioxidant content, does not match that obtained to determine the antioxidant capacity by methods as DPPH and VPD-H₂O₂, this confirming again that the antioxidant capacity depends on the type of antioxidants rather than quantity.

26- The total antioxidant content of spices is very different depending on the sample, ranging from very high values (Cinnamon, Clove, Turmeric and Ginger) to very low (Cumin and Nutmeg). We distinguish three groups: one group (1) where the methanol

extract is rich in antioxidants; another group (2) where the extract rich in antioxidants is aqueous and, finally, a group (3) where the antioxidant content is very low.

In the group (1) compounds with antioxidant activity are poorly soluble or insoluble in water. This is the case of the Clove (the most extreme), where the main antioxidant is Eugenol; Turmeric, with Tumerona, the Ar-tumerona and Curcumin; Ginger with Gingerol and Gingerone; Cinnamon with Cinnamaldehyde; Rosemary, where some of the main antioxidants which can be obtained in the methanol extract (Carnosol, carnosic acid, Rosmarinol and Rosmarinic Acid) have not been determined due to their high boiling points or low flash point.

In group (2), the antioxidants are more polar and therefore more soluble in water: Basil, Oregano and Thyme, all green leafy spices. It was obtained many hydroxy-substituted aromatic compounds soluble in water. For Basil the antioxidant content of the aqueous extract is almost seven times greater than the methanol extract. The higher content of antioxidants is the Oregano aqueous extract, which is about 2.5 times the methanol extract, this presents Carvacrol, one of the most characteristic antioxidants of this sample, insoluble in water. For the extracts of Thyme, the difference obtained is only around a 20%, and one of the most important antioxidants of these sample is the Thymol, soluble in methanol.

Spices of group (3) are used to flavor stews and meals, giving odor and flavor, but without acting especially as a source of antioxidants: Cumin and Nutmeg. Cumin is predominantly methanol extracted fraction due to the antioxidant cuminaldehyde. While the Nutmeg presents a higher amount of antioxidant in its aqueous extract, due to the main component of this extract, 2,6-dimethoxy-4- (2-propenyl) -phenol, which is the reduced myristicin form. The Myristicin is the major component in the methanol extract, where it can be found Elemicine too, another of its characteristic constituents.

27- In HPLC, using GC-MS, we have identified some of the most characteristic peaks of spices like Eugenol in the methanol extract of Clove, Cuminaldehyde in the aqueous extract of Cumin, Curcumin in the methanolic extract of Turmeric (reverse peak due to the fluorescence of this compound), Gingerol and Gingerone for Ginger, Eugenol in the Nutmeg (from the data obtained for the Clove), Eucalyptol for Rosemary and the comparison with Sage, and Thymol-Carvacrol system for Thyme. This technique has been used to quantify the Cinnamaldehyde present in the two samples of Cinnamon, which has a low flash point, and therefore the amount obtained by GC-MS does not correspond to its real value.

28- For spices of group (1) and Cumin, we recommend to use lipid fractions (such as oils or butter) and/or alcohol (wine, whiskey, etc.) for the food preparation where one wants to take advantage of the most of their antioxidant content. Spices of group (2) and

Capítulo 5

Nutmeg, need only the addition of water during cooking to extract the major part of their antioxidant content.

ANEXO

ARTÍCULOS Y
COMUNICACIONES A
CONGRESOS



Elucidation of the Electrochemical Oxidation Mechanism of the Antioxidant Sesamol on a Glassy Carbon Electrode

R. Estévez Brito,^a J. M. Rodríguez Mellado,^{a,*} P. Maldonado,^b M. Ruiz Montoya,^c A. Palma,^c and E. Morales^d

^aDepartamento de Química Física y Termodinámica Aplicada CeIA3, Campus Universitario Rabanales, IUIQFN, Universidad de Córdoba, E-14014 - Córdoba, Spain

^bInstitute of Chemical Research of Catalonia (ICIQ), E-43007 Tarragona, Spain

^cDepartamento de Ingeniería Química, Química Física y Química Orgánica, Facultad de Ciencias Experimentales CeIA3, Campus de "El Carmen", Universidad de Huelva, E-21071- Huelva, Spain

^dDepartamento de Química y Ciencia de los Materiales, Facultad de Ciencias Experimentales CeIA3, Campus de "El Carmen", Universidad de Huelva, E-21071- Huelva, Spain

The dissociation constant of Sesamol (5-hydroxy-1,3-benzodioxol) was determined from the dependence of the UV-visible spectra with the medium acidity. A pK value of 10.1 ± 0.1 , corresponding to the hydroxyl group, was obtained. The oxidation of sesamol was investigated on carbon electrodes using controlled-potential electrolysis, linear-sweep cyclic voltammetry and measurements at the foot of the first oxidation peak. Up to three oxidation peaks and one reduction peak were found. The dioxol ring of the dissociated sesamol undergoes a cleavage to give 3-substituted 1,4-benzoquinone, being the rate-determining step the second electron transfer. The formation of radicals in the ring cleavage explains in part the ability of sesamol to interact with reactive oxygen species (ROS). © 2014 The Electrochemical Society. [DOI: 10.1149/2.028405jes] All rights reserved.

Manuscript submitted November 22, 2013; revised manuscript received February 20, 2014. Published March 13, 2014.

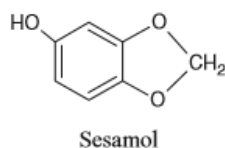
Seeking natural antioxidants is of increasing interest compared to "artificial" (synthetic) antioxidants used as food additives.¹⁻³ An antioxidant is a substance that may delay or prevent oxidation of an oxidizable substrate at low concentrations.⁴ Primary and secondary antioxidants interact with radicals such as reactive oxygen species (ROS).

Direct electrochemical measurements are a rapid proof of the antioxidant capacity and, in consequence, they have been used for the determination of antioxidant activity.^{5,6} To compare the antioxidant strength of phenolic acids, flavonoids, cinnamic acids etc, the oxidation potentials of cyclic voltammetric peaks have been used.⁷⁻¹⁰ Low oxidation potentials are characteristic of high antioxidant activity, with good correlation with the technique of DPPH[•] scavenging.¹¹ The substances showing activity in this assay are thermodynamically capable to react with agents that can reduce the DPPH[•] radical.

Anodic oxidation of hydrogen peroxide on mercury electrodes has been used to determine the antioxidant character of phenolic compounds such as wines, strong alcohol beverages or beer.¹²⁻¹⁶ The decrease in the oxidation current of hydrogen peroxide by adding the antioxidant is used to determine the antioxidant capacity. Suznkievic and coworkers¹² assessed that the anodic wave of H₂O₂ observed on mercury electrodes is due to the oxidation of Hg to Hg⁺⁺ and the subsequent formation of a mixed complex with HO₂⁻ and OH⁻ ions, as previously reported by Kikuchi and Murayama.¹⁷ A mechanism involving ROS generation was proposed,¹⁸ able to explain the decrease in the oxidation signal and assessing the scavenging character of the antioxidants.

The scavenging capacity of an antioxidant is related to its oxidation mechanism. Moreover, the prooxidant capacity is linked to the oxidation potential. Thus, the aim of this work is to establish the electrochemical oxidation mechanism of sesamol to help in the understanding of its antioxidant activity.

Sesamol, 5-hydroxy-1,3-benzodioxol is a constituent of sesame oil with the structure shown below.



*Electrochemical Society Active Member.
*E-mail: jmrodriguez@uco.es

The antiphotooxidative activity of sesamol was attributed to the capture of singlet oxygen.¹⁹ The antioxidant activity of sesamol,^{20,22} and for other natural products, was attributed to the phenolic group.²⁰

Experimental

All chemicals used in this work were Merck analytical grade reagents, with the exception of sesamol that was from Sigma-Aldrich, and were used without further purification.

Solutions containing 0.1 M in both acetic and phosphoric acids, for $pH < 8$ and 0.05 M in both sodium carbonate and phosphoric acid at $pH > 8$ were used as supporting electrolytes. The aqueous solutions were prepared using ultrapure water type I (resistivity 18.2 M Ω ·cm at 298 K) obtained from an ultrapure water system Millipore. Ionic strength was adjusted to 0.3 M with solid KNO₃ and the pH was adjusted with solid NaOH. Stock solutions of sesamol were stored in the dark at 277 K to avoid decomposition.

UV measurements were made on a Perkin-Elmer Lambda 750S spectrophotometer with quartz cuvettes Hellma of path-length 1.0 cm. For the determination of the dissociation constant, the sesamol concentration was 0.1 mM, whereas the typical concentration for the electrochemical measurements was 1 mM.

All electrochemical measurements were made with an Autolab PGSTAT302 potentiostat using the software package GPES 4.9. A three-electrode cell (25 mL glass electrochemical cell) equipped with a Pt wire counter electrode, a BAS MF-2079 Ag/AgCl 3 M KCl reference electrode was employed. All tests were performed at 298 K.

For most electrochemical measurements, a glassy carbon electrode (JCambria) with 7.5 mm² area was used as working electrode. The electrode was polished with a silicon carbide paper, followed by diamond (0.25 μ m) slurry and alumina (0.3 and 0.05 μ m) slurries. Residual polishing material was removed from the surface by sonication of the electrode in a water bath for 30 minutes after each polishing. The electrochemical pretreatment involved five cyclic voltammetry between +2 and -2 V on the untreated electrode in a saturated sodium chloride solution.

For the controlled-potential electrolysis, the working electrode was a high density graphite rod of 99.995% purity from Aldrich (CAS number 7782-42-5 C) protected with a silicone tube, which allow to use a cylinder with an area of 75.4 mm². The electrode was polished with a silicon carbide paper, followed by alumina (0.3 μ m) slurry. Residual polishing material was removed from the surface by sonication of the electrode in a water bath for 20 minutes after each polishing. The counter electrode was a stainless steel rod. The electrolyses were made with samples of 5 mL of 1.2 mM sesamol and recording the

charge along the experiment. To follow the course of the electrolysis, samples of 200 μL were taken after different amounts of charge were passed, added to 1.5 mL of purified water, and the corresponding UV-visible spectrum was recorded.

The compounds were analyzed using the solid phase microextraction (SPME) method. A SPME fiber, coated with 65 μm Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVD) (Supelco, Bellefonte, PA) was inserted into a vial containing 3 mL to electrolysis product solution for 30 min. The SPME fibers coating containing the products adsorbed was inserted into the GC injection port at 230°C and remained for 3 min for desorption. After each sample injection, fibers were kept inside the SPME needle to prevent possible contamination and were conditioned with helium at 250°C for 10 min before reuse. The desorption of compounds was performed using a Shimadzu GC-2010 gas chromatography with a 30 m length and 0.25 mm diameter HP-5MS capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) coupled with a Shimadzu mass spectrometer (Shimadzu corporation, Tokio, Japon) operating in EI mode at 70 eV. The transfer line between the GC and MS instruments was kept at 280°C. The gas chromatograph system was equipped with a split/splitless injection port operating in Splitless mode. The oven temperature program was: initial temperature 35°C (5 min), increased to 220°C at 15°C/min, then increased to 270°C at 50°C/min, and held for 2 min. Helium (99.999%) was used as the carrier gas, at a flow rate of 1 mL/min. The mass spectrometer was operated in the full scan (scan) in the mass range $m/z = 33\text{--}350$. Identification of compounds was achieved comparing the mass spectra with the data system library (NIST 08). When necessary, derivatization was made using trifluoroacetic anhydride.²³

Results and Discussion

In order to obtain the dissociation constant of sesamol, UV-visible absorption spectra were recorded as a function of *pH*. The curves presented three main bands in the entire *pH* interval, with maxima at 230–240, 292 and 311 nm, having two isosbestic points at 269.5 and 301 nm, as can be seen in Figure 1. Below *pH* 7 and above *pH* 11, the spectra were unchanged. The dependence of the spectra with the medium acidity shown in Figure 1 indicates that sesamol is involved in an acid-base equilibrium. The corresponding *pK* was obtained from the absorbance measured at constant wavelength by plotting $\log[(A - A_1)/(A_2 - A)]$ vs. *pH*, where A_1 and A_2 are the constant absorbance values found at *pH* below and above the variation of absorbance, respectively. The *pK* value so obtained was 10.1 ± 0.1 , corresponding to the hydroxyl group and in agreement with that calculated using ACD/Labs software, and also agrees with that obtained from the plot of the oxidation peak potential of the main peak vs. *pH*, as will be shown below.

In linear-sweep cyclic voltammetry (LSCV) on a glassy carbon, sesamol exhibits up to three oxidation peaks and one reduction peak depending on whether one or two successive cycles are recorded. As it is shown in Figure 2, the first cycle of the voltammogram shows two oxidation peaks, named *Peak 1* and *Peak 2* attending the higher oxidation potential at which they appear, and one reduction peak I, named *Peak 3'*, appearing at less positive potentials. In the second cycle, in addition to peaks 1 and 2, a new oxidation peak, named *Peak 3*, appears at potentials slightly more positive than peak 3'. Peaks 1 and 2 appeared in the entire *pH* range studied (1–12.5) whereas peaks 3 and 3' were not observed above *pH* 10.

Two scans of cyclic voltammograms were recorded in the sequence oxidation-reduction, switching the scans at a potential localized after peak 1 and before the starting of peak 2. Under such conditions, the voltammogram corresponding to the 3–3' system in the second scan was identical to that obtained when the scan was switched after peak 2, as in Figure 2. Therefore, it can be concluded that the redox system formed by peaks 3 and 3' is related to the process occurring at the potentials of peak 1 and not to those taking place at the potentials of peak 2.

The species that is oxidized at the potentials of peak 3 must be different from sesamol and must be related with the oxidation product

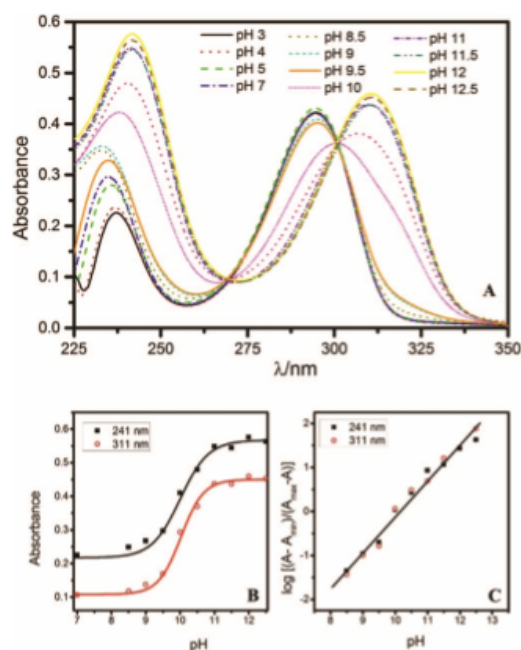


Figure 1. A) UV-visible spectra of $1 \cdot 10^{-4}$ M sesamol solutions at different *pH* values. B) Plot of the absorbance measured at two wavelengths vs. *pH*. C) Plot of $\log[(A - A_{\text{min}})/(A_{\text{max}} - A)]$ vs *pH*.

obtained at the potentials of peak 1. To check this assumption, a constant potential above peak 1 during a given time, t_d was applied. After this deposition time, a voltammogram was recorded in the potential window corresponding to the 3–3' system, starting with the reduction scan followed by the oxidation scan. In another set of experiments, the same voltammogram was obtained but in the oxidation-reduction sequence. This was made by varying t_d as shown in Figure 3. The two sets of experiments show similar results: the intensities of the peaks remain constant at $t_d \geq 20$ s, though the ratio between the intensities of 3' and 3 peaks is close to unity in the reduction-oxidation scan sequence, and slightly lower in the reverse scan sequence.

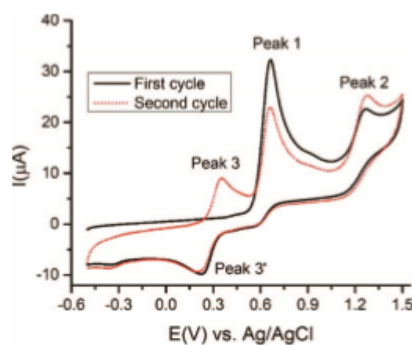


Figure 2. Linear-sweep cyclic voltammograms of $1 \cdot 10^{-5}$ M sesamol at a scan rate of $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ and *pH* = 1.74.

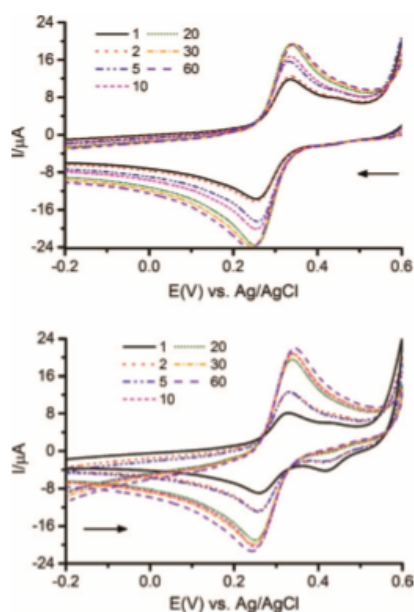
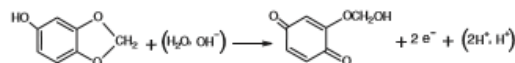


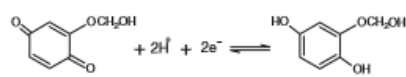
Figure 3. Linear-sweep cyclic voltammograms of the 3–3' system of $1 \cdot 10^{-5}$ M sesamol after deposition at 0.900 V and deposition times (in seconds) given in the figure. $\text{pH} = 1.80$. $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. Up: starting potential 0.600 V. Down: starting potential -0.200 V . Arrows indicate the initial direction of the scan.

Let one consider the structure of sesamol. The more plausible oxidation reaction occurring at the potentials of peak 1 must involve cleavage of the five-membered ring to give either a 1,3-benzoquinone or a 1,4-benzoquinone. But 1,3-benzoquinone does not exist, because the structure would be nonplanar and highly strained, and the proposed overall reaction for peak 1 is:



Scheme 1. Overall reaction for peak 1.

The substituted 1,4-benzoquinone formed remains in the proximity of the electrode and can be reduced in the reverse scan at the potentials corresponding to the 3' peak and the resulting 1,4-dihydrobenzoquinone is oxidized in the next cycle corresponding to the 3 peak, less negative than the sesamol oxidation potential:



Scheme 2. Overall reactions for peaks 3–3'

Evidences for the above scheme are inferred. First, the dependence of the peak potentials with the pH corresponding to the 3–3' system is compatible with the redox process corresponding to scheme 2. The 3–3' system was recorded at different pH values with $t_d = 20 \text{ s}$. As it can be seen in Figure 4, the peak potentials of both the oxidation and reduction peak shift around -0.059 V per pH unit, this corresponds to the intervention of two H^+ ions for a two-electron process, as in the case of 1,4-benzoquinone.²⁴

The number of electrons taking part in the process occurring at the potentials of peak 1 can be obtained by comparison of the voltam-

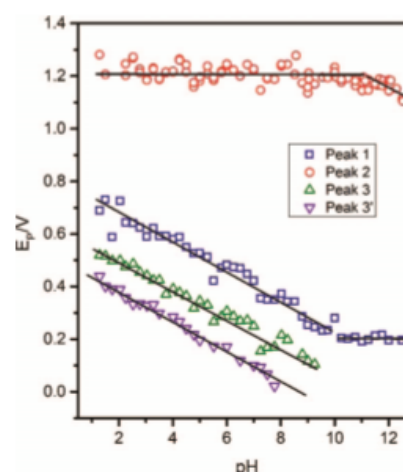


Figure 4. Dependencies of the peak potentials of the voltammetric peaks on the solution pH for $1 \cdot 10^{-5}$ M sesamol. $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

gram with the signal obtained for 1,4-dihydrobenzoquinone. This is shown in Figures 5A and 5B. As it can be seen, the oxidation peaks of sesamol and 1,4-dihydrobenzoquinone are very similar.

Nevertheless, the peak intensity in voltammetry depends on the mechanism of the redox process and cannot be used for comparison unless the mechanisms of the compared processes were the same.

Convolution voltammetry^{25–30} was used to analyze the oxidation scans of the voltammograms by computing the integral

$$J = \pi^{-1/2} \int_0^t \frac{I(v)}{(t-v)^{1/2}} dv \quad [1]$$

where I is the actual current, J is the convoluted current, v is an integration variable, and t is related to the potential through the scan rate. S-shaped curves are obtained with limiting values, J_L , independent of the mechanism of the electrochemical reaction:

$$J_L = nFAD^{1/2}c_0 \quad [2]$$

where n is the number of electrons involved in the process, A is the electrode area, and D and c_0 are the diffusion coefficient and the bulk reactant concentration, respectively.

Figure 5B shows that the limiting currents of the convoluted voltammograms corresponding to sesamol and 1,4-dihydrobenzoquinone are very similar; the slight difference being due to the difference of diffusion coefficients. In conclusion, two-electrons are involved in the process occurring at the potentials of peak 1.

To strengthen the above conclusions, bulk electrolyses were made at a potential placed after peak 1 and before peak 2 and the color of the solution changed gradually from practically colorless to orange. Figure 6 shows the spectra obtained along the electrolysis. As can be seen, the UV-visible spectrum at the end of the electrolysis is very different of the spectrum of sesamol, showing the three bands characteristic of the p-benzoquinone ring,³¹ centered at 380 nm, 290 nm and 250 nm, in this case.

The number of electrons involved in the oxidation process was obtained from the slope of the plot of the charge vs. mol of oxidized sesamol. The plot shown in Figure 6 confirms the two-electron nature of the peak 1. Since two faradays per mol of sesamol are needed to obtain the product, an electrolysis was made passing the charge corresponding to the amount of sesamol in the cell. The solution containing the oxidation product was analyzed with solid-phase micro-extraction and GC-MS (see experimental) and after several attempts changing

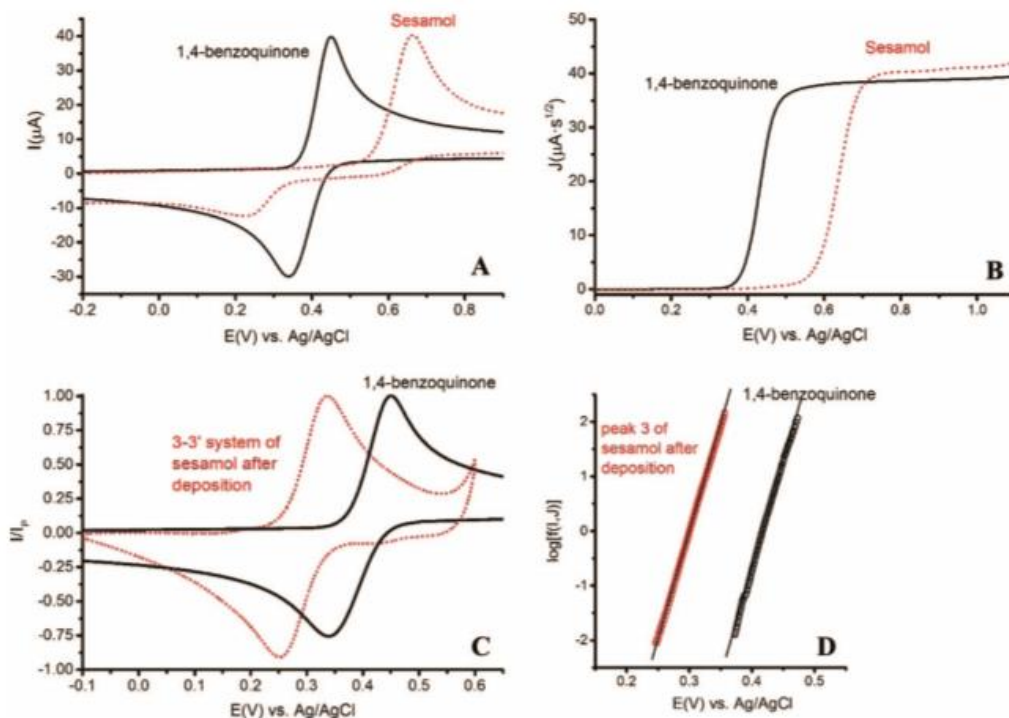


Figure 5. A) Linear-sweep cyclic voltammograms of $1 \cdot 10^{-5}$ M sesamol and $1 \cdot 10^{-5}$ M 1,4-dihydrobenzoquinone at pH 2.5 and $v = 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. B) Convoluted voltammograms of the oxidation peaks C) Linear-sweep cyclic voltammograms of the 3–3' system of $1 \cdot 10^{-5}$ M sesamol after 60 s deposition at 0.900 V and $1 \cdot 10^{-5}$ M 1,4-dihydrobenzoquinone. D) Logarithmic analyzes of the convoluted oxidation peaks of fig. D.

the experimental conditions it was concluded that the boiling point of the product is higher than the maximum operative temperature of the chromatograph. So, a derivatization was made using trifluoroacetic anhydride and a fluorinated derivative of (hydroxymethoxy)-1,4-benzoquinone was identified.

Figure 5A also reveals that the peak potential of the oxidation peak of 1,4-dihydrobenzoquinone is lower than the peak potential of peak 1,

that is, the 1,4-dihydrobenzoquinone is oxidized at lower potentials than sesamol. In addition, the redox process of the 3–3' system is very similar to that corresponding to 1,4-dihydrobenzoquinone. The lower oxidation peak potentials found for the 3–3' system can be attributed to the presence of the substituent at position 3. The hydroxymethoxy group is strongly activating due to the resonance effect of the oxygen atom bonded to the ring, and the negative charge originated on the ring facilitates the oxidation.

Diagnostic criteria for the electrochemical processes can be established using logarithmic analyzes based on the equation:²⁵⁻³⁰

$$E = E_{1/2} + b \ln[f(I, J)] \quad [3]$$

where $f(I, J)$, $E_{1/2}$ and b depend on the actual mechanism of the electrochemical reaction as is shown in Table I.

Table I. Values of m (antioxidant concentrations in $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$), ARP and oxidation potentials vs. Ag/AgCl/KCl (3M) electrode for the antioxidants studied.

Process	$f(I, J)$	$E_{1/2}$	b
Reversible (E_r)	$\frac{J}{J_L - J}$	E'_0	$\frac{RT}{nF}$
Irreversible (E_i)	$\frac{I}{J_L - J}$	$E'_0 + \frac{RT}{\alpha nF} \ln \frac{k_f^0}{D^{1/2}}$	$\frac{RT}{\alpha nF}$
Chemical reaction following an E_r process $E_r C_i$	$\frac{I}{J_L - J}$	$E'_0 + \frac{RT}{2nF} \ln k$	$\frac{RT}{nF}$

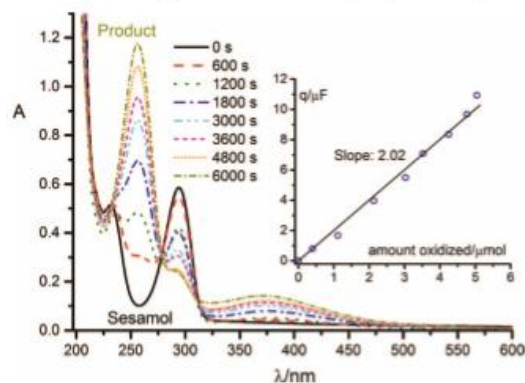


Figure 6. UV-visible spectra of the electrolyzed solution at different times (shown in the figure). Inset: plot of the charge in microfaradays versus the electrolyzed amount of sesamol.

The direct scans of the voltammograms were analyzed using the $f(I, J)$ corresponding to a reversible process and the result is given in Figure 5D. The logarithmic analyzes of peak 3 are very similar to those corresponding to the oxidation peak of 1,4-benzoquinone.

All these facts indicate that the mechanism of the process shown in scheme III must be very similar, if not the same, as the oxidation-reduction of 1,4-benzoquinone.

The process occurring at the potentials corresponding to peak 1 is, evidently, irreversible. Nevertheless, the electron transfers can be reversible, since the ring cleavage step can be placed after the electron transfers. The application of equation 3 to the convoluted voltammograms, using the $f(I, J)$ corresponding to an irreversible/EC process, gives b values of 0.045 V (at 298 K) at $pH < pK_a$; this indicates that the second electron transfer must be the rate-determining step, r.d.s., of the oxidation process.³²⁻³⁴ In addition, the $E_{1/2}$ values were independent of both the scan rate and the concentration of sesamol; the J_L values were independent of the scan rate and proportional to the sesamol concentration. These dependencies are required for the application of the diagnostic criteria.

The above conclusions were also confirmed using differential pulse voltammetry, DPV. The analysis of the DP voltammograms was performed by using the following equation corresponding to first-order processes:³⁵

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

where $L = \exp[-(E-E_p)/b]$, I_p and E_p being the peak intensity and peak potential, respectively, and b is a parameter which has the same value and meaning as the slope of the convolution logarithmic analysis.^{35,36}

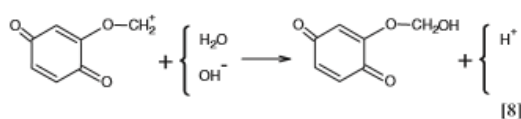
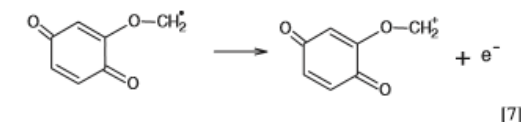
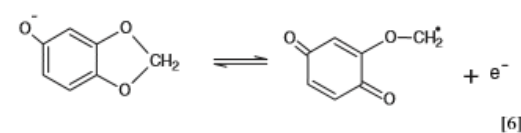
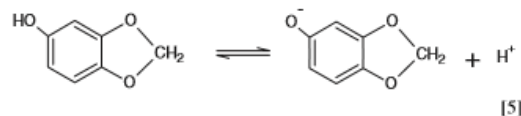
Equation 4 corresponds to a symmetrical peak where the area of the curve is proportional to the concentration of depolarizer (and also proportional to $b \cdot I_p$) and to the overall number of electrons involved in the electrochemical process. The DPV peaks of sesamol were well described by equation 4 until the peak potential and even to potentials above this value. Nevertheless, the proximity of the background discharge causes a distortion for potentials more positive than the peak potential and the curve is distorted. Thus, the b parameter was obtained from the fitting of the experimental results to equation 4 at potentials below E_p . At $pH < pK_a$ the b values so obtained were of 41–43 mV, corresponding to a two-electron process in which the rate-determining step, r.d.s., is the second electron transfer.^{35,36} At $pH > pK_a$ the b values were of 32–33 mV, corresponding to a process involving two reversible electron transfer.

The linearity of the convolution logarithmic analyzes is poor at high pH values (i.e. at $pH > pK_a$). For this reason, the i - E curves were analyzed at potentials corresponding to the foot of the voltammetric curves, where the contribution of the transport is minimal and it is possible to obtain the Tafel curves and the electrochemical reaction orders.

The E vs. $\log i$ plots were linear at such range of potentials, having slopes (at 298 K) of 43–45 mV, at pH values lower than the pK_a , and close to 32 mV at higher pH values. In the first case, the Tafel slopes agree with the convolution logarithmic analysis slopes, which confirms that the second electron transfer must be the rate-determining step, r.d.s., of the oxidation process at these pH values. At $pH > pK_a$ the Tafel slope is compatible with two reversible electron transfers. Since the overall process is irreversible, the mechanism occurring at these pH values must be of E_rE_rC type, i.e., the r.d.s. must be a chemical reaction placed after two reversible electron transfers. This reaction must be the ring cleavage.

The electrochemical reaction orders can be obtained from the dependence of the Tafel plots on the concentration of reactants, in this case on the concentration of sesamol and H^+ ion. These orders were unity for sesamol, irrespective of the pH , and -1.1 and 0 for pH values lower and higher of pK_a , respectively.

Based upon all the results and conclusions, the following reaction scheme is proposed for the potentials of peak 1:



In this scheme, reaction 5 occurs only at $pH < 10.1$ (the dissociation pK_a) and is absent above this pH value.

Below pH 10.1, reaction 7 is the r.d.s. whereas in very basic media the rate of the process is given by reaction 8. The i - E - t relationships for these processes can be obtained by using the convective diffusion approximation and the steady-state conditions. Moreover, the differential equations of the Nernst diffusion-layer approximation can be solved by the method of dimensionless variables applied as shown in the literature.³⁷⁻⁴² Using this approximation, the following equation can be obtained:

$$i = 2FK_5K_6k_7K'c_H^1c_S \exp \left[\frac{(1+\beta)FE}{RT} \right] \quad [9]$$

where K_5 and K_6 are the equilibrium constants of reactions 5 and 6, k_7 is the rate constant of reaction 7 at zero potential, c_H and c_S are the concentrations of H^+ ion and sesamol, respectively, and $K' = \exp[(1+\beta)F\Delta\phi_{ref}/RT]$, β the symmetry factor and $\Delta\phi_{ref}$ the potential of the reference electrode.

The electrochemical reaction orders derived from equation 9 are -1 and 1, for the H^+ ion and sesamol, respectively, and the Tafel slope is $2.303RT/(1+\beta)F$; that is, 0.039 mV at 298 K (assuming $\beta = 0.5$). All the experimental results agree with these predictions.

Above $pH = 10.1$, the equation to be fulfilled at the potentials of the foot of the peak is:

$$i = 2FK_6K_7k_8K'c_S \exp \left[\frac{2FE}{RT} \right] \quad [10]$$

where the symbols have the abovementioned meanings and $K' = \exp[(2F\Delta\phi_{ref}/RT)]$.

The electrochemical reaction orders derived from equation 10 are 0 and 1, for H^+ ion and sesamol, respectively, and the Tafel slope is $2.303RT/2F$; that is, 0.029 mV at 298 K. Again, all the experimental results agree with these predictions.

The analysis of peak 2 is difficult due to its proximity to the background discharge. As it can be seen in Figure 4, the peak potentials of this peak do not shift with the pH except at very high pH values. Moreover, below pH 9, the convoluted limiting current of peak 2 is the same as that corresponding to peak 1, but increases to the double at $pH > 10$. This implies that the process occurring in acidic and

neutral media is two-electron whereas it is a four-electron, in very basic solutions.

The reactant for the oxidation process occurring at these potentials must be the substituted 1,4-benzoquinone obtained in the preceding oxidation. Since the peak potential is not *pH*-dependent, the H^+ or OH^- ions do not take part in the process, at least prior or in the r.d.s. Thus, it could be postulated that the substituted 1,4-benzoquinone is hydrolyzed by a water molecule to yield hydrated formaldehyde and 3-hydroxy-1,4-benzoquinone, which is subsequently oxidized to the corresponding peroxide with the participation of another water molecule. In very basic solutions, the hydrolysis is made by the OH^- ions, this explaining the shifting of the peak potentials, and the oxidation progresses beyond the peroxide.

The antioxidant activity of sesamol measured by means of the DPPH• test and cyclic voltammetry is medium-high.¹¹ The radical scavenging versus ROS measured by differential pulse voltammetry using the H_2O_2 oxidation was medium-low.¹⁸ Such antioxidant character of sesamol can be attributed to the relative lability of the five-membered ring to give a quinone. The formation of this molecule is responsible for the antioxidant activity of sesamol, rather than the presence of the phenolic group in the molecule postulated in the literature.²⁰ In addition, the formation of radicals in the ring cleavage can explain in part the ability of sesamol to interact with ROS.

Acknowledgments

Financial support from Junta de Andalucía (Research Groups FQM-0198, RNM-371 and FQM-0348) is gratefully acknowledged.

References

1. K. Dastmalchi, H. J. Damien Dorman, M. Kosar, and R. Hiltunen, *LWT-Food Sci. Technol.*, **40**, 239 (2007).
2. M. Carochi and L. C. F. R. Ferreira, *Food Sci. Technol.*, **51**, 15 (2013).
3. S. Maqsood, S. Benjakul, and F. Shahidi, *Crit. Rev. Food Sci. Nutrition*, **53**, 162 (2013).
4. J. M. Gutteridge and B. Halliwell, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **899**, 136 (2000).
5. P. A. Kilmartin, H. Zou, and A. L. Waterhouse, *Am. J. Enol. Vitic.*, **53**, 294 (2002).
6. P. A. Kilmartin, H. Zou, and H. Waterhouse, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1957 (2001).
7. R. Bortolomeazzi, N. Sebastianutto, R. Toniolo, and A. Pizzariello, *Food Chem.*, **100**, 1481 (2007).
8. M. A. Samra, V. S. Chedea, A. Iconomou, A. Calokerinos, and P. Kefalas, *Food Chem.*, **125**, 622 (2011).
9. K. E. Yakovleva, S. A. Kurzeev, E. V. Stepanova, T. V. Fedorova, B. A. Kuznetsov, and O. V. Koroleva, *App. Biochem. Microbiol.*, **43**, 661 (2007).
10. S. Chevion, M. A. Roberts, and M. Chevion, *Free Radical Biol. Med.*, **28**, 860 (2000).
11. J. F. Arteaga, M. Ruiz Montoya, A. Palma, G. Alonso Garrido, S. Pintado, and J. M. Rodríguez Mellado, *Molecules*, **17**, 5126 (2012).
12. D. Ž. Sužnjević, F. T. Pastor, and S. Ž. Gorjanović, *Talanta*, **85**, 1398 (2011).
13. S. Ž. Gorjanović, M. M. Novaković, N. I. Potkonjak, I. Leskošek Čukalović, and D. Ž. Sužnjević, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 4 (2010).
14. S. Ž. Gorjanović, M. M. Novaković, N. I. Potkonjak, and D. Ž. Sužnjević, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 4626 (2010).
15. S. Ž. Gorjanović, M. M. Novaković, P. V. Vikosavijević, F. T. Pastor, V. V. Tešević, and D. Ž. Sužnjević, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 8400 (2010).
16. M. M. Novaković, S. M. Stevanović, S. Ž. Gorjanović, P. M. Jovanović, V. V. Tešević, M. A. Janković, and D. Ž. Sužnjević, *J. Food Sci.*, **76**, C663 (2011).
17. K. Kikuchi and T. Murayama, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **49**, 1554 (1976).
18. A. Palma, M. Ruiz Montoya, J. F. Arteaga, and J. M. Rodríguez Mellado, *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 582 (2014).
19. J. Y. Kim, D. S. Choi, and M. Y. Jung, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3460 (2003).
20. R. Joshi, M. S. Kumar, K. Satyamoorthy, M. K. Unnikrishnan, and T. Mukherjee, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 2696 (2005).
21. S. W. Lee, M. K. Jeung, M. H. Park, S. Y. Lee, and J. Lee, *Food Chem.*, **118**, 681 (2010).
22. H. Yoshida and S. Takagi, *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 220 (1999).
23. G. Fauler, H. J. Leis, J. Schalamon, W. Muntean, and H. Gleispach, *J. Mass Spectrometry*, **31**, 655 (1996).
24. P. S. Guin, S. Das, and P. C. Mandal, *Int. J. Electrochem.*, **2011**, 816202 (2011).
25. C. P. Andrieux, L. Nadjo, and J. M. Savéant, *J. Electroanal. Chem.*, **26**, 147 (1970).
26. J. C. Imbeaux and J. M. Savéant, *J. Electroanal. Chem.*, **44**, 169 (1973).
27. J. M. Savéant and D. Tessier, *J. Electroanal. Chem.*, **61**, 251 (1975).
28. J. M. Savéant and D. Tessier, *J. Electroanal. Chem.*, **77**, 225 (1977).
29. D. B. Oldham, *Anal. Chem.*, **44**, 196 (1972); *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, **82**, 1099 (1986).
30. G. D. Zoski, D. B. Oldham, P. J. Mahon, T. L. E. Menderson, and A. M. Bond, *J. Electroanal. Chem.*, **297**, 1 (1991).
31. NIST Standard reference data, U.S. Secretary of Commerce, Vol. 69 (2011), <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C106514&Mask=400>.
32. R. S. Nicholson and I. Shain, *Anal. Chem.*, **36**, 706 (1964).
33. J. M. Rodríguez Mellado, *Ann. Chim.*, **83**, 279 (1993).
34. M. Ruiz Montoya and J. M. Rodríguez Mellado, *J. Electroanal. Chem.*, **370**, 183 (1994).
35. J. M. Rodríguez Mellado, M. Blázquez, M. Domínguez, and J. J. Ruiz, *J. Electroanal. Chem.*, **195**, 263 (1985).
36. J. M. Rodríguez Mellado, M. Blázquez, and M. Domínguez, *J. Electroanal. Chem.*, **201**, 237 (1986).
37. P. Andrieux, L. Nadjo, and J. M. Savéant, *J. Electroanal. Chem.*, **42**, 223 (1973).
38. L. Nadjo and J. M. Savéant, *J. Electroanal. Chem.*, **137**, 149 (1982).
39. J. E. Cosano, A. M. Heras, L. Camacho, J. L. Avila, and J. M. Rodríguez Mellado, *J. Electroanal. Chem.*, **195**, 321 (1985).
40. E. Muñoz, L. Camacho, J. L. Avila, A. M. Heras, and J. J. Ruiz, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **96**, 255 (1987).
41. A. M. Heras, E. Muñoz, J. L. Avila, and L. Camacho, *Electrochim. Acta*, **32**, 1495 (1987).
42. R. Ortiz, M. J. Higuera, R. Marín Galvín, and J. M. Rodríguez Mellado, *J. Electrochem. Soc.*, **148**, E419 (2001).

**Evaluation of the immobilization of adenosine and guanosine on carbon electrodes
as sensors for the antioxidant activity**

by

R. Estévez Brito, S. Pintado and J. M. Rodríguez Mellado*

Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada
CeIA3, Campus Universitario Rabanales, IUIQFN, edificio Marie Curie
Universidad de Córdoba
E-14014-Córdoba (Spain)

*To whom correspondence should be addressed (e-mail: jmrodriguez@uco.es)



Abstract

A sensor for the evaluation of the antioxidant activity has been developed using adenosine and guanosine nucleosides immobilized on carbon electrodes. The experimental variables were optimized for both nucleosides and two carbon electrodes (glassy carbon, GCE, and carbon paste, CPE), showing small differences due mainly to the greater surface of the CPE vs. the CGE. The effect of the simultaneous immobilization of both nucleosides was also studied. The sensor was validated using Fenton reagent in the absence and the presence of ascorbic acid as antioxidant. It was observed that ascorbic acid protects the nucleoside immobilized on the electrode surface from the oxidant action of Fenton's reagent.

Keywords: purine nucleosides; adenosine; guanosine; sensors; antioxidants; glassy carbon electrode; carbon paste electrode



Introduction

Adenosine and Guanosine are purine nucleosides comprising a molecule of adenine or guanine attached to a ribose sugar molecule (ribofuranose) moiety via a β -N₉-glycosidic bond. Adenosine plays an important role in biochemical processes, such as energy transfer, as adenosine triphosphate (ATP) and adenosine diphosphate (ADP), as well as in signal transduction as cyclic adenosine monophosphate, cAMP. It is also an inhibitory neurotransmitter, believed to play a role in promoting sleep and suppressing arousal, with levels increasing with each hour an organism is awake.

Guanosine can be phosphorylated to become guanosine monophosphate (GMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), guanosine diphosphate (GDP), and guanosine triphosphate (GTP). These forms play important roles in various biochemical processes such as synthesis of nucleic acids and proteins, photosynthesis, muscle contraction and intracellular signal transduction (cGMP). When guanine is attached by its N9 nitrogen to the C1 carbon of a deoxyribose ring it is known as deoxyguanosine.

Guanosine is required for an RNA splicing reaction in mRNA, when a "self-splicing" intron removes itself from the mRNA message by cutting at both ends, re-ligating, and leaving just the exons on either side to be translated into protein.

An antioxidant is a substance that, at relatively low concentrations, may delay or prevent the oxidation of a substrate [1]. Primary antioxidants, which prevent the formation of free radicals, particularly reactive oxygen species (ROS), include vitamin E [2], polyphenols [3], antioxidant enzymes and membranes [4, 5]. Secondary antioxidants, with radical scavenging activity, either interrupt the propagation of free radicals or inhibit the generation of ROS, or prevent the metabolic activation of carcinogens [6, 7]. Tertiary antioxidants repair the damage from free radicals or eliminate damaged molecules [8, 9].



Electrochemical biosensors with immobilized DNA have been reported for the determination of compounds interacting with DNA [10-12], being also capable for monitoring the DNA integrity. Recently there have been reported guanine and adenine biosensors for the electrochemical determination of antioxidant capacities in flavored waters [13].

The aim of this work was the immobilization of adenosine and guanosine on carbon electrodes for their use as sensors for the antioxidant activity, under the assumption that nucleosides can better simulate the DNA than the nucleotides.

Experimental

All the reagents used were at least of analytical quality. Adenosine and guanosine were from Sigma-Aldrich. The rest of reagents used were from Merck. All chemicals were used without further purification. Measurements were carried out in phosphate solutions of 0.2 M ionic strength obtained with a MILLIPORE-MILLI Q which was used as supporting electrolyte. The pH was adjusted with solid NaOH. Stock solutions of adenosine or guanosine were stored in darkness at 277K to avoid decomposition.

The electrochemical measurements were made on a CHI650A electrochemical workstation from IJCambria. The glassy carbon electrode was from IJCambria (area = 7.5 mm²). The reference electrode was a Metrohm 6.0733.100 Ag | AgCl | KCl (3 M) and the auxiliary electrode was a platinum rod. Solutions were purged with purified N₂ for at least 30 min to avoid the presence of oxygen that could originate undesired redox reactions on the electrode.

The glassy carbon electrode was polished with silicon carbide paper, followed by a diamond (0.25 μm) slurry and alumina (0.3 and 0.05 μm) slurries. Residual polishing was removed from the surface by the sonication of the electrode in a water bath for 30 min.



After rinsed with distilled water thoroughly, the electrode was applied a potential of +1.7 V under stirring in 0.2 M phosphate solution of pH 4.7 for 300 s, and then the electrode was scanned between +0.2 and +1.5 V at 0.1 V/s until a steady-state current-voltage curve was obtained.

The carbon paste electrode was prepared by hand-mixing 0.50 g of carbon powder and 750 μL of paraffin (liquid for spectroscopy) from Merck. The paste was carefully mixed and homogenized in a glass mortar with a further sonication for 15 minutes. The resulting paste was kept at room temperature. The paste was packed firmly into a glass tube with an 8 mm diameter. Electrical contact was established via a metal screw connected in the inner hole of the tube. To regenerate the surface, a slice was cut and the electrode smoothed by rubbing on a piece of glossy paper just prior to use. The electrochemical pretreatment involved 5 cyclic voltammograms between -0.4 and $+1.4$ V in a 0.2 M phosphoric acid solution.

The immobilization of the nucleosides was made at constant potential after the peak potential of the oxidation peak of each nucleoside. The modified electrode so obtained was extracted from the solution and carefully washed with ultrapure water.

Results and discussion

Optimization of variables for the deposition

For the optimization of the process, the deposition of the nucleosides was made by applying a constant potential, E_d , during a given deposition time, t_d , with the clean and activated carbon electrode immersed in a solution containing the nucleoside and the buffer solution. Then the modified electrode was extracted from the solution, washed gently with deionized water and introduced into a solution containing only the background solution at the same pH. Linear-



sweep cyclic voltammetry (LSCV or simply CV) was used to investigate the amount of nucleoside deposited onto the electrode surface.

To optimize the deposition potential on GCE, constant nucleoside concentration, pH and deposition time were used. The deposition potentials were varied from 0.2 to 1.2 V for adenosine and from 0.2 to 0.8 V for guanosine. The higher potentials tested were limited by the appearing of the oxidation peaks of the nucleosides. As it can be seen in figure 1, the peak intensities obtained are nearly independent of the deposition potential and so, a potential of 0.5 V was used in both cases.

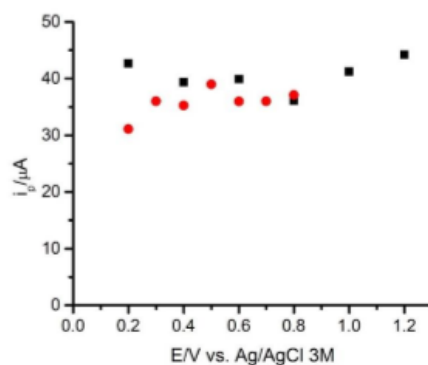


Figure 1. Dependence of the peak intensity of the cyclic voltammograms recorded at $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ on the GCE on the deposition potential, at pH 4.1 after a deposition time of 180 s, for $1.7\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ adenosine (■) and guanosine (●).

The optimization of the deposition pH was achieved by fixing the deposition potential to 0.5 V and at constant nucleoside concentration and deposition time. In both cases, the oxidation peaks shifted towards less positive values as the pH was increased. This must be due to the occurrence of an acid-base dissociation reaction taking place prior or in the rate-determining step, r.d.s., of the oxidation process.



As shown in figure 2, in the case of adenosine, there is a decrease in the peak current above pH 5 that can be attributed to the dissociation pK of the molecule, around 3.6 [14]. This decrease is not observed in the case of guanosine, for which no dissociation was observed below pH 11 [14], though a decrease was observed in basic media. Based on these results, a deposition pH of 5.0 was selected.

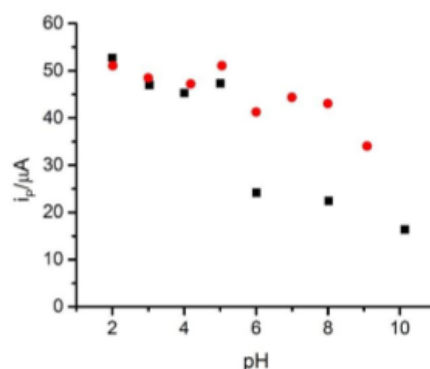


Figure 2. Dependence on pH of the peak intensity of the cyclic voltammograms recorded at $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ on the GCE, at a deposition potential of 0.5 V , after a deposition time of 180 s , for $1.7\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ adenosine (■) and guanosine (●).

The optimization of the deposition time has been made at pH 5.0, $E_d=0.5 \text{ V}$ and constant nucleoside concentration. The peak intensity increases as t_d increases, reaching roughly constant values above 180 s (figure 3). So, this time was selected for the deposition on GCE. Finally, the bulk nucleoside concentration was varied at constant values of the rest of variables. In both cases, the peak current of the oxidation peak increased as the concentration of was increased, reaching a plateau at different concentration values for the different nucleosides, as shown in figure 4. The values selected for the optimum deposition of adenosine and guanosine were 0.06 and 0.035 mM , respectively.



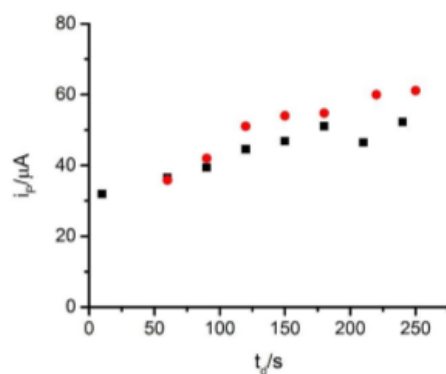


Figure 3. Dependence on the deposition time of the peak intensity of the cyclic voltammograms recorded at $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ on the GCE, at pH 4.3 and a deposition potential of 0.5 V , for $1.7 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ adenosine (■) and guanosine (●).

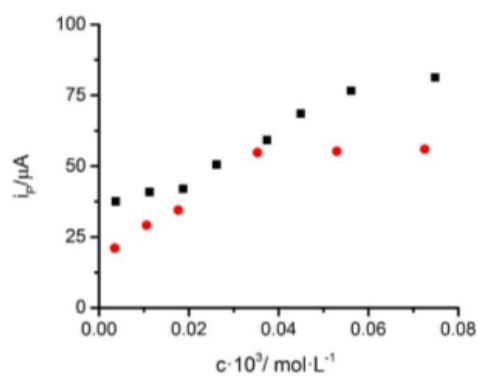


Figure 4. Dependence on the nucleoside concentration of the peak intensity of the cyclic voltammograms recorded at $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ on the GCE, at pH 4.1, and a deposition potential of 0.5 V , after a deposition time of 180 s , for adenosine (■) and guanosine (●).

When the CPE was used, the results were very similar but some parameters varied slightly from those found for the GCE. The main differences were that the optimum deposition



time was 150 s and the optimum concentration values were around 0.8 mM, this probably due to the much higher area of the CPE respect to the GCE.

The co-deposition of adenosine and guanosine was also investigated. As the main result, it was found that, under the optimum conditions, which were virtually the same as those found for the individual nucleosides, the peak intensities corresponding to both compounds decreased c.a. a 20% with respect to the deposition made with each component. This indicate that the electrode surface is occupied in the same amount for each component and no synergistic effects nor inhibition were observed in the co-deposition.

All the previous results led us to choose the sensors with guanosine, because they have the best accessible range of potentials. The measurement of the damage to DNA glucosides was made by exposing biosensors to hydroxyl radicals generated by Fenton reagent during a given time in the absence an in the presence of an antioxidant, namely ascorbic acid. The recovery of the reduction signal will be related to the protection effect of the antioxidant. This is shown in figure 5.

As, can be seen, the presence of ascorbic acid protects the adsorbed guanosine from the action of the Fenton reagent, this protection being more effective at higher ascorbic acid concentrations. The problem arising from the evaluation of the antioxidant effect by using this strategy is the evident saturation effect shown in the inset of the figure. So, the maximum recovery is, evidently, 100%, and the linearity of the graph of recovery versus antioxidant dose is observed in a narrow range of concentrations. Though a criterion about the antioxidant activity could be developed with these sensors, the difficulty to evaluate the protective effect at low recoveries advise against their use. The same effect was found when the carbon paste electrode was used.



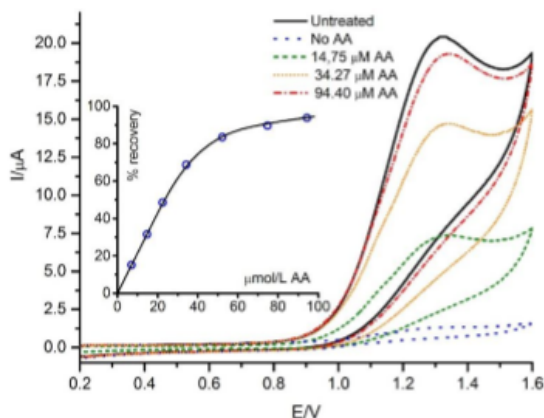


Figure 5. Cyclic voltammograms recorded at $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ on the GCE, after deposition in the optimal conditions. The voltammogram of the adsorbed layer of guanosine (curve labeled “untreated”) is shown together those corresponding to an incubation of 180 s in the presence of Fenton reagent, and variable doses of ascorbic acid (AA).

Inset: percent of recovery vs. ascorbic acid concentration.

Acknowledgements

Financial support from Junta de Andalucía (Research group FQM-0198) and CICYT within the framework of the project CTQ2011-28973

References

- [1] Y. Shebis, D. Iluz, Y. Kinel-Tahan, Z. Dubinsky and Y. Yehoshua, *Food Nutrit. Sci.*, **4**, 2013, 643.
- [2] S. Thangapandiyan and S. Miltonprabu, *Int. J. Phytopharmacology*, **4(4)**, 2013, 245.
- [3] K. T. Howitz, K. J. Bitterman, H. Y. Cohen, D. W. Lamming, S. Lavu, J. G. Wood, R. E. Ipkín, P. Chung, A. Kisielewski, L. Zhang, B. Scherer and D. Sinclair, *Nature*, **425**, 2003



- [4] F. Visioli, G. Bellomo and C. Galli, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247, 1998, 60.
- [5] R. C. O'Brien, M. Luo, N. Balazs and J. Mercuri, *J. Diabetes Complications*, 14, 2000, 201.
- [6] H. Mukhtar and N. Ahmad, *Toxicol. Sci.*, 52, 1999, 111.
- [7] F. Visioli and C. Galli, *Lipids*, 34, 1999, S315.
- [8] A. Godic, B. Poljšak, M. Adamic and R. Dahmane, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2014 (2014), Article ID 860479
- [9] E. D. Owuor and A. T. Kong, *Biochem. Pharm.*, 64, 2002, 765.
- [10] H. Xiong, Y. Chen, X. Zhang, H. Gu and S. Wang, *Sensors & Actuators B.*, 181, 2013, 85
- [11] T. Gu, J. Wang, H. Xia, S. Wang and X. Yu, *Materials*, 7, 2014, 1069.
- [12] A. Ulianasa, L. Y. Henga, M. Ahmad, H. Lau, Z. Ishak and T. L. Ling, *Sensors & Actuators B.*, 190, 2014, 69
- [13] A. H. Kamel, F.T.C. Moreira, C. Delerue-Matos, M. Goreti and F. Sales, *Biosensors Bioelectron.*, 24, 2008, 591.
- [14] A. Albert, E.P. Serjeant, *The Determination of Ionization Constants*, Third Edition, Ed. Chapman and Hall, London, 1984.





Mechanism of Mercury Electrooxidation in the Presence of Hydrogen Peroxide and Antioxidants

R. Estévez Brito,^a J. M. Rodríguez Mellado,^{a,*} A. Palma,^b M. Ruiz Montoya,^b and J. F. Arteaga^c

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

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

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

The oxidation process occurring on mercury electrodes in the presence of hydrogen peroxide has been analyzed in basic solutions by polarography and voltammetry in their linear scan and differential pulse modes. The process involves Hg(I) ion – in addition to Hg(II) ion – and hydroperoxide radicals, these last formed at trace levels. To demonstrate this radical generation radical scavengers (antioxidants), characterized with the DPPH• radical scavenging assay, were employed. The interaction of the radicals with the antioxidant originate the decrease in signal, but the antioxidant itself does not react with the hydrogen peroxide in the absence of Hg. In the absence of antioxidant, the process is two-electron, being the rate-determining step the second electron transfer; at high concentrations of antioxidant, the oxidation corresponds to a reversible one-electron transfer followed by a chemical reaction between the hydroperoxide radicals and the antioxidant. A reaction scheme is proposed for intermediate antioxidant concentrations. © 2014 The Electrochemical Society. [DOI: 10.1149/2.1061412jes] All rights reserved.

Manuscript submitted July 25, 2014; revised manuscript received August 25, 2014. Published September 18, 2014.

More than forty years ago, the oxidation and reduction processes originated by the H₂O₂ on mercury electrodes were investigated in acidic media using polarographic and galvanostatic methods.¹ In the study, it was concluded that the anodic reaction corresponds not the H₂O₂ oxidation, but to the oxidation of Hg to Hg⁺⁺ ions and the subsequent formation of a complex with sulfate ions.

Kikuchi and Murayama² proposed that the anodic wave observed on mercury electrodes in the presence of H₂O₂ is due to the oxidation of Hg to Hg⁺⁺ followed by the formation of a mixed complex with HO₂⁻ and OH⁻ ions, as is shown in Scheme 1. This assumption was confirmed by Suznkievic and coworkers by using the titration of H₂O₂ with HgCl₂ in basic solutions.³ A mechanism involving ROS (reactive oxygen species) generation has been recently proposed.⁴

Reactive oxygen species (ROS) are radicals generated by organic and inorganic peroxides, including those originated by H₂O₂ or water itself, i.e., HO•, HO₂•, O₃⁻, ... Free radicals are produced in moderate quantities in the organism, and apart from their role as secondary redox messengers,⁵ they participate also in important biological functions as the cellular proliferation stimulation, the physiological regulation, etc.⁶ The excessive production of ROS of exogenous or endogenous origin imply the occurrence of oxidative stress.⁷ Such species play a significant role in the antioxidant stress and damage to DNA, proteins and lipids⁸ and in chronic diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, Crohn's, cancer, etc.^{9,10} The reactivity of radicals is associated to the chain reactions they initiate. Secondary antioxidants (that is, antioxidants with radical scavenging activity) interrupt the propagation of free radicals and prevent the metabolic activation of carcinogens.^{11,12}

Spices and condiments have been recognized long time ago for their physiological and medicinal properties.^{13,14} The antioxidant activity of these compounds, specially phenols toward free radicals or ROS produced either by cell metabolism or as a response to external factors, is due to the scavenge of radicals and ROS.¹⁵ This results in an inactivation of radical species,¹⁶ thus avoiding or preventing the abovementioned degenerative disorders.¹⁷⁻²⁰

To evaluate the antioxidant activity of natural products, different assays have been used, but a comparison of the results is difficult due to the different experimental methodologies adopted. Antioxidant activities of plant extracts (or their pure components) have been determined by an accelerated test,^{19,20} by using stable radicals such as ABTS²¹ or DPPH•,²² by ESR spin trapping technique and by measuring the oxygen consumption in lipid oxidation.²³ All these

procedures present drawbacks as their requirements of using specific reagents and the time-consuming sample preparation.

Plant phenolics deserve special mention due to wide-ranging benefits they offer to plants and other living organisms. These advantages are, in essence, the result of their inherent physicochemical properties associated with the phenol functional group. The antioxidant character of phenolic compounds has been recently determined from the decrease in the polarographic current of hydrogen peroxide solutions originated by the addition of increasing amounts of the antioxidants.^{3,24-27} A variant of the method using the differential pulse voltammogram was applied to other alimentary compounds.^{4,28} In all cases, the antioxidant action was related to the scavenging character of the antioxidants.

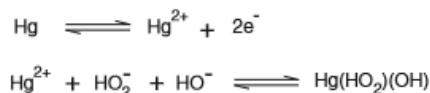
The aim of this work was to report the experimental evidence supporting a reaction mechanism of mercury electrooxidation in the presence of hydrogen peroxide and antioxidants, able to prove the ROS generation in this anodic process of hydrogen peroxide on mercury electrodes.

Experimental

2,5-dihydroxybenzaldehyde, eugenol, geraniol, sesamol and DPPH• (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical, 95%, were purchased from Aldrich (or Sigma-Aldrich) and the rest of chemicals were Merck analytical grade reagents. All the reactants were used without further purification.

Solutions of 0.1 M in both sodium carbonate and phosphoric acid were used as supporting electrolytes. The aqueous solutions were prepared with ultrapure water type I (resistivity 18.2 MΩ·cm at 25°C) obtained from a Millipore Simplicity system. The ionic strength was adjusted to 0.5 M with solid KNO₃ and the pH was adjusted with solid NaOH. Antioxidants were dissolved in ethanol and the stock solution concentrations were 5 × 10⁻³ M. These solutions were stored in darkness at 277 K to avoid decomposition.

The concentration of hydrogen peroxide in the cell was 5 × 10⁻⁴ M. In the experiments made at variable antioxidants amounts,



Scheme 1. Reaction pathway proposed by Kikuchi and Murayama (see Ref. 2).

*Electrochemical Society Active Member.
*E-mail: jmrodriguez@uco.es

the percentage of ethanol in the cell was 30% because the ethanol content modifies the DPV peak area.²⁸ For this reason, the solutions were prepared with a fixed amount of supporting electrolyte, 100 μL of 5×10^{-2} M H_2O_2 , variable volumes of the stock solution of antioxidant in ethanol and completing the total volume with pure ethanol. This was made by preparing a separate solution for each concentration of antioxidant. The H_2O_2 was added after the solutions were purged with purified nitrogen.

Measurements were made on a CHI650A electrochemical workstation from ICambria coupled to an EF-1400 controlled growth mercury electrode from BAS instruments. In both the DME and in the HMDE mode, the drop area was 6.70×10^{-3} cm^2 . The temperature was kept at 298 ± 0.1 K. All potentials were measured against an $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}$, 3M electrode (BAS MF-2052). A platinum counter electrode BAS MW-1034 was used. The parameters selected in dc polarography and differential pulse voltammetry (DPV) were: pulse amplitude 0.05 V, pulse width 0.05 s and pulse period 0.2 s. In both dc and DP polarography the drop-time was fixed at 2 s.

The reproducibility of the measurements was ensured by repeating the experiments and the standard deviations of the data were less than 5%.

Spectrophotometric measurements. DPPH[•] radical scavenging assay.— The maximum wavelength of the UV-visible absorption band of the DPPH[•] is 515 nm and the action of an AO causes the decrease of this band or its eventual disappearing through the reactions to give DPPH and AO[•]. The amount of antioxidant required to decrease the initial concentration of DPPH[•] to 50% (efficient concentration or EC_{50}) is a measurement of the antioxidant activity. The reverse value, namely anti-radical power, $\text{ARP} = 1/\text{EC}_{50}$, should be higher as the antioxidant is more efficient.

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

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

$$\text{Abs}_{515 \text{ nm}} = 12.195 \times C_{\text{DPPH}} - 0.0137$$

as determined by linear regression.

Results and Discussion

Solutions containing hydrogen peroxide give single signals in direct current, dc, and differential pulse, DP, polarography, as well as in linear-sweep and differential pulse voltammetry. In dc polarography, the curve generally shows a polarographic maximum that prevents the use of this technique for mechanistic purposes.^{3,24–28} In some situations, a well-defined polarogram can be obtained, as is the case shown in Figure 1: a maximum suppressor as Triton-X100 can eliminate the maximum but the resulting wave is deformed, being wider than the original polarogram. In fact, in these conditions, the logarithmic analyses made in the form of E vs. $\log[i/(i_L - i)]$ plots, in the range of potentials close to the half-wave potential, have slopes much higher than those expected.² Moreover, the analyses were not entirely linear. In the same way, DP polarograms are also distorted.

On the other hand, both the limiting currents, in dc polarography, and the peak currents, in DP polarography, are nearly pH-independent at pH values higher than 8.5, decreasing slightly as the pH was decreased. Below pH 7 the oxidation of mercury overlaps strongly with the oxidation signal.

In linear-sweep cyclic voltammetry, the oxidation-reduction process was investigated at $\text{pH} > 7.5$. Figure 2 shows a typical cyclic voltammogram. It can be appreciated that the reverse scan shows a reduction peak at potentials close to the oxidation peak, this indicating that the cathodic process corresponds to the reduction of the species that is oxidized in the oxidation scan. Moreover, the form of the voltammogram show evidence of superficial processes, this confirming the polarographic results.

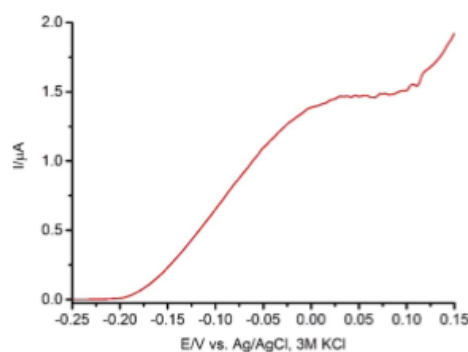


Figure 1. dc polarogram of 5×10^{-4} M H_2O_2 at $\text{pH} = 11.49$ and 0.03% triton X-100.

In all cases, the characteristic potentials (i.e. half-wave potentials in dc polarography and peak potentials in the rest) remained almost unchanged in very basic buffered solutions ($\text{pH} > 11.5$). In the rest of the pH-range studied (8–11.5) these potentials shifted 45–50 mV per pH unit toward negative values as the pH was increased. This indicates that the H^+ ion is involved in the process at $\text{pH} < 11.5$. It is evident that the acid-base dissociation of the hydrogen peroxide preceding the oxidation process is the cause of this pH dependency, because the dissociation pK_a of H_2O_2 is 11.7.

Differential pulse voltammetry was revealed as the most reliable technique for the study of the oxidation process, because the well definition and low distortion of the signal. The area of the DPV peak of the H_2O_2 oxidation on mercury was proportional to the peroxide concentration,²⁹ and decreased as the contents of ethanol in the medium was increased, this indicating that the oxidation involves superficial processes, as commented above.

The equation 1, corresponding to first-order processes, was used for the analysis of the DP voltammograms:²⁹

$$I = 4I_p[L/(1 + L)^2] \quad [1]$$

where $L = \exp[-(E - E_p)/b]$, I_p and E_p being the peak intensity and the peak potential, respectively, and b is a parameter which has the same value and meaning as the slope of the dc logarithmic analysis.^{29,30}

This equation corresponds to a symmetrical peak, which area is proportional to both the number of electrons involved in the process and the reactant concentration. As can be seen in Fig. 3, the DPV peaks of H_2O_2 agree with equation 1. The fitting between theoretical

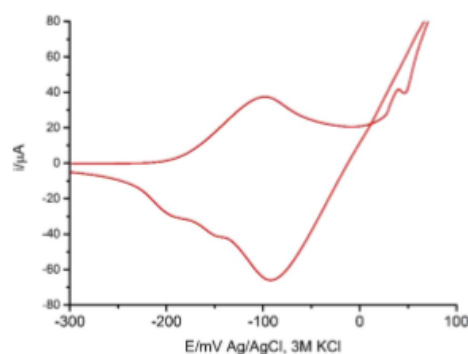


Figure 2. Linear-sweep cyclic voltammogram of 5×10^{-4} M H_2O_2 at $\text{pH} 10.50$

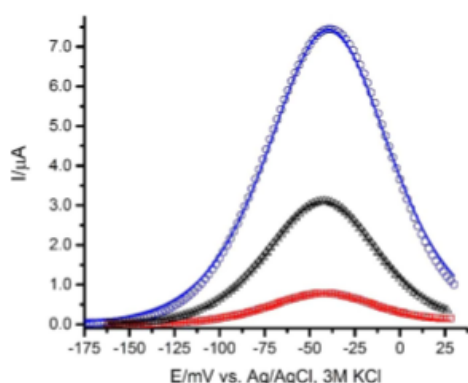


Figure 3. Fitting of equation 1 (lines) to experimental DP voltammograms (symbols) of H_2O_2 at $\text{pH} = 10.50$ and 30% ethanol and different concentration values. Squares: 0.1 mM; triangles: 0.4 mM; circles: 1 mM.

and experimental data is good in the first part of the curve, but the end part is distorted by the oxidation of the mercury of the electrode surface, being the distortion more evident for the peaks recorded at lower concentrations of H_2O_2 . So, the b values were obtained from the fitting of the experimental results to equation 1 in the first part of the DPV peak. Such b values were of 38–42 mV, corresponding to a

two-electron process in which the rate-determining step, r.d.s., is the second electron transfer.^{29,30}

The addition of an antioxidant to the reaction mixture causes a decrease in the intensity of the DPV peak with respect to that obtained in the absence of this compound. This decrease is greater as the antioxidant concentration is increased, as is shown in Figure 4.

The scavenging properties of the compounds here used have been proved by using the DPPH[•] radical scavenging assay. 2,5-dihydroxybenzaldehyde, eugenol, geraniol and sesamol are found in natural or synthetic spices and condiments.³¹ The main experimental problem of this method arises from the determination of the steady-state concentration, since even for antioxidant species having a fast kinetics, after 24 h the decrease of absorbance continues, though in low extension, and so it is difficult to obtain reproducible measurements. In this work, it was considered that the steady-state was reached when the absorbance remained constant during at least 10 min in the uncertainty limits of the spectrophotometer, i.e. ± 0.001 absorbance units. The results obtained are gathered in Figure 5 for sesamol and 2,5-dihydroxybenzaldehyde as an example.

As can be seen, both compounds are active in the test, the steady-state concentration depending on the start concentration of antioxidant. The parameter EC_{50} , that is, the concentration of antioxidant that causes a decrease of 50% in the DPPH[•] radical concentration, is obtained from these values. This is illustrated in Figure 6 for the abovementioned compounds and also for eugenol.

The antioxidant character increases as the EC_{50} decreases, because a lower concentration of compound is needed to scavenge the radical used as probe. In short, the four compounds here used are radical scavengers.

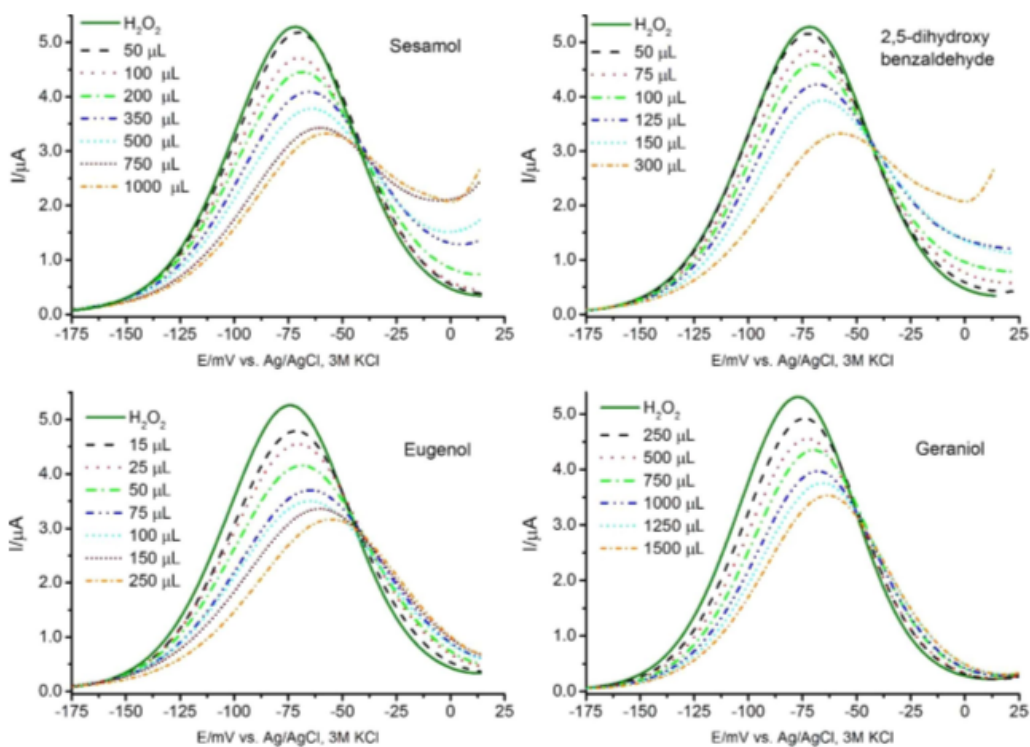


Figure 4. DP voltammograms of 5×10^{-4} M H_2O_2 and different amounts of 1 mM antioxidant solutions at $\text{pH} 10.50$ and 30% ethanol in the medium. Final volume: 10 mL.

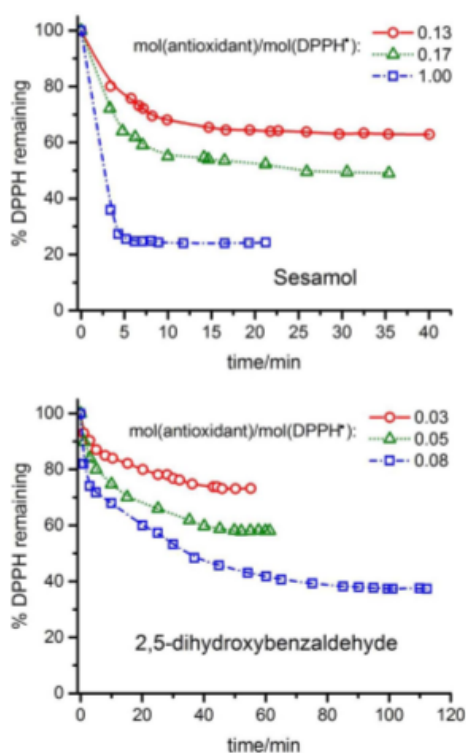


Figure 5. DPPH• radical scavenging assay. Determination of the steady-state concentration for different antioxidant/DPPH• ratios.

From the fittings to equation 1 shown in Figure 7 for sesamol, the values of the b and I_p parameters were obtained, and the peak areas were calculated. At high antioxidant concentrations, such areas reached limiting values corresponding to one-half of the original areas. In addition, the b value in these conditions is close to 60 mV, corresponding to an EC process, that is, a process in which the r.d.s. is a chemical reaction placed after one reversible electron transfer.^{29,30}

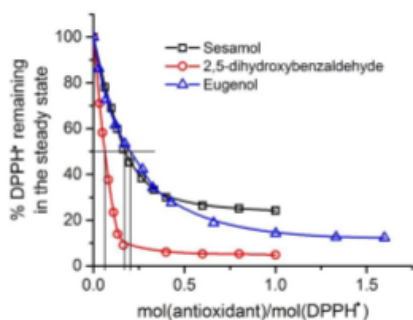


Figure 6. DPPH• radical scavenging assay. Dependence of the DPPH• steady-state concentration with the antioxidant/DPPH• ratio for three antioxidants. Vertical lines place at the 50% value indicate the EC₅₀ parameter for each antioxidant.

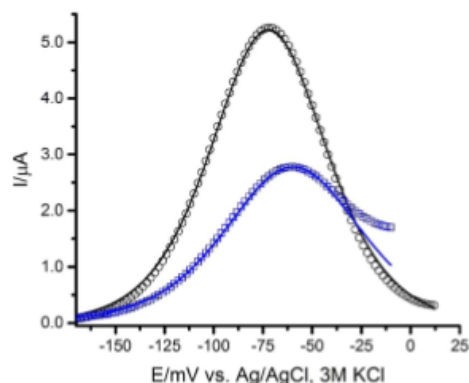


Figure 7. Fitting of equation 1 (lines) to experimental DP voltammograms (symbols) of 5×10^{-4} M H_2O_2 at pH = 10.50 and 30% ethanol. Circles: in the absence of sesamol. Squares: in the presence of 0.1 mM sesamol.

In a first approach, it could be assumed that the decrease of the peak intensity is due to the reaction of the antioxidant with the species HO_2^- (or H_2O_2 itself). If this reaction takes place, a parallel decrease the concentration of the complex occurs. However, there are three reasons that support that this is not the cause of the decrease of intensity: First, the reaction rate of the interaction of the hydrogen peroxide and sesamol must increase as the antioxidant concentration is increased. This implies that the decrease of intensity must progress beyond the 50%, and at high antioxidant concentrations no signal would be detected. Second, if the antioxidant reacts with the H_2O_2 , it must also react with this molecule in the solution and in the absence of the electrochemical process. Third, if Scheme 1 were true, the shape of the DPV peak (the b value) must be the same both in the presence and in the absence of antioxidant, because the electrochemical process must be of the same type irrespective the antioxidant concentration, conversely to the experimental findings.

The justification for the first reason has been given above, that is, there is a limiting value of the peak area, namely one half of the area in the absence of antioxidant.

Two experimental evidence support the second reason. First, the reaction between hydrogen peroxide and the antioxidant in the solution must take place continuously. If this reaction occurs, successive voltammograms recorded with the same solution must decrease in intensity, conversely to that experimentally found: voltammograms recorded along 3h give the same values of intensity and half-width.

In addition, experiments were made by recording the linear-sweep cyclic voltammogram of antioxidants in the presence of increasing amounts of H_2O_2 . No effects on the oxidation wave were observed even at hydrogen peroxide concentrations 10 times higher than the antioxidants,⁴ as shown in Figure 8 for sesamol.

In conclusion, no reaction occurs involving these two reactants.

Finally, the shape of the DPV peak, and the value of the area at high antioxidant concentrations corresponds to a one-electron process, in which the r.d.s. must be a chemical reaction involving antioxidant, placed after the first electron transfer. Therefore, the overall process changes from a from a two-electron oxidation to a one-electron reaction.

For all these reasons it can be concluded that Scheme 1 is not complete and an intermediate must react with the antioxidant.

The oxidation of mercury in the absence of hydrogen peroxide takes place at potentials 0.1 to 0.3 V more positive than the peak here analysed, and involves the formation of $Hg(I)$ ions after one electron transfer.³² It is reasonable to think that this species must be the abovementioned intermediate. Moreover, the interaction with the antioxidant (radical scavenger) indicates that, in the presence of H_2O_2 ,

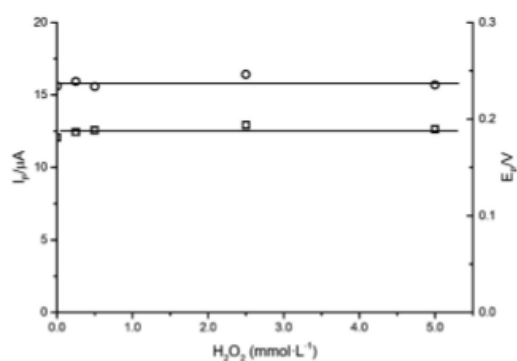


Figure 8. Peak currents (○) and peak potentials (□) of the linear-sweep voltammograms of sesamol recorded on a glassy carbon electrode in the presence of variable amounts of H₂O₂.

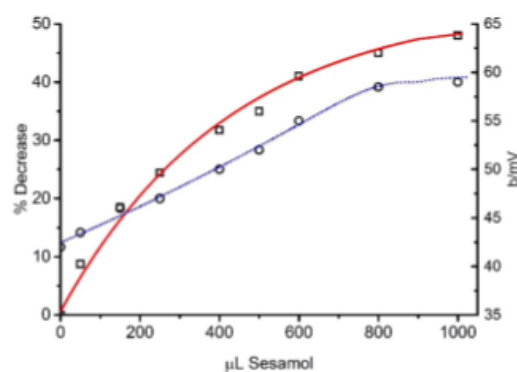
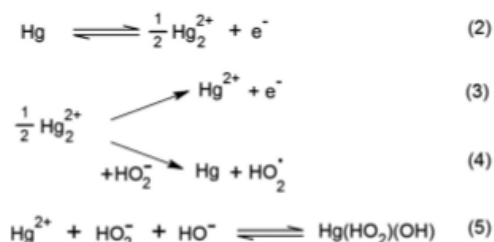


Figure 9. Decrease of the DPV peak area (solid squares, continuous line) and variation of b parameter value (hollow circles, dotted line) with the added amounts of 5×10^{-3} M sesamol solution.



Scheme 2. Reaction pathway proposed in this paper.

there are radicals involved in the reactions, and the only reasonable possibility is the formation of such radicals along the electrochemical process.

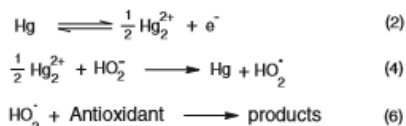
Scheme 2 shows a reaction pathway that takes into account all the above results and conclusions.

In the absence of antioxidant, the reaction 3 to give Hg (II) ions is the predominant, the reaction 4 takes place at trace levels, and the reaction pathway is reduced to that represented in Scheme 1. In this case, the DPV peak area corresponds to a two-electron transfer, and the shape of the peak can be described by equation 1 with $b = 2.303 RT/1.5 F = 39.6$ mV at 298 K,^{29,30} assumed that the r.d.s is the second one electron transfer (reaction 3).

The antioxidants act by reacting with the hydroperoxide radical produced in reaction 4, thus decreasing the Hg (II) ion concentration and, consequently, decreasing also the oxidation current. At high antioxidant concentrations, reactions 3 and 5 do not take place at measurable rates and the process can be described with Scheme 3.

Now, the DPV peak area corresponds to a reversible (or quasireversible) one-electron transfer followed by a chemical reaction (4 + 6), and the shape of the peak can be described by equation 1 with $b = 2.303 RT/F = 59.7$ mV at 298 K.^{29,30}

At intermediate antioxidant concentration values, the scheme consists of reactions (2) + (3) + (4) + (5) + (6) and the values of the peak



Scheme 3. Reaction pathway at high antioxidant concentrations.

area and b parameter are intermediate between the values obtained in the absence and in the presence of high concentrations of sesamol. Figure 9 shows the values of the b parameter, together the percentage of decrease of the peak area, with the addition of variable amounts of sesamol.

Conclusions

Solutions containing hydrogen peroxide give single signals in dc and DP polarography and voltammetry, with evidence of superficial processes coupled with the oxidation reactions.

The antioxidants 2,5-dihydroxybenzaldehyde, eugenol, geraniol and sesamol are radical scavengers as is deduced from the DPPH• radical scavenging assay.

From the analysis of the interaction with the radical scavengers it was concluded that the electro-oxidation of mercury in the presence of hydrogen peroxide is not a simple sequence of two electron transfers followed by a complex formation, but hydroperoxide radicals are formed at trace levels.

This interaction allows the use of voltammetric techniques to evaluate the antioxidant character of substances which react with these radicals, as was proposed in Ref. 4.

References

1. M. Honda, T. Kodera, and H. Kita, *J. Res. Int. Catal. Hokkaido Univ.*, **1**, 19 (1970).
2. K. Kikuchi and T. Murayama, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **49**, 1554 (1976).
3. D. Ž. Sužnjević, F. T. Pastor, and S. Ž. Gorjanović, *Talanta*, **85**, 1398 (2011).
4. A. Palma, M. Ruiz Montoya, J. F. Arteaga, and J. M. Rodríguez Mellado, *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 582 (2014).
5. M. L. Circo and T. Y. Aw, *Free Radic. Biol. Med.*, **48**, 749 (2010).
6. C. Bailly, H. El-Maarouf-Bouteau, and F. Corbineau, *Comptes Rendus Biol.*, **331**, 806 (2008).
7. B. Frei, *Am. J. Med.*, **97**, 5 (1994).
8. A. Barzilai and K. Yamamoto, *DNA Repair*, **3**, 1109 (2004).
9. H. Sies, *Oxidative stress*, p. 1, H. Sies, Eds.; Academic press, London (1985).
10. B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, p. 18, Clarendon Press, Oxford (1989).
11. H. Mukhtar and N. Ahmad, *Toxicological Sciences*, **52**, 111 (1999).
12. F. Visioli and C. Galli, *Lipids*, **34**, S315 (1999).
13. D. S. Arora and J. Kaur, *Int. J. Antimicrob. Ag.*, **12**, 257 (1999).
14. P. Pacheco, J. Sierra, G. Schmieda-Hirschmann, C. W. Potter, B. M. Jones, and M. Moshref, *Phytother. Res.*, **7**, 415 (1993).
15. N. Balasundram, K. Sundram, and S. Samman, *Food Chem.*, **99**, 191 (2006).
16. A. Valenzuela, S. Nieto, B. K. Cassels, and H. Speisky, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 935 (1992).
17. R. Blomhoff, *Curr. Opin. Lipidol.*, **16**, 47 (2005).
18. C. F. Bourgeois, *Antioxidant vitamins and health: cardiovascular disease, cancer, cataracts, and aging*; HNB Publishing: New York, USA, 2003.
19. A. Bendini, T. G. Toschi, and G. Lercher, *Ind. Aliment.*, **403**, 525 (2001).
20. M. P. Kalhonen, A. Hopia, H. Vuorela, J. P. Rahua, K. Pihlaja, T. Kujala, and M. Heinonen, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3954 (1999).

21. A. Cano, J. Hernández-Ruiz, F. García-Canovas, M. Acosta, and M. B. Arnao, *Phytochem. Anal.* **9**, 196 (1998).
22. C. Sánchez-Moreno, J. A. Larrueri, and F. A. Saura-Calixto, *J. Sci. Food Agric.* **76**, 270 (1998).
23. H. Y. L. Madsen, B. R. Nielsen, G. Bertelsen, and L. H. Skibsted, *Food Chem.* **57**, 331 (1996).
24. S. Ž. Gorjanović, M. M. Novaković, N. I. Potkonjak, I. Leskošek-Čukalović, and D. Ž. Sužnjević, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 744 (2010).
25. S. Ž. Gorjanović, M. M. Novaković, N. I. Potkonjak, and D. Ž. Sužnjević, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 4626 (2010).
26. S. Ž. Gorjanović, M. M. Novaković, P. V. Vikosavijević, F. T. Pastor, V. V. Tešević, and D. Ž. Sužnjević, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 8400 (2010).
27. M. M. Novaković, S. M. Stevanović, S. M. Gorjanović, P. M. Jovanović, V. V. Tešević, M. A. Janković, and D. Ž. Sužnjević, *J. Food Sci.*, **76**, C663 (2011).
28. A. Palma, M. Ruiz Montoya, J. F. Arteaga, and J. M. Rodríguez Mellado, *J. Electrochem. Soc.*, **160**(4), H213 (2013).
29. J. M. Rodríguez Mellado, M. Blázquez, M. Domínguez, and J. J. Ruiz, *J. Electroanal. Chem.*, **195**, 263 (1985).
30. J. M. Rodríguez Mellado, M. Blázquez, and M. Domínguez, *J. Electroanal. Chem.*, **241**, 291 (1988).
31. J. F. Arteaga, M. Ruiz Montoya, A. Palma, G. Alonso Garrido, S. Pintado, and José M. Rodríguez-Mellado, *Molecules* **17**, 5126 (2012).
32. B. Behr and J. Taraszewska, *J. Electroanal. Chem.*, **19**, 373 (1968).



Contents lists available at ScienceDirect

Electrochimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/electacta

Oxidation of cumene hydroperoxide on glassy carbon electrodes in aqueous solution and its interaction with ascorbic and gallic acids



Rafael Estévez^a, José Miguel Rodríguez Mellado^{a,*}, Manuel Mayén^b

^a Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada, IUIQFN, CEIA3, Campus Universitario de Rabanales, edificio Marie Curie, Universidad de Córdoba, E-14014 Córdoba, Spain

^b Departamento de Química Agrícola y Edafología, CEIA3, Campus Universitario Rabanales, edificio Marie Curie, Universidad de Córdoba, E-14014 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 June 2015

Received in revised form 15 October 2015

Accepted 17 October 2015

Available online 26 October 2015

Keywords:

Electrochemical oxidation

cumene hydroperoxide

voltammetry

antioxidant activity

radical scavenging

ABSTRACT

The cumene hydroperoxide oxidation on glassy carbon electrodes involves an irreversible one-electron transfer to peroxide and phenoxy radicals, being the main end products hydroquinone and acetone. The overall oxidation mechanism occurs in two steps: formation of acetone and a phenoxy radical, and the reaction of this phenoxy radical with water, getting stability by oxidizing into p-benzoquinone. The interaction of such radicals with ascorbic and gallic acids decreases the oxidation signal of cumene hydroperoxide in differential pulse voltammetry. This decrease, due to the scavenging of the radicals formed after the electron transfer, is related to the antioxidant activities. So, it is possible to substitute the mercury as a probe for the electrochemical determination of antioxidant activity.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Antioxidants can be primary, if they block the generation of free radicals [1], secondary, if they repress the propagation of radicals, hinder the production of ROS (reactive oxygen species), and impede the activation of carcinogens in the metabolism [2,3], and tertiary, when they repair the harm produced by free radicals or when they wipe out damaged molecules [4,5].

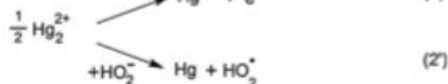
The antioxidant activity of natural products can be assessed by means of different methods, both direct and indirect [6]. Among these methods, electrochemical measurements have been proposed as a short-time assay for checking the antioxidant character of many organics [7,8]. In this way, cyclic voltammetry was used with phenolic acids, flavonoids, cinnamic acids etc [9–11], their oxidation potentials being compared to evaluate the differences in their antioxidant activities. The aptitude of a molecule to donate electrons is related to its antioxidant character and also to low oxidation potentials, which sequence of values are well correlated with the order in antioxidant activity measured by non-electrochemical techniques as the DPPH[•] radical scavenging [12]. Mostly of these experiments were performed on glassy carbon electrodes.

In another approach, the antioxidant character of components of foods was primarily determined using the anodic oxidation

reaction of hydrogen peroxide on mercury by polarographic [13–17] and voltammetric (differential pulse) [18] techniques. Polarographic criteria for the determination of antioxidant capacity have been developed [19–22].

Differential Pulse Voltammetry of hydrogen peroxide solutions on mercury electrodes was used to determine the activity of secondary antioxidants (radical scavengers) [18,23]. In this case, mercury is oxidized to Hg(I) and Hg(II) ions with the formation of traces of hydroperoxide radical, which interacts with the radical scavengers in diverse extent due to the different nature of the molecular reactivity. So, the scavenging activity of each antioxidant can be related to the concentration making the area of the DPV peak decrease in a 10%. This was also extended to mixes of compounds with scavenging activity and to extracts of several condiments.

The method is based in the following oxidation pathways [23]:



* Corresponding author.

E-mail addresses: jmrodriguez@uco.es (J.M.R. Mellado), mmayen@uco.es (M. Mayén).

In such scheme AO represents the antioxidant; in its absence, only traces of Hg(I) reacts via reaction 2'. After the addition of AO, the hydroperoxy radical produced in reaction 2' is scavenged and this reaction decreases the concentration of the Hg(I) ion which give Hg(II) ion through reaction 2. Thus, less electrons are involved in the overall process and the overall oxidation current decreases. The subsequent DPV peak lowering as the antioxidant concentration increases has a lower limit: just a 50% of the area that was measured in the absence of AO. Intermediate values (from 10% to 50%) can be easily related to the antioxidant activity.

Cumene hydroperoxide is a colorless to pale yellow liquid used mainly in the production of acetone and phenol [24–26]. It is a strong free radical source and, consequently, a catalyst for rapid polymerization, in particular with redox systems, a curing agent for unsaturated polyester resins, an initiator for polymerization of styrene and acrylic monomers and, finally, a chemical intermediate for dicumyl peroxide [27]. When it is heated or exposed to the light, it can originate fire, or even explode, due to its very fast decomposition.

The aim of this paper was, first, to propose an oxidation scheme for cumene hydroperoxide in aqueous solutions and, second, to show that this process can substitute hydrogen peroxide as electrochemical probe of antioxidant activity, using inert electrodes as GCE replacing the mercury electrodes.

2. Experimental

2.1. Materials

Cumene hydroperoxide (CHP), Ascorbic acid, Gallic acid and Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) were from Sigma-Aldrich. CHP, 80%, was of technical grade. All the other reagents used were at least of analytical quality. The rest of reagents used were from Merck. All chemicals were used without further purification.

Supporting electrolytes were solutions of acetic and phosphoric acids, for pH < 8.5, or phosphoric and boric acids, for pH > 8.5, with concentrations of 0.1 mol·L⁻¹ in each component. Ultrapure water type 1 (resistivity 18.2 MΩ·cm at 25 °C) obtained from a Millipore-Milli Q system was used. The ionic strength was adjusted to 0.5 M with solid KNO₃ and the pH was adjusted with solid NaOH. Stock solutions were stored in darkness at 277 K to avoid decomposition.

2.2. Electrochemical measurements

A CHI650A electrochemical workstation from JKCambria was used for the electrochemical measurements. The glassy carbon electrode (GCE) was from JKCambria (area = 7.5 mm²). The reference electrode was a Metrohm 6.0733.100 Ag | AgCl | KCl (3 m) and the auxiliary electrode was a platinum rod. Solutions were purged with purified nitrogen for at least 10 min to eliminate the oxygen that could originate undesired redox reactions on the electrode. The parameters selected in differential pulse voltammetry (DPV) were: pulse amplitude 0.05 V, pulse width 0.05 s and pulse period 0.2 s.

2.3. Electrode conditioning

Before each experiment, the glassy carbon electrode was polished with silicon carbide paper, followed by a diamond (0.25 μm) slurry and alumina (0.3 and 0.05 μm) slurries. Residual polishing was removed from the surface by the sonication of the electrode in a water bath for 30 minutes. After rinsed with distilled water thoroughly, it was applied a potential of +1.7 V under stirring in 0.2 M phosphate solution of pH 4.7 for 300 s, and then the

electrode was scanned between +0.2 and +1.5 V at 0.1 V/s until a steady-state current-voltage curve was obtained.

The concentration of cumene hydroperoxide in the cell was 1·10⁻³ M and the temperature was kept at 298 K. The reproducibility of the measurements was ensured by repeating the experiments and the standard deviations of the data were less than 5%.

3. Results and discussion

To cover the goal of using the cumene hydroperoxide oxidation for checking antioxidant activities, it is necessary to assess the production of free radicals in the electrode process. As far as the authors know, the electrooxidation process of CHP has not been examined in the literature. For this reason, the first work done was an electrochemical characterization of such process.

The cyclic voltammograms of CHP uniquely present one oxidation peak in the whole pH range studied as is shown in Fig. 1. In this figure the voltammograms recorded at very acidic pH values are not represented to avoid confusion caused by the great number of curves. The absence of reduction peaks at potentials near the oxidation peak indicates that the overall process is irreversible.

In the whole pH range studied, 1.0–12.3, the peak potential shifted towards less positive values in a roughly linear manner, with a slope of -125 mV per pH unit. The acid-base dissociation reaction of CHP has a value of 12.6 [28], this meaning that the undissociated CHP is the form present in the solution. So, it is clear that the pH-dependence of the voltammetric peak is due to this acid dissociation reaction preceding the oxidation reaction.

In addition, at constant pH, the peak potential is independent of the CHP concentration. The peak intensity is independent of the pH, and below CHP concentrations of 2·10⁻³ M, the current is proportional to the CHP concentration.

All the above data indicate that the electrochemical process is of first-order with respect to CHP, consisting of an irreversible one-electron transfer preceded by the dissociation of an H⁺ ion and followed by the rest of chemical-electrochemical reactions to give the oxidation products.

Finally, the current function $I_p/v^{1/2}$ is independent of $v^{1/2}$ at low scan rates, this meaning that adsorption processes, if they exist, are weak or inexistent.

As stated in the introduction section, the end products of the acid-catalyzed decomposition of CHP are phenol and acetone.

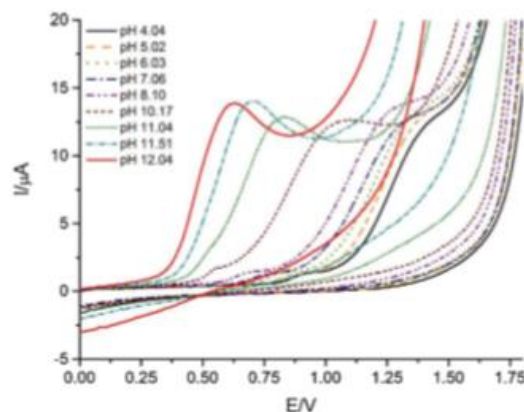


Fig. 1. Cyclic voltammograms of 1·10⁻³ M cumene hydroperoxide at different pH values.

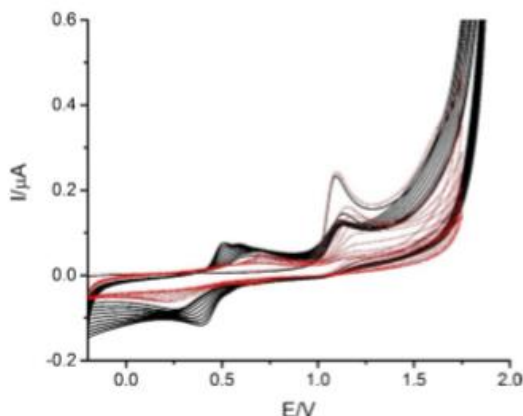


Fig. 2. Repetitive scans cyclic voltammograms of $1 \cdot 10^{-3}$ M cumene hydroperoxide at pH = 2.0 and top potentials 1.75 V (red dotted line) and 1.90 V (black continuous line) (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Acetone is electrochemically inert in the conditions of the experiments here presented (in fact it is habitually used as co-solvent to solubilize apolar depolarizers) but phenol is oxidized on the glassy carbon electrodes to form phenoxy radical as intermediate and giving mainly p-benzoquinone [29]. This compound is stable in solution and presents in cyclic voltammetry a reversible couple of peaks at potentials lower than those corresponding to the oxidation of CHP [30]. For this reason, experiments were made in cyclic voltammetry by applying multiple scans as is shown in Fig. 2. As can be seen, when the switching potential is high enough, a reversible couple of peaks appears in the zone of potentials corresponding to p-benzoquinone oxidation-reduction [30], as is expected if phenol, the plausible end product of the oxidation of CHP, is oxidized at these potentials.

Next, the following experiments were made: it was applied a constant potential placed at much more positive values than the potential of the oxidation peak of CHP, by varying the time of electrolysis. Then, the electrode was removed from the CHP

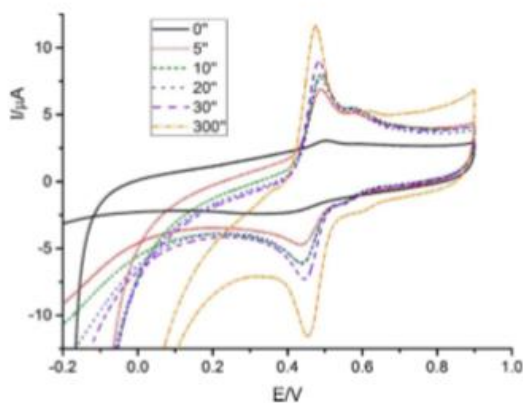
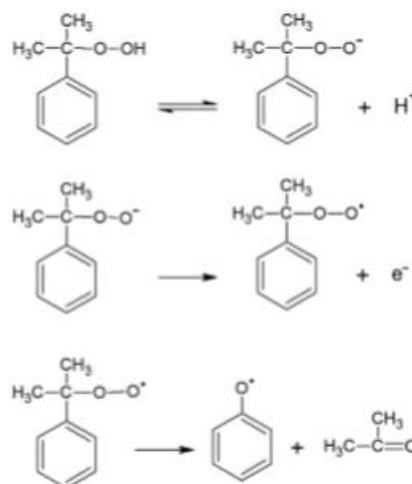


Fig. 3. Deposition of $1 \cdot 10^{-3}$ M cumene hydroperoxide at pH = 7.0 at 1.25 V on the GCE. Cyclic voltammograms of the electrode in a CHP-free buffer solution in the same conditions. In the figure are gathered the deposition times.

solution, immersed into a buffer solution in the absence of CHP, and a cyclic voltammogram was recorded in the zone of potentials corresponding to p-benzoquinone oxidation-reduction. The results are shown in Fig. 3 and, as it can be seen, a nearly reversible cyclic voltammogram is obtained corresponding to a redox couple. The voltammetric peaks corresponding to the redox couple increased as the electrolysis time was increased, and reached constant values above c.a. 150–200 s. These peaks have the characteristics of the redox couple corresponding to p-benzoquinone oxidation-reduction, this indicating that this is the product of the electrolysis at these very positive potentials.

Taking into account all the above results and conclusions, the first steps of the oxidation process must be those following:



After a second one-electron transfer, the phenoxy radical forms phenoxonium ion that reacts with water giving hydroquinone, which is finally oxidized to p-benzoquinone [29].

Cumyl peroxy radical shown in the above scheme was proposed to be formed in the chemical oxidation of CHP in the presence of manganese dioxide [31].

So, in the electrochemical oxidation of CHP on glassy carbon electrodes, very reactive free radicals are produced, able to interact with antioxidants.

To check this conclusion, experiments were made in the presence of an antioxidant as is the ascorbic acid. Fig. 4A shows the cyclic voltammograms of CHP in the absence and the presence of increasing concentrations of ascorbic acid (AA). As it can be seen, the oxidation of AA takes place at lower potentials than those corresponding to CHP. This means that the effect of the presence of AA on the CHP voltammogram is very difficult to be quantified. Nevertheless, this can be made by using the differential pulse voltammetry [22], because the oxidation potentials of both AA and CHP are different enough. This is shown in Fig. 4B. In this case, the differential pulse voltammograms in the presence of AA decrease in intensity with respect to that recorded for CHP alone. This decrease is related to the antioxidant activity of AA. This antioxidant reacts with the radicals generated in the electrochemical oxidation of CHP, namely peroxide radical and phenoxy radical, diminishing their concentrations and consequently decreasing the intensity of the signal [23]. As the antioxidant activity is greater, this decrease is higher. In the case of AA, the peak intensity of the differential pulse voltammogram decreases a 10% when the AA concentration is c.a. $7.9 \cdot 10^{-3}$ mol·dm⁻³.

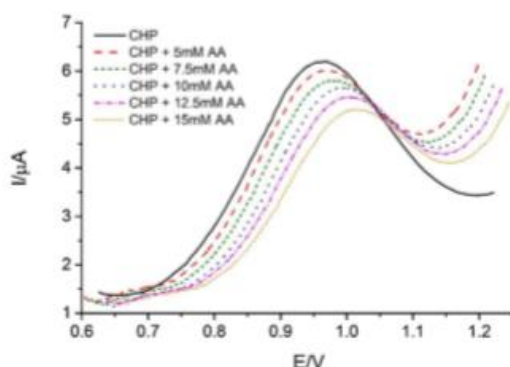
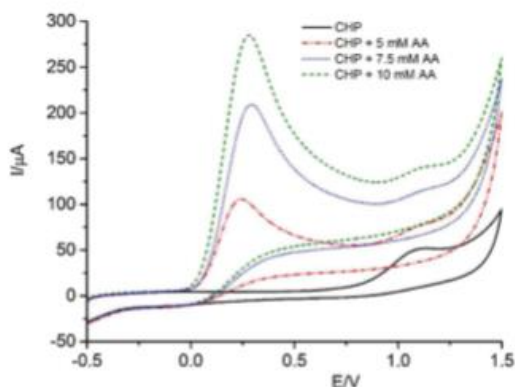


Fig. 4. $1 \cdot 10^{-3}$ M cumene hydroperoxide at pH=7.0 in the presence of different concentrations of ascorbic acid, AA. (A:up) Cyclic voltammograms. (B:down) Differential pulse voltammograms

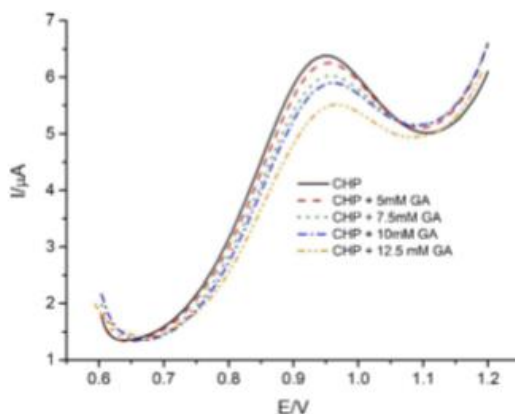


Fig. 5. Differential pulse voltammograms of $1 \cdot 10^{-3}$ M cumene hydroperoxide at pH=7.0 in the presence of different concentrations of gallic acid, GA.

Table 1
Antioxidant activities of AA and GA by different techniques. TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity assay; FRAP: Ferric reducing ability of plasma assay; DMPD: N, N-dimethyl-p-phenylenediamine assay; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay; ORAC: Oxygen Radical Antioxidant Capacity; HOCl: Hypochlorous Acid Scavenging Activities; CUPRAC: Cupric Reducing Antioxidant Capacity.

Antioxidant	Reference	TEAC	FRAP	DMPD	DPPH	ORAC	HOCl	CUPRAC
Ascorbic Acid	[32]	1.06	1.01 [†]	8.9 [†]	1.1 [†]			
	[33]	1.42	1.18				0.77	
	[34]	1.03						0.96
	[35]	0.61 [†]				0.27 [†]		
	[36]	0.92	0.77		0.91			1.09
	[37]	1.02						0.96
Gallic Acid	[32]	2.24	2.33 [†]	2.9 [†]	1.9 [†]			
	[33]	3.62	2.75				0.50	
	[34]	3.48						2.62
	[35]	0.30 [†]				0.21 [†]		
	[36]	2.06	2.54		1.46			2.25
	[37]	2.14						2.62

[†] Data extracted from the graphics.

[†] Calculated from original data.

Fig. 5 shows the results obtained for additions of gallic acid, GA. It can be appreciated that there is again a decrease of the differential pulse voltammogram intensity, more accused at higher concentrations. In this case, the decrease of 10% in intensity is reached at c.a. $10.5 \cdot 10^{-3}$ mol·dm⁻³, this indicating that the oxidant activity of GA is lower than shown by AA [22].

Preliminary experiments with trolox (50% ethanol in the medium to solubilize it) showed that the interference with the CHP signal is greater than the two above cases. Nevertheless, from the concentration of trolox that decreases the DP peak in a 10% (around $9.3 \cdot 10^{-3}$ mol·dm⁻³) values of c.a. 1.18, for AA, and 0.89, for GA, are calculated in trolox equivalent. These values are comparable with those reported in the literature obtained by different methods. Table 1 summarizes some of these values.

Finally, experiences were made with fresh orange juice and a value of 354 μM trolox equivalent was obtained, consistent with the higher value reported for commercial ready-to-drink orange juice and nectar [38]. In this case, the CHP concentration was decreased five times because the low value of antioxidant activity obtained.

4. Conclusions

The results here shown indicate that it is possible to substitute the mercury as a probe for the electrochemical determination of antioxidant activity. Since hydrogen peroxide is oxidized on mercury electrodes at very low potentials, interferences with the electrochemical oxidation of antioxidants are negligible [19,23]. In the case of CHP, the oxidation signal of the antioxidant to be tested must necessarily be at least 100 mV less positive than that of the CHP itself, to avoid overlapping, this being a restriction with respect to the use of the mercury-H₂O₂ system.

On the other hand, the advantage of this approach over other electrochemical measurements [9–11] is that the magnitude measured (the decrease of the differential pulse voltammogram intensity) corresponds to all the antioxidants present in a given mixture [23] and can assess the antioxidant activity of natural samples.

Acknowledgements

Financial support from Córdoba University within the framework of the "Ayudas puente para el desarrollo de proyectos de I+D precompetitivos 2015"

References

- [1] J.M. Gutteridge, B. Halliwell, Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899 (2000) 136.
- [2] H. Mukhtar, N. Ahmad, Green tea in chemoprevention of cancer, *Toxicol. Sci.* 52 (1999) 111.
- [3] F. Visioli, C. Galli, Free radical-scavenging actions of olive oil phenolics, *Lipids* 34 (1999) 5315.
- [4] D.E. Brash, P.A. Hawre, New careers for antioxidants, *PNAS* 99 (2002) 13969.
- [5] E.D. Owuor, A.T. Kong, Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways, *Biochem. Pharm.* 64 (2002) 760.
- [6] M. Antolovich, P.D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards, Methods for testing antioxidant activity, *Analyst* 127 (2002) 183.
- [7] M.E. Ortiz, L.J. Núñez-Vergara, J.A. Squeña, Relative reactivity of dihydropyridine derivatives to electrogenerated superoxide ion in DMSO solutions: a voltammetric approach, *Pharm. Research* 20 (2003) 292.
- [8] M.E. Ortiz, L.J. Núñez-Vergara, C. Camargo, J.A. Squeña, Oxidation of Hantzsch 1,4-dihydropyridines of pharmacological significance by electrogenerated superoxide, *Pharm. Research* 21 (2004) 428.
- [9] R. Bortolomeazzi, N. Sebastianutto, R. Toniolo, A. Pizzariello, Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential, *Food Chem.* 100 (2007) 1481.
- [10] P.A. Kilmartin, H.L. Zou, A.L. Waterhouse, Correlation of wine phenolic composition versus cyclic voltammetry response, *Am. J. Enol. Vitic.* 53 (2002) 294.
- [11] P.A. Kilmartin, H.L. Zou, A.L. Waterhouse, A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 1957.
- [12] J.F. Arteaga, M. Ruiz Montoya, A. Palma, G. Alonso Garrido, S. Pintado, J.M. Rodríguez Mellado, Comparison of the Simple Cyclic Voltammetry (CV) and DPPH Assays for the Determination of Antioxidant Capacity of Active Principles, *Molecules* 17 (2012) 5126.
- [13] D.Z. Sužnjević, E.T. Pastor, S.Z. Gorjanović, Polarographic study of hydrogen peroxide anodic current and its application to antioxidant activity determination, *Talanta* 85 (2011) 1398.
- [14] S.Z. Gorjanović, M.M. Novaković, N.I. Potkonjak, I. Leskošek-Čukalović, D.Z. I. Sužnjević, Application of a Novel Antioxidative Assay in Beer Analysis and Brewing Process Monitoring, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 744.
- [15] S.Z. Gorjanović, M.M. Novaković, N.I. Potkonjak, D.Z. I. Sužnjević, Antioxidant Activity of Wines Determined by a Polarographic Assay Based on Hydrogen Peroxide Scavenge, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 4626.
- [16] S.Z. Gorjanović, M.M. Novaković, P.V. Vikosavjević, E.T. Pastor, V.V. Tešević, D.Z. I. Sužnjević, Polarographic Assay Based on Hydrogen Peroxide Scavenging in Determination of Antioxidant Activity of Strong Alcohol Beverages, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 8400.
- [17] M.M. Novaković, S.M. Stevanović, S.Z. Gorjanović, P.M. Jovanović, V.V. Tešević, M.A. Janković, D.Z. Sužnjević, Changes of Hydrogen Peroxide and Radical-Scavenging Activity of Raspberry during Osmotic, Convective, and Freeze-Drying, *J. Food Sci.* 76 (2011) C663.
- [18] A. Palma, M. Ruiz Montoya, J.F. Arteaga, J.M. Rodríguez Mellado, Analysis of the Interaction of Radical Scavengers with ROS Electrogenerated from Hydrogen Peroxide, *J. Electrochem. Soc.* 160 (2013) H213.
- [19] N.I. Potkonjak, D.S. Veselinović, M.M. Novaković, S. Gorjanović, L. Pezo, D. Sužnjević, Antioxidant activity of propolis extracts from Serbia: A polarographic approach, *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 3614.
- [20] S. Gorjanović, D. Komes, E.T. Pastor, A. Belščak-Cvitanović, L. Pezo, I. Hečimović, D.Z. Sužnjević, Antioxidant Capacity of Teas and Herbal Infusions: Polarographic Assessment, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 9573.
- [21] S. Gorjanović, J.M. Alvarez-Suarez, M.M. Novaković, E.T. Pastor, L. Pezo, M. Battino, D.Z. Sužnjević, Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays, *J. Food Compos. Anal.* 30 (2013) 13.
- [22] A.J. Blasco, A. González Crevillén, M.C. González, A. Escarpa, Direct Electrochemical Sensing and Detection of Natural Antioxidants and Antioxidant Capacity in Vitro Systems, *Electroanalysis* 19 (22) (2007) 2275.
- [23] A. Palma, M. Ruiz Montoya, J.F. Arteaga, J.M. Rodríguez Mellado, Determination of Antioxidant Activity of Spices and Their Active Principles by Differential Pulse Voltammetry, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 582.
- [24] J. Vodnár, Decomposition of organic hydroperoxides on cation exchangers, III decomposition mechanism of cumene hydroperoxide, *React. Kinet. Catal. Lett.* 10 (3) (1979) 237.
- [25] R.J. Lewis, *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*, New York: Van Nostrand Reinhold Co. (1993) 329.
- [26] D.H.R. Barton, N.C. Delanghe, New catalysts for the conversion of cumene hydroperoxide into phenol, *Tetrahedron Lett* 38 (1997) 6351.
- [27] S.R. Sandler, W. Karo, 2nd edition, *Polymer Syntheses*, Vol. 1, Academic Press Ltd., London, 1992, pp. 349.
- [28] *Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry*, John Wiley and Sons, NJ (2005) 38.
- [29] M. Gattrell, D.W. Kirk, The Electrochemical Oxidation of Aqueous Phenol at Glassy Carbon Electrode, *Can. J. Chem. Eng.* 68 (1990) 997.
- [30] R. Estévez Brito, J.M. Rodríguez Mellado, P. Maldonado, M. Ruiz Montoya, A. Palma, E. Morales, Elucidation of the electrochemical oxidation mechanism of the antioxidant sesamol on a glassy carbon electrode, *J. Electrochem. Soc.* 161 (5) (2014) G27.
- [31] S. Fukuzumi, Y. Ono, Decay Kinetics of Cumylperoxyl Radical produced by the Decomposition of Cumene Hydroperoxide, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (1977) 622.
- [32] K. Schlesier, M. Harwat, V. Böhm, R. Bitsch, Assessment of Antioxidant Activity by Using Different in Vitro Methods, *Free Radical Res* 36 (2) (2002) 177.
- [33] M.A. Soobrattee, V.S. Neerghen, A. Luximon-Ramma, O.I. Arouma, T. Bahorum, Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions, *Mutat. Res. -Rev. Mutat.* 579 (2005) 200.
- [34] R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, S.E. Çelik, Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay, *Microchim. Acta* 160 (2008) 413.
- [35] A. Zulueta, M.J. Esteve, A. Frígola, ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products, *Food Chem* 114 (2009) 310.
- [36] C. Campos, R. Guzmán, E. López-Fernández, Á. Casado, Evaluation of the copper (II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: The CUPRAC–BCS assay, *Analytical Biochemistry* 392 (2009) 37.
- [37] S.E. Çelik, M. Özyürek, K. Güçlü, R. Apak, Differences in responsivity of original cupric reducing antioxidant capacity and cupric–bathocuproine sulfonate assays to antioxidant compounds, *Anal. Biochem.* 423 (2012) 36.
- [38] S.P. Stella, A.C. Ferrarezi, K.O. dos Santos, M. Monteiro, Antioxidant activity of commercial ready-to-drink orange juice and nectar, *J. Food Sci.* 76 (2011) C392.

ELECTROCHEMICAL STUDIES OF DIETARY ANTIOXIDANTS AND ANALOGUES: MECHANISMS OF OXIDATION AND ANTIOXIDANT CAPACITY

R. Estévez Brito^{*1}

1 Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada. CEIA3, Campus Universitario de Rabanales, edificio Marie Curie. Universidad de Córdoba. E-14014-Córdoba, Spain, email: r12esbr@uco.es

ABSTRACT

In the actuality, there is a great interest in natural and synthetic antioxidants used as food additives. In the official list of seasonings and spices are of special interest dietary antioxidants to prevent inflammatory lesions, nutritional deficiencies, autoimmune diseases, Parkinson, myocardial infarction, neurodegeneration, aging, neoplasms, atherosclerosis, and diabetes, all of them related to the production of free radicals, important in physiological reactions but that may also act as harmful compounds. To establish the formulations of natural or synthetic food additive for spices and condiments with the benefits of antioxidants, reliable methods are needed to measure the antioxidant activity. It is essential for the understanding of the mechanisms of oxidation-reduction of essential compounds of these formulations.

Direct electrochemical measurements are a quick test of antioxidant capacity [1]. Cyclic voltammetry was used to compare the antioxidant power of phenolic acids, flavonoids, cinnamic acid, etc. [2]. The low oxidation potentials, are characteristic of high antioxidant activity, and there is a good correlation with the DPPH^{*} [3] assay. The oxidation of hydrogen peroxide on mercury electrodes, has also been used to determine the antioxidant capacity of phenolic compounds in wines, high alcohol drinks and beers [4].

In this thesis, will be held the electrochemical immobilization adenosine and guanosine nucleosides on carbon electrodes to develop stable bio- recognition layers for the voltammetric detection of the antioxidant capacity of various compounds. Special attention to the study of the influence of experimental conditions on the frozen layer, besides the electrooxidation of purines is provided. Such variables are: the concentration of the immobilized compound, the deposition time, the pH and the potential applied to the deposition of the purine on the carbon electrode. After this, we studied the mechanisms of oxidation and determining the product of the electrochemical oxidation of sesamol [5] and related substances with antioxidant activity. In addition we continue the study of the mechanisms of oxidation of sesamol analogues and other antioxidants to find a molecular explanation for their activity. Among the antioxidants studied currently there are dihidroxibenzaldehidos and coumarins.

ADVISERS/MENTORS: J.M. Rodríguez Mellado¹ (Phone: 957218647, email: jmrodriguez@uco.es.) and M. Ruiz Montoya (Departamento de Ingeniería Química, Química Física y Química Orgánica. Centro de Investigación en Tecnología de Productos y Procesos Químicos. Campus de 'El Carmen'. Universidad de Huelva.E-21071-Huelva, Spain, Phone: 959218202, email: mmontoya@diq.uhu.es).

ACKNOWLEDGMENTS: Financial supports from FEDER, Junta de Andalucía (Research Group FQM-0198) and Spanish Government (Project CTQ2011-28973) are gratefully acknowledged.

REFERENCES

- [1] P.A. Kilmartin, Z. Honglei, A. L. Waterhouse, *Am. J. Enol. Vitic.*, 53, 294, 2002.
- [2] M.A. Samra, V.S. Chedea, A. Economou, A. Calokerinos, P. Kefalas, *Food Chem.*, 125, 622, 2011.
- [3] J.F. Arteaga, M. Ruiz Montoya, A. Palma, G. Alonso Garrido, S. Pintado, J. M. Rodríguez Mellado, *Molecules*, 17, 5126, 2012.
- [4] M.M. Novaković, S.M. Stevanović, S.Ž. Gorjanović, P.M. Jovanovic, V.V. Tešević, M.A. Janković, D.Ž. Sužnjević, *J. Food Sci.*, 76, C663, 2011.
- [5] R. Estévez Brito, J.M. Rodríguez Mellado, P. Maldonado, M. Ruiz Montoya, A. Palma, E. Morales, *J. Electrochem. Soc.*, 161, G27-G32, 2014.

SENSORS FOR ANTIOXIDANT ACTIVITY BASED ON THE IMMOBILIZATION OF ADENOSINE AND GUANOSINE ON GLASSY-CARBON AND CARBON PASTE ELECTRODES

R. Estévez Brito*, S. Pintado, L. Gómez, J.M. Rodríguez Mellado

Departamento de Química Física y T. A. CEIA3, Campus Universitario de Rabanales, edificio Marie Curie. Universidad de Córdoba. E-14014-Córdoba, Spain, Phone: 957218618, email: q12esbrr@uco.es, q02pibes@uco.es, q52gocal@uco.es, jmrodriguez@uco.es.

ABSTRACT

A sensor able to evaluate the antioxidant activity, was developed by immobilizing adenosine and guanosine nucleosides on carbon electrodes. The experimental variables were optimized for both nucleosides and two carbon electrodes (glassy carbon, GCE, and carbon paste, CPE), showing small differences due mainly to the surface of the CPE that is greater than the GCE.

For the optimization of the process, the deposition of the nucleosides was made by applying a constant potential, E_d , during a given deposition time, t_d , with the clean and activated carbon electrode immersed in a solution containing the nucleoside and the buffer solution. Then the modified electrode was extracted from the solution, washed gently with deionized water and introduced into a solution containing only the background solution at the same pH. Linear-sweep cyclic voltammetry (LSCV or simply CV) was used to investigate the amount of nucleoside deposited onto the electrode surface. The effect of the simultaneous immobilization of both nucleosides was also studied.

The sensor was validated using Fenton reagent in the absence and presence of ascorbic acid as antioxidant. It was observed that the antioxidant protects the nucleoside immobilized on the electrode surface from the oxidizing action of Fenton's reagent.

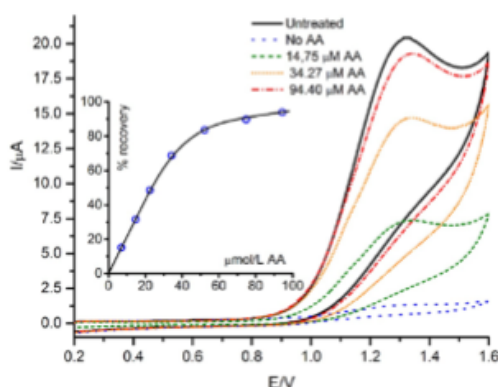


Fig. 1. Cyclic voltammograms recorded at $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ on the GCE, after deposition in the optimal conditions. The voltammogram of the adsorbed layer of guanosine (curve labeled "untreated") is shown together those corresponding to an incubation of 180 s in the presence of Fenton reagent, and variable doses of ascorbic acid (AA). Inset: percent of recovery vs. ascorbic acid concentration.

ACKNOWLEDGMENTS: Financial supports from FEDER, Junta de Andalucía (Research Group FQM-0198) and Spanish Government (Project CTQ2011-28973) are gratefully acknowledged.

ON THE ELECTROCHEMICAL OXIDATION MECHANISM OF SESAMOL ON A GLASSY CARBON ELECTRODE

R. Estévez Brito¹, J.M. Rodríguez Mellado^{*1}, P. Maldonado², M. Ruiz Montoya³, A. Palma³, E. Morales⁴

¹ Departamento de Química Física y T. A. CEIA3, Campus Universitario de Rabanales, edificio Marie Curie. Universidad de Córdoba. E-14014-Córdoba, Spain Phone: 957218647, email: jmrodriguez@uco.es, r12esbr@uco.es

² Institute of Chemical Research of Catalonia (ICIQ). Av. Paisos Catalans 16. E-43007 Tarragona, Spain, Phone: 977920900, email: pmaldonado@iciq.es.

³ Departamento de Ingeniería Química, Química Física y Química Orgánica. Centro de Investigación en Tecnología de Productos y Procesos Químicos (Pro2TecS). Campus de 'El Carmen'. Universidad de Huelva, E-21071-Huelva, Spain, Phone: 959218202, email: mmontoya@diq.uhu.es, alberto.palma@diq.uhu.es

⁴ Departamento de Química y Ciencia de los Materiales. Facultad de Ciencias Experimentales. CeIA3, Campus de "El Carmen". Universidad de Huelva. E-21071-Huelva, Spain, Phone: 959219959, email: albornoz@uhu.es

ABSTRACT

The dissociation constant of Sesamol (5-hydroxy-1,3-benzodioxol) was determined from the dependence of the UV-visible spectra with the medium acidity. A pK value of 10.1 ± 0.1 , corresponding to the hydroxyl group, was obtained [1].

The oxidation of sesamol was investigated on carbon electrodes using controlled-potential electrolysis, linear-sweep cyclic voltammetry and measurements at the foot of the first oxidation peak. Up to three oxidation peaks and one reduction peak were found. The dioxol ring of the dissociated sesamol undergoes a cleavage to give 3-substituted 1,4-benzoquinone, being the rate-determining step the second electron transfer. The formation of radicals in the ring cleavage explains in part the ability of sesamol to interact with reactive oxygen species (ROS).

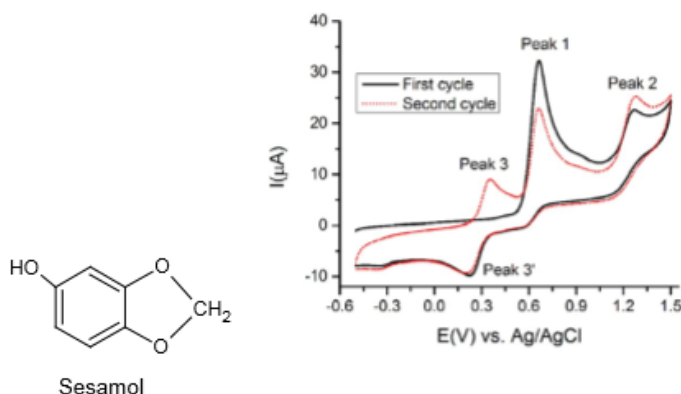


Fig 1. Linear-sweep cyclic voltammograms of $1 \cdot 10^{-5}$ M sesamol at a $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ and $\text{pH}=1.74$

ACKNOWLEDGMENTS: Financial supports from FEDER, Junta de Andalucía (Research Group FQM-0198) and Spanish Government (Project CTQ2011-28973) are gratefully acknowledged.

REFERENCES

- [1] R. Estévez Brito, J.M. Rodríguez Mellado, P. Maldonado, M. Ruiz Montoya, A. Palma, E. Morales, J. Electrochem. Soc. 161, G27-G32, 2014.

Contribution to the elucidation of the oxidation mechanism of gentisaldehyde on glassy carbon electrodes

R. Estévez Brito^a, J.M. Rodríguez Mellado^{b,*}, A. Palma^c, M. Ruiz-Montoya^c

Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada. CEIA3, Campus Universitario de Rabanales, edificio Marie Curie. Universidad de Córdoba. E-14014 Córdoba, Spain, ^ae-mail: q12esbrr@uco.es, ORCID: 0000-0002-8429-0740, ^bORCID: 0000-0002-7639-5040. ^cDepartamento de Ingeniería Química, Química Física y Química Orgánica. Pro2TecS, CEIA3, Campus de 'El Carmen'. Universidad de Huelva. E-21071-Huelva (Spain).

The oxidation of gentisaldehyde (2,5-Dihydroxybenzaldehyde) was investigated on carbon electrodes using controlled-potential electrolysis, linear-sweep cyclic voltammetry and measurements at the foot of the first oxidation peak. Up to three oxidation peaks and one reduction peak were found, presenting a structure similar to the 1,4-benzoquinone. The oxidation products obtained from the gentisaldehyde and the reduction product of 2,5-dihydroxybenzoic acid are different, this meaning that the oxidation product of 2,5-Dihydroxybenzaldehyde is the formyl 1,4-benzoquinone, this being responsible of the antioxidant activity of gentisaldehyde.

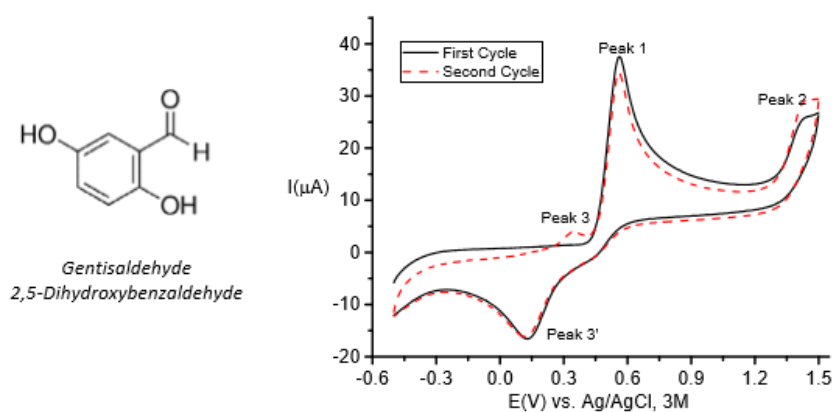


Fig 1. Linear-sweep cyclic voltammograms of $1 \cdot 10^{-3}$ M gentisaldehyde at a $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ and $\text{pH}=6.00$

KEYWORDS: cyclic voltammetry, antioxidant capacity, gentisaldehyde, benzoquinones, 2,5-Dihydroxybenzaldehyde.

Use of the oxidation signal of cumene hydroperoxide (CHP) on glassy carbon electrodes as an alternative, to assess the antioxidant capacity

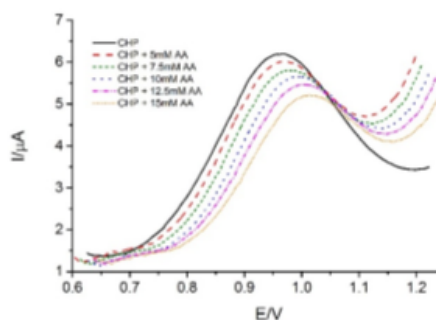
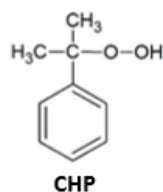
R. Estévez Brito*, J.M. Rodríguez Mellado^a, J.L. Ávila

Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada. CEIA3, Campus Universitario de Rabanales, edificio Marie Curie. Universidad de Córdoba. E-14014 Córdoba, Spain, *e-mail: q12esbr@uco.es, ORCID: 0000-0002-8429-0740, ^aORCID: 0000-0002-7639-5040

More than forty years ago, the oxidation and reduction processes originated by the hydrogen peroxide on mercury electrodes were investigated in acidic media using polarographic and galvanostatic methods¹. The anodic oxidation of mercury in the presence of hydrogen peroxide in differential pulse voltammetry give us the Reactive Oxygen Species (ROS) that we need to determine the antioxidant character of radical scavengers.²⁻⁴

It is possible to substitute the mercury as a probe for the electrochemical determination of antioxidant activity. The cumene hydroperoxide (CHP) can substitute hydrogen peroxide as electrochemical probe of antioxidant activity, using non-contaminant electrodes as glassy carbon electrodes replacing the hazardous mercury electrodes.

The cumene hydroperoxide oxidation on glassy carbon electrodes involves an irreversible one-electron transfer to peroxide and phenoxy radicals, being the main end products hydroquinone and acetone. The interaction of such radicals with ascorbic and gallic acids decreases the oxidation signal of cumene hydroperoxide in differential pulse voltammetry, being this decrease related to the antioxidant activities.



Keywords: Antioxidant activity, cumene hydroperoxide, electrochemical determination, radical scavenging, differential pulse voltammetry.

References

- [1] M. Honda, T. Kodera and H. Kita, *J. Res. Int. Catal. Hokkaido Univ.*, **1**, 19, 1970
- [2] D. Z. Suznjevic, F. T. Pastor, S. Z. Gorjanovic, *Talanta*, **85**, 1398, 2011
- [3] A. Palma, M. Ruiz Montoya, J. F. Arteaga and J. M. Rodríguez Mellado, *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 582, 2014
- [4] R. Estévez Brito, J. M. Rodríguez Mellado, A. Palma, M. Ruiz Montoya and J. F. Arteaga, *J. Electrochem. Soc.*, **161**, H854, 2014.

XXXVI

Best Poster Award

Symposium B

To

Rafael Estévez Brito

for the poster entitled

"Use of the oxidation signal of cumene hydroperoxide (CHP) on glassy carbon electrodes as an alternative to assess the antioxidant capacity"

presented at the XXXVI Meeting of the Electrochemistry Group of the Spanish Royal Society of Chemistry
and XVII Encontro Ibérico de Electroquímica
July 13-15, 2015 - Vigo (Spain)

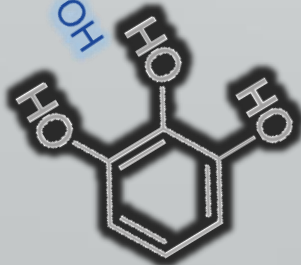
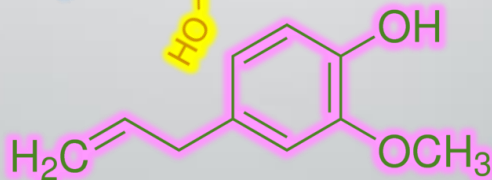
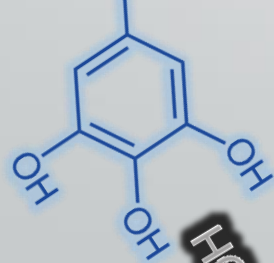
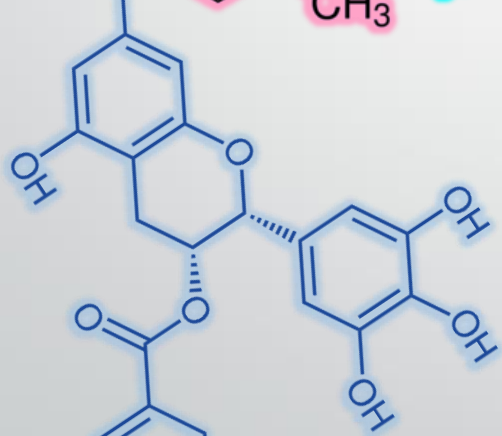
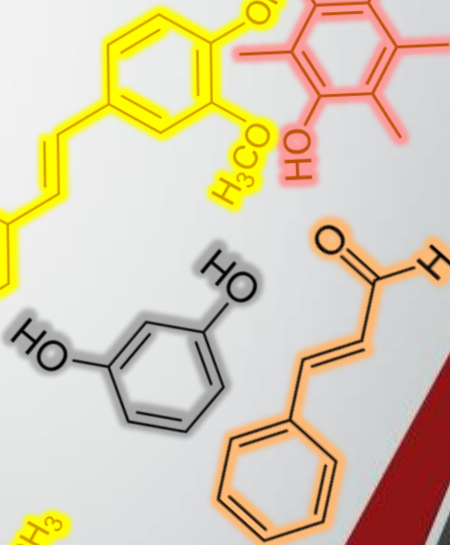
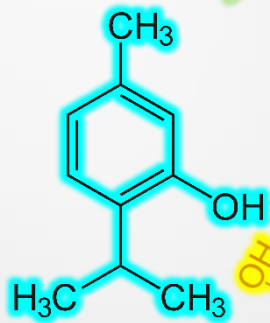
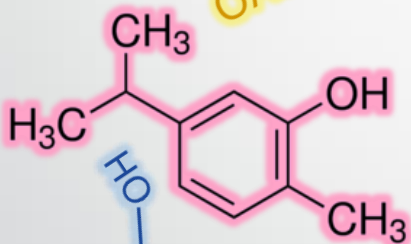
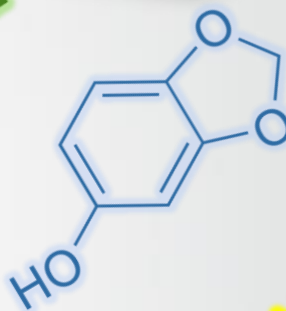
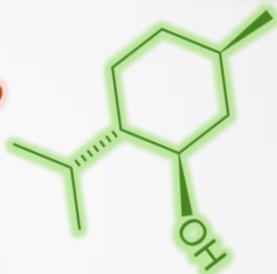
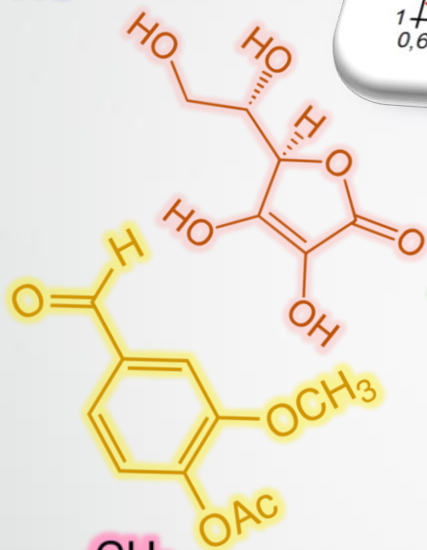
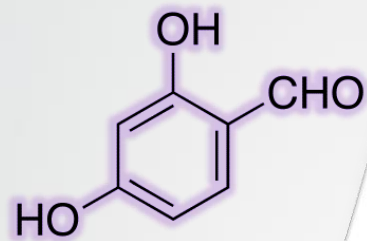


Prof. X. Ramón Nova

President of the Organising Committee

Prof. Vicente Montiel Leguey
President of the Electrochemistry group of
the Spanish Royal Society of Chemistry





UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA

