

**UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS
FACULTAD DE QUÍMICA-FARMACIA
DEPARTAMENTO DE LICENCIATURA EN CIENCIAS
FARMACÉUTICAS**



**Trabajo de Diploma en opción del Título de
Licenciado en Ciencias Farmacéuticas**

Título: Optimización del método Azul de molibdeno para la estimación del potencial antioxidante en productos naturales.

Autor: José Manuel Acosta Leiva

Tutor: Msc. Enoel Hernández Barreto

SANTA CLARA

2019

**CENTRAL UNIVERSITY “MARTA ABREU” OF LAS VILLAS
FACULTY OF CHEMISTRY-PHARMACY DEPARTMENT OF
PHARMACEUTICAL SCIENCES**



Diploma Thesis in option of the Title of
Bachelor of Pharmaceutical Sciences

Title: Optimization of the Molybdenum Blue method for
estimating the antioxidant potential in natural products.

Author: José Manuel Acosta Leiva

Tutor: Msc. Enoel Hernández Barreto

SANTA CLARA

2019

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

«Los científicos de hoy piensan en profundizar y no en esclarecer. Uno debe ser sensato para pensar con claridad, pero uno puede pensar con profundidad aún siendo un demente. »

Nikola Tesla

«La ciencia, mi muchacho, está compuesta de errores, pero son errores que es útil cometer, porque conducen poco a poco a la verdad.»

Julio Verne.

Agradezco sinceramente a:

A toda mi familia principalmente que sin ellos no hubiera sido posible

A mi novia Legna de la Caridad Martínez Ojeda por toda la paciencia y gentileza dedicada.

A todas mis amistades involucradas en el proceso de realización del presente trabajo de

diploma, agradecimientos especiales para Luis Enrique Campos, Julio Vázquez Misa,

Disnel Romero, José Ernesto González, Mario Betancourt, Erichel Gómez, Yoan Verao

Esquivel y todas aquellas que demostraron que la barrera geográfica existente no están

fuerte cuando se hacen las cosas de corazón.

A todos los profesores que de una forma u otra contribuyeron a la consolidación de mis

conocimientos a lo largo de la carrera.

Y por último pero no menos importante a mi tutor Enoel Hernández Barreto por los

consejos y conducciones oportunas.

Resumen

En la presente investigación se evaluaron los efectos de algunos factores químico-físicos sobre la formación del complejo azul de molibdeno con vistas a la optimización del conocido método Actividad Antioxidante Total, para la estimación del potencial antioxidante de productos de origen natural. Mediante la aplicación de un Diseño Factorial (3^4) se comprobó la gran influencia de la concentración de ácido y la temperatura en la formación del complejo de polioxometalato, resultando el tipo de ácido y el tiempo de incubación pocos significativos. El ácido ascórbico mostró un menor tiempo de desarrollo del color en la formación del complejo que los metabolitos de referencia empleados. El empleo de cosolventes (etanol) influyó negativamente en la cantidad de complejo formado. Debido a lo anterior las condiciones propuestas para desarrollar el método fueron: Tipo de ácido: HCl; concentración de ácido/pH de la mezcla reactiva, 0.01 N, ~ 3; temperatura de incubación: 65 °C, y tiempo de incubación: 40 min. Bajo estas condiciones experimentales el orden de potencia antioxidante para los productos evaluados fue el siguiente: pirogalol, quercetina, ácido ascórbico, ácido gálico y rutina.

Summary

In the present investigation, evaluate the effects of some chemical-physical factors on the formation of the blue molybdenum complex with a view to optimizing the known Total Antioxidant Activity method, for the synthesis of the antioxidant potential of products of natural origin. By applying a Factorial Design (3⁴) the great influence of the acid concentration and temperature on the formation of the polyoxometalate complex is verified, resulting in the type of acid and the incubation time few contaminants. Ascorbic acid showed a shorter color development time in complex formation than the reference metabolites used. The use of cosolvents (ethanol) negatively influenced the amount of complex formed. Due to the above, the conditions proposed to develop the method were: Type of acid: HCl; acid concentration / pH of the reaction mixture, 0.01 N, ~ 3; incubation temperature: 65 °C, and incubation time: 40 min. Under these experimental conditions, the order of antioxidant potency for the products evaluated was as follows: pyrogallol, quercetin, ascorbic acid, gallic acid and rutin.

Índice

Introducción:.....	1
Capítulo I. Revisión Bibliográfica.....	4
1.1 Estrés oxidativo y Especies Reactivas del Oxígeno.	4
1.1.1. Especies reactivas del oxígeno (ROS) fisiológicas	5
1.1.2. Especies reactivas del nitrógeno (ERN) fisiológicas	5
1.2 Principales dianas biológicas de los radicales libres: lípidos de membrana, proteínas y ADN.....	7
1.3. Patologías relacionadas con el estrés oxidativo	7
1.4. Antioxidantes. Mecanismos de defensa a nivel celular y extracelular	12
1.4.1. Agentes antioxidantes de alto peso molecular.....	14
1.4.2. Agentes antioxidantes de bajo peso molecular.....	15
1.5. Métodos para evaluar potencial antioxidante.....	16
1.5.1. Ensayo del DPPH	18
1.5.2. Poder reductor del Hierro.....	19
1.5.3. Actividad quelante de cationes metálicos	19
1.5.4. Método del molibdeno azul.....	20
1.6. Estabilidad de flavonoides como metabolitos naturales de interés.....	23
Capítulo II. Materiales y Métodos.....	30
2.1. Equipos y reactivos utilizados	30
2.1.1. Instrumentos y equipos	30
2.1.2. Reactivos, solventes y fármacos utilizados.....	30
2.2. Análisis Factorial	31
2.2.1. Procedimiento para obtener los valores de absorbancia de los complejos de azul de fosfomolibdeno.....	31
2.2.2. Preparación del Agente Reductor (ácido ascórbico)	32
2.2.3. Preparación de las soluciones ácidas para el Análisis Factorial.....	32
2.2.4. Métodos para preparar las soluciones de ácidos a las tres concentraciones previstas (Alta: 0.25 N, Media: 0.025 N, Baja: 0.0025 N) en el Análisis Factorial.....	32
2.2.5. Preparación de la solución de $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	34
2.2.6. Preparación de la solución de Na_2HPO_4	34
2.3. Volúmenes de la solución de HCl (1N) para obtener diferentes concentraciones de ácido en términos de normalidad	34

2.3.1. Mezcla reactiva para emplear en la determinación de la influencia de la concentración y tipo de agente reductor en la formación del complejo azul de Molibdeno	35
2.4. Estudio del empleo de cosolventes en la formación del complejo azul de molibdeno.....	36
2.5. Evaluación de la actividad antioxidante mediante el método de azul de molibdeno optimizado..	36
2.5.1. Evaluación de la actividad antioxidante del ácido ascórbico.....	36
2.5.2. Evaluación de la actividad antioxidante de la quercetina	37
2.5.3. Evaluación de la actividad antioxidante de la rutina	38
2.5.4. Evaluación de la actividad antioxidante del ácido gálico.....	38
2.5.5. Evaluación de la actividad antioxidante del pirogalol.....	39
Capítulo III. Resultados y Discusión	41
3.1. Resultados diseño experimental.....	41
3.1. Determinación de la influencia de la concentración de ácido en la formación del complejo azul de molibdeno	44
3.3. Evaluación del desarrollo del color al emplear ácido ascórbico (0.15 mM) como agente reductor y considerando el efecto de la temperatura	48
3.4. Resultados del desarrollo del color de la quercetina considerando el efecto de la temperatura ..	52
3.5. Determinación del efecto del etanol en la formación del complejo azul de molibdeno	54
3.6. Evaluación de la actividad antioxidante total de algunos metabolitos naturales	55
Conclusiones	60
Recomendaciones.....	61
Referencias bibliográficas	62
Anexos	

Introducción:

En la actualidad el estudio de las plantas medicinales y sus propiedades farmacológicas se han intensificado debido a su potencial uso como fuente de metabolitos con efectos antioxidantes beneficiosos para los organismos vivos. El conocimiento cada vez más profundo acerca del papel del estrés oxidativo en la manifestación y evolución de distintas patologías, por una parte, y el refinamiento de los métodos de identificación, determinación, extracción y purificación de bioactivos obtenidos a partir de fuentes naturales; ha conducido a un aumento significativo de las investigaciones en este campo (Hernández Barreto, 2019).

El oxígeno es una molécula imprescindible para la vida, su alta demanda en la respiración celular provoca daños nocivos a la propia célula, esto se debe a su alta reactividad y a su capacidad de generar radicales libres. A nivel celular estas especies reactivas, como son: aniones superóxido (O_2^-), radicales hidroxilos (OH^\cdot) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son producidas por el metabolismo mitocondrial, el cual se considera la génesis de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. Así mismo son generadas en los peroxisomas, en los procesos inflamatorios, en la fagocitosis, isquemia y ejercicio físico (Viada Pupo et al., 2017; Valdés Reyes et al., 2016; Cárdenas Rodríguez and Pedraza Chaverri, 2005). También su formación se ve ligada a factores exógenos intrínsecos a la acción del hombre sobre la naturaleza como son el hábito de fumar, la contaminación ambiental, el ozono, los solventes industriales, radiaciones, fármacos y pesticidas.

La generación incontrolada de estos radicales libres conlleva a un ataque a los lípidos de membrana, proteínas, enzimas y ADN causando estrés oxidativo (EO) y, en última instancia, senectud celular (Choudhury et al., 2016), por lo que deben ser contrarrestadas en un equilibrio redox adecuado, a través de los sistemas antioxidantes naturales, si la barrera antioxidante es superada las células sufrirán las consecuencias del estrés oxidativo y por consiguiente la proliferación de diversas enfermedades degenerativas como la diabetes mellitus, el cáncer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la aterosclerosis, los trastornos neurodegenerativos, el envejecimiento y

Introducción

muchas otras enfermedades inflamatorias (Bhattacharyya et al., 2014; Lawson et al., 2017).

En este contexto destaca la importancia de los antioxidantes en la procuración de una condición fisiológica ideal. Los sistemas antioxidantes naturales están regulados por diferentes mecanismos endógenos de defensa y si una vez efectuada esta protección no se eliminan adecuadamente los radicales peligrosos, entonces se recurrirá a una fuente externa portadora de antioxidantes que restablezca el equilibrio redox. Muchos de estos metabolitos naturales se encuentran en diversas fuentes vegetales, como los polifenoles, los flavonoides y los taninos condensados (Bhattacharyya et al., 2014; Viada Pupo et al., 2017). Es por eso que la determinación del potencial antioxidante en productos naturales y sintéticos ha sido estudiada constantemente debido a sus contribuciones en las ramas de la medicina, la cosmética, la agricultura, etc. Entre los principales métodos y ensayos estudiados figuran: ensayo de DPPH, poder reductor, actividad quelante de metales y fosfomolibdeno, este último constituye el material de estudio principal para la realización de este trabajo.

La estimación del potencial antioxidante de flavonoides, o productos naturales de interés, mediante el método del molibdeno azul, se realiza en condiciones de estrés que combinan, altas temperaturas, medio ácido fuerte y largos tiempos de incubación. Estas condiciones a las que se emplea el método espectrofotométrico propicia una mayor formación de productos de degradación y por consiguiente una estimación incorrecta del potencial antioxidante, que constituye el problema científico al que nos enfrentamos en la presente investigación.

La hipótesis científica que guiará nuestro trabajo parte del supuesto que: Es posible la formación del complejo azul de molibdeno bajo condiciones menos energéticas; que garantice mayor rapidez de análisis, menor coste económico y resultados más fiables.

Considerando lo anterior nos proponemos el siguiente objetivo general:

- Optimizar el método azul de molibdeno para la estimación del potencial antioxidante de metabolitos de origen natural.

Introducción

Lo que precisa del cumplimiento de los siguientes objetivos específicos:

- Determinar, mediante un Diseño Factorial (3^4), los factores más significativos que influyen en la formación del complejo azul de molibdeno.
- Determinar condiciones óptimas de trabajo para los factores más importantes.
- Estimar el potencial antioxidante de algunos metabolitos de origen natural una vez optimizado el método.

Capítulo I. Revisión Bibliográfica

1.1 Estrés oxidativo y Especies Reactivas del Oxígeno.

En la segunda mitad del siglo XX fue posible determinar especies químicas que contienen uno o más electrones que realizan su recorrido orbital de forma o manera impar, lo cual trae consigo una gran inestabilidad del equilibrio molecular que sólo se restablece cuando de sus proximidades logran sustraer el electrón requerido para constituir la indispensable paridad electrónica. A estas sustancias químicas que contienen electrones libres o impares, se les denominó radicales libres (RL). La vida de un RL es extremadamente fugaz; su agresividad y actividad destructora ocurren en fracciones de milésimas de segundo; tiempo requerido para la consecución del electrón complementario, estabilizar su carga eléctrica y con ello, dejar de ser un RL (Cárdenas Rodríguez and Pedraza Chaverri, 2005; Calderón Peña et al., 2018; Bhattacharyya et al., 2014; Viridis et al., 2011).

En los sistemas vivos se generan muchos tipos de radicales libres, siendo los más conocidos los radicales del oxígeno. Se utiliza el término Especies Reactivas del Oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS o ERO según sus siglas en español) como nombre colectivo para referirse a las especies derivadas del oxígeno incluyendo tanto los derivados radicales como los no radicales, que son agentes oxidantes y/o fácilmente convertibles en radicales (la presencia de un “.” en una especie reactiva indica que ésta posee un electrón no apareado, es decir, que es un radical). De forma análoga existen Especies Reactivas del Nitrógeno (RNS), del Cloro (RCIS) y del Bromo (RBS) (Armas González, 2010). Es preciso mencionar además que las ROS pueden ser de origen exógeno o endógeno(**figura 1**), en cuanto a generación de O^{2-} se refiere y que la acción de .NO, Fe^{2+} (promoviendo reacciones tipo Fenton), pueden dar lugar a otras más reactivas.

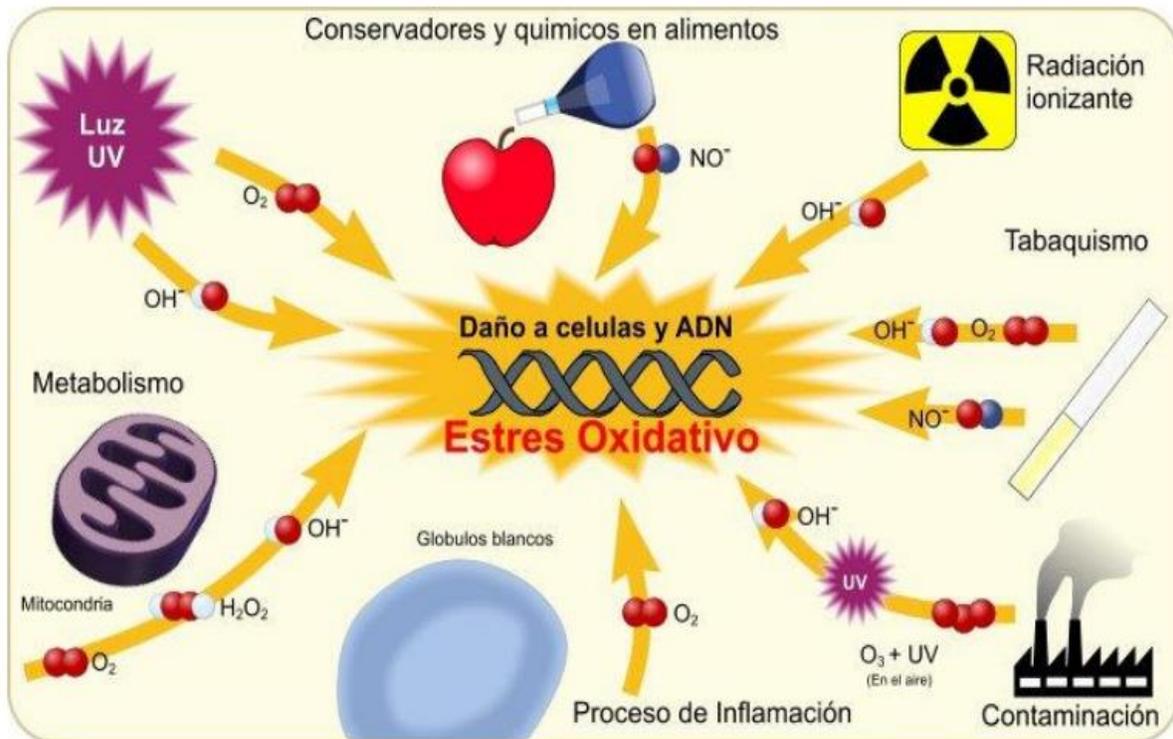


Figura 1: Fuentes endógenas y exógenas de generación de especies reactivas del oxígeno (Gutiérrez Hernández et al., 2018).

1.1.1. Especies reactivas del oxígeno (ROS) fisiológicas

Radicales: Anión superóxido (O_2^-), Hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), Alcóxilo ($\text{RO}\cdot$), Peroxilo ($\text{ROO}\cdot$)

No Radicales: Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), Ácido hipocloroso (HClO), Ozono (O_3), Oxígeno singlete ($^1\Delta\text{O}_2$) (Bhattacharyya et al., 2014).

1.1.2. Especies reactivas del nitrógeno (ERN) fisiológicas

Radicales: Óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), Dióxido de nitrógeno (NO_2)

No Radicales: Peroxinitrito (ONOO^-), Ácido nitroso (HNO_2), Cation nitrosilo (NO^+), Anión nitroxilo (NO^-), Peroxinitritos alquilo (ROONO) (Bhattacharyya et al., 2014).

La producción de las ERO está controlada por los mecanismos antioxidantes de defensa, sin embargo, este equilibrio se pierde cuando hay una excesiva producción de ERO o una deficiencia de los mecanismos antioxidantes lo que conlleva a daños a las macromoléculas biológicas más abundantes: ADN, lípidos y proteínas, este suceso es más conocido por el nombre de estrés oxidativo (**figura 2**). En términos químicos, el EO es un aumento (cada vez más negativo) en la reducción del potencial celular o una disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares como el glutatión. Los efectos del EO dependen de la magnitud de estos cambios, y de si la célula es capaz de superar las pequeñas perturbaciones y de recuperar su estado original (Bhattacharyya et al., 2014).

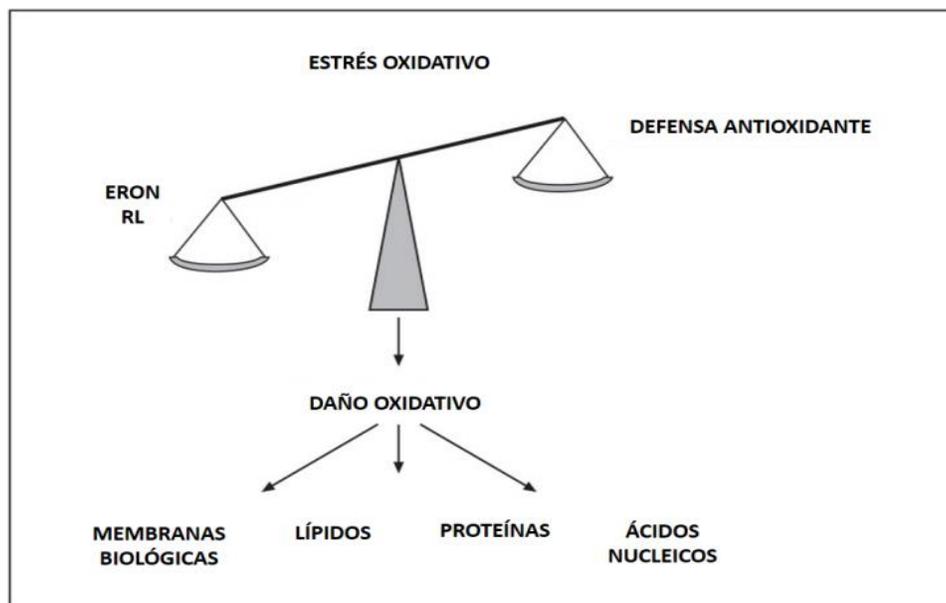


Figura 2: Aparición de daños a macromoléculas por acción del estrés oxidativo (Calderón Peña et al., 2018).

1.2 Principales dianas biológicas de los radicales libres: lípidos de membrana, proteínas y ADN

El efecto principal de las ERO sobre los lípidos es la lipoperoxidación, que se produce al contacto con los lípidos de las membrana con un agente oxidante miembro de las ERO. Esta lipoperoxidación trae como consecuencia alteraciones en la estructura de la membrana, afectando su fluidez y provocando daño en su integridad. Entre los productos formados durante la peroxidación lipídica se incluyen, entre otros, el 4-hidroxi-2-alquenal y el malonildialdehído (MDA); este último presenta una elevada capacidad de reaccionar con las bases de ADN. El daño oxidativo al ADN es de extrema importancia, debido a que las bases nitrogenadas dañadas pueden generar mutaciones que a su vez pueden resultar en carcinogénesis, apoptosis, necrosis e innumerables enfermedades hereditarias (Armas González, 2010; Dontha, 2016; González González, 2016).

Las proteínas pueden ser dañadas directa o indirectamente por el contacto con los diversos RL, principalmente $\cdot\text{OH}$, $\text{RO}\cdot$ y RNS. Estos daños incluyen peroxidación, cambios en la estructura terciaria, alteración de determinados residuos de aminoácidos e incluso fragmentación, inactivación y degradación proteica. Como consecuencia, pueden aparecer pérdidas de actividad enzimática, alteraciones de funciones celulares como la producción de energía, interferencias con la creación de potenciales de membrana y cambios en el tipo y nivel de proteínas celulares. Se ha vinculado una amplia diversidad de enfermedades con la presencia de las proteínas oxidadas, algunas de éstas son: la enfermedad de Alzheimer y la artritis (Indo et al., 2015; Pisoschi and Pop, 2015; Lawson et al., 2017; Armas González, 2010)

1.3. Patologías relacionadas con el estrés oxidativo

Durante la última década se ha dedicado considerable esfuerzo a investigar el papel de los RL en la patogenia de las enfermedades. Se piensa que el EO contribuye al desarrollo de una amplia gama de ellas, pero aún no está claro, si los oxidantes la desencadenan o si se producen como consecuencia de esta y provocan los síntomas de la enfermedad.

Investigaciones realizadas en pacientes con hipertensión arterial esencial evidencian una situación de EO, con incremento de la concentración sanguínea de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), como indicador de peroxidación lipídica y reducción de las actividades antioxidantes de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (Gpx) y la catalasa (CAT) en sangre total (Viridis et al., 2011). Así mismo, estudios encontraron una disminución de barredores de ERO, como la vitamina E y el glutatión reducido (GSH), que puede contribuir al daño oxidativo que se observa en la hipertensión en humanos (Viada Pupo et al., 2017).

Otra situación importante son los efectos que una sesión de hemodiálisis causa en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC), pues para algunos autores la hemodiálisis agravaría el EO debido a la activación de células inflamatorias causada por el uso de membranas bioincompatibles y por pérdidas netas de antioxidantes solubles en agua o por una generación excesiva de RL. También, se señala la disminución de malondialdehído con la hemodiálisis y destacan los trabajos realizados donde enfatizan que el efecto beneficioso de la hemodiálisis sobre los principales aminotioles plasmáticos (cisteína, homocisteína, cistenil-glicina y glutatión), podría ser importante marcador de la oxidación (Heredia Ruiz et al., 2015).

En un estudio realizado para evaluar el nivel de EO en individuos normales y compararlos con pacientes con ERC y dializados, se observa que en los enfermos con ERC, los niveles de vitamina C y tioles son bajos, y que la relación RL ascorbilo/vitamina C, esta elevada con respecto a los controles. En forma contraria, el estado antioxidante y los niveles de ácido úrico se encontraban más elevados en los pacientes con ERC. Luego de finalizada la diálisis, la relación RL ascorbilo/vitamina C se halla aún más aumentada, mientras que el estado antioxidante y la biodisponibilidad de óxido nítrico están disminuidos, lo cual influye en la patogénesis de la hipertensión y probablemente en las manifestaciones cardiovasculares precoces que se observan en la ERC (Heredia Ruiz et al., 2015).

Se sospecha (aunque no está demostrado) que el EO es un importante precursor de las enfermedades neurodegenerativas incluidas el Parkinson, el Alzheimer y la de Huntington (Wang et al., 2014). También se considera que está vinculado a ciertas

enfermedades cardiovasculares, ya que la oxidación de lipoproteínas de bajo peso molecular (LDL) en el endotelio vascular es un precursor de la formación de placas de ateroma. Además desempeña un papel en la cascada isquémica debido a los daños por la reperfusión de oxígeno que sigue a la hipoxia. Esta cascada incluye tanto los accidentes cerebrovasculares como ataques cardíacos.

Por otra parte el proceso de envejecimiento está estrechamente ligado a la generalizada peroxidación de ácidos grasos de la membrana celular y daño al ADN. En las membranas celulares se alteran los gradientes iónicos y la impermeabilidad, pierde su cualidad de barrera selectora y la célula muere. En la piel los RL sustraen un electrón a la célula del tejido elástico, esencialmente al colágeno, lo cual va seguido de adelgazamiento cutáneo, de pérdida de elasticidad, resequedad y de aparición precoz de las arrugas. En la catarata senil, los RL ocasionan un daño irreversible de las proteínas del cristalino y consecuentemente determina el progreso de la enfermedad (Viada Pupo et al., 2017; Siti Hawa et al., 2015).

La etiopatogenia de la degeneración de la mácula lútea referida a la edad, está directamente relacionada con la actividad de los RL. Los daños al ADN nuclear disminuyen la facultad de regeneración y sustitución celular, disminución y enlentecimiento del proceso inmunológico, de la respuesta inflamatoria, de la actividad enzimática y consecuentemente acelera el proceso aterosclerótico y el envejecimiento. Algunos genes que regulan la longevidad actúan mediante una mayor carga genética de enzimas antioxidantes (Viada Pupo et al., 2017; Siti Hawa et al., 2015).

La aterosclerosis se inicia en la infancia, la susceptibilidad de oxidación de LDL, se asocia inversamente con la concentración de ferritina en plasma, lo cual puede ser explicado por un déficit conjunto de hierro y de nutrientes antioxidantes. Considerando esto último, el hambre oculta en los niños condicionaría una mayor oxidación de las lipoproteínas y con ello riesgo cardiovascular. (Virdis et al., 2011; Navia-Pelaez et al., 2017).

El cáncer es *per se* una enfermedad inductora de estrés oxidativo, donde las alteraciones metabólicas de las células neoplásicas, la infiltración tumoral por células inflamatorias, la

malnutrición y los tratamientos oncológicos específicos, contribuyen a elevar los niveles de EO en los pacientes que lo padecen (**figura 3**). El enfermo oncológico experimenta una situación muy especial, ya que en todo momento presenta EO, propiciado por su mecanismo de acción, ya sea por el proceso patológico o bien por la terapia farmacológica, conduciéndolo a un deterioro aún mayor, esto aunado a la falta de especificidad de la terapia, porque ésta no sólo ataca células neoplásicas, sino también a las células normales. Se habla entonces de que los efectos tóxicos del EO en células normales podrían contrarrestarse al usar antioxidantes, lo que podría a su vez anular el efecto sobre células neoplásicas al impedir la apoptosis; esto ocasiona que su falta de especificidad para actuar sobre células normales impida el uso de los antioxidantes en pacientes con cáncer (Gutiérrez Hernández et al., 2018).



Figura 3: Principales factores que influyen en la elevación del estrés oxidativo en pacientes con cáncer (Gutiérrez Hernández et al., 2018).

En cuanto al humo del tabaco, cuando una persona no fumadora permanece media hora en una sala que contiene humo de tabaco, sus depósitos de antioxidantes descienden al mínimo. El RL paraoxona aportado por el humo del tabaco inhalado disminuye los niveles de la enzima paraoxonasa, ocasionan daño severo de la túnica elástica del alvéolo, lo

cual conduce a la bronquitis crónica, enfisema pulmonar y, en otros casos, al carcinoma bronquial. El humo del cigarro por intermedio de sus RL favorece la formación de trombos y la acumulación de LDL oxidado en los macrófagos, paso previo a la formación de la placa de ateroma y a las afecciones obstructivas vasculares. El daño a la pared de la vejiga urinaria por acción del tabaco aparece tempranamente, consiste en un proceso inflamatorio irritativo crónico, con tenesmo e incontinencia que suele terminar en cáncer. El daño a la mucosa gastroduodenal de los fumadores y la sobreproducción de histamina en los estados prolongados de estrés, inducen la transformación de xantina-deshidrogenasa en xantino-oxidasa, lo cual propende a la aparición de la úlcera gástrica. Tanto los RL provenientes del tabaco, como la histamina sirven de cofactor en el duodeno, al proceso infeccioso de *Helicobacter pylori* relacionado con la úlcera duodenal crónica (Gutiérrez Hernández et al., 2018).

Las patologías del desarrollo pueden resultar de la formación endógena o xenobiótica de ERO, que dañan oxidativamente macromoléculas como el ADN, proteínas, lípidos celulares y alterar la transducción de señales traen disfunción celular y muerte intrauterina o teratogenicidad. Se ha demostrado que la exposición a oxidantes en el primer trimestre de embarazo se asocia con un mayor riesgo de anomalías congénitas graves, debido a que la mayoría de los órganos vitales del cuerpo están en desarrollo y algunos se vuelven funcionales dentro de este período en la descendencia (Viada Pupo et al., 2017).

La lepra es una enfermedad infecciosa crónica causada por el *Mycobacterium leprae*, un bacilo que se multiplica lentamente en el hospedero y posiblemente la enfermedad ocurre por el mal funcionamiento de la respuesta inmunitaria de este, relacionado con el papel de algunos micronutrientes específicos como las vitaminas A, D, E, C, el zinc y el selenio. La respuesta inmunitaria a los patógenos libera sustancias nocivas que producen lesión tisular y una pequeña cantidad de antioxidantes puede contribuir a un aumento del EO y a complicaciones de la enfermedad (Gutiérrez Hernández et al., 2018).

En pacientes con diabetes mellitus el valor sérico de las vitaminas A y E, así como los de la transferrina, la lactoferrina, la ceruloplasmina y la albúmina (derivados proteicos antioxidantes), se encuentran por debajo de lo considerado como normal. Este resultado

indica un incremento del riesgo de presentar daños celulares que afectan la fisiología de distintos órganos y tejidos, tales como: endotelio, miocardio, riñón y sistema nervioso central entre otros; como consecuencia de un aumento en la producción de RL, reflejada en el incremento de la peroxidación de lípidos y proteínas, lo cual debilita de manera importante la defensa antioxidante en este grupo de pacientes (Lawson et al., 2017).

La membrana espermática tiene ácidos grasos insaturados que la tornan vulnerable al ataque de ERO. Los espermatozoides poseen sistemas protectores, pero un desbalance entre pro y antioxidantes produce EO. Se ha estudiado para ello en el semen de hombres infértiles, el efecto del EO sobre la membrana y núcleo espermático, sometiéndolo a temperaturas de 40 °C y demuestra que este altera estructuras espermáticas esenciales y por ende interfiere en la capacidad fecundante espermática (Viada Pupo et al., 2017).

De manera general se plantea que las tensiones mecánicas generadas durante los movimientos funcionales o parafuncionales de la mandíbula como mecanismo de adaptación de la articulación temporomandibular (ATM) puede estar relacionado a la acumulación de radicales libres. Aunque en un estudio realizado en veintiséis pacientes con degeneración interna de la ATM identificó con cifras marcadas, por medio indirecto, la presencia de óxido nítrico y glutatión peroxidasa que es el principal antioxidante de las células. Concluyó que el estrés oxidativo puede tener un papel en la patogénesis de la degeneración interna de la ATM y que en el líquido sinovial las actividades de glutatión peroxidasa y óxido nítrico se incrementan. Además, no resultó suficiente el aumento de las actividades de glutatión peroxidasa para prevenir la progresión de la degeneración interna de la ATM (Valdés Reyes et al., 2016).

1.4. Antioxidantes. Mecanismos de defensa a nivel celular y extracelular

Un antioxidante es cualquier sustancia que a bajas concentraciones, comparado con el sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación de ese sustrato **(figura 4)**.

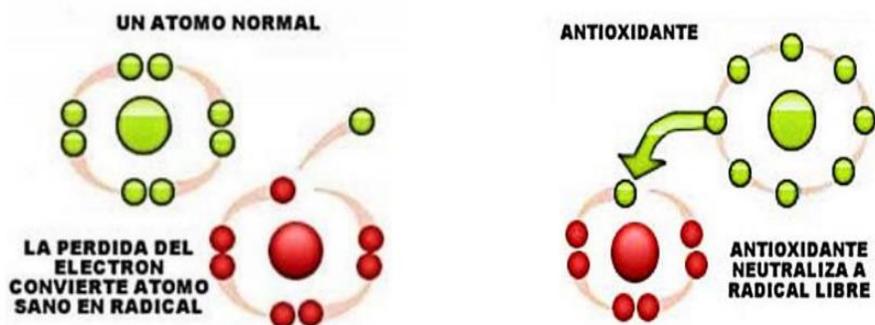


Figura 4: Radical libre y antioxidante (Gutiérrez Hernández et al., 2018).

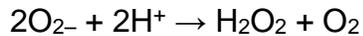
Los antioxidantes se pueden clasificar de la siguiente manera:

- Agentes que catalíticamente remueven los RL y a otras especies reactivas. Ejemplos: enzimas SOD, catalasa, peroxidasas y antioxidantes específicos para el grupo tiol.
- Proteínas que abaten la disponibilidad de los prooxidantes tal como los iones de hierro o cobre, y el grupo hemo. Ejemplos: ferritina, transferrina, haptoglobinas, hemopexina y metalotioneína. Esta clasificación incluye proteínas que oxidan el ion ferroso, como la ceruloplasmina. La ferritina es una proteína intracelular que almacena hierro. La transferrina transporta hierro en los fluidos extracelulares.
- Proteínas que protegen biomoléculas contra el daño (incluyendo estrés oxidativo) por otros mecanismos. Ejemplo: proteínas de choque térmico localizadas en retículo endoplásmico, periplasma y citoplasma. Tienen como función la estabilización y cobertura de la estructura proteica parcialmente plegada.
- Agentes de bajo peso molecular que atrapan ERO y ERN. Ejemplos: glutatión, α -tocoferol, bilirrubina y ácido úrico. Algunos agentes antioxidantes de bajo peso molecular que provienen de la dieta, especialmente la vitamina C y el α -tocoferol, están íntimamente relacionados con la nutrición y la defensa antioxidante (Indo et al., 2015; Dontha, 2016; Cárdenas Rodríguez and Pedraza Chaverri, 2005).

1.4.1. Agentes antioxidantes de alto peso molecular

Superóxido dismutasa (SOD): Cu-Zn SOD y Mn SOD

Es una enzima que se encuentra en el citoplasma (Cu-Zn SOD), mitocondria (Mn-SOD) y en el fluido extracelular (Cu-Zn SOD). La SOD cataliza la conversión del anión superóxido a peróxido de hidrógeno:

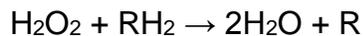


Catalasa (CAT)

Esta enzima se encuentra en las mitocondrias y los peroxisomas, y cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a agua:

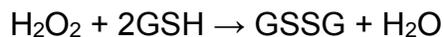


Cabe mencionar que esta enzima también tiene actividad de peroxidasa:



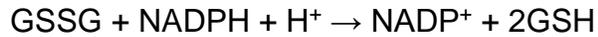
Glutación peroxidasa (GPx)

Es una selenoenzima presente en varias isoformas, entre las que se encuentran la GPx citosólica, la GPx plasmática y la GPx de fosfolípidos. Es posible encontrarla en citoplasma, mitocondria y membrana plasmática. Esta enzima cataliza la reducción de peróxidos empleando dos moléculas de glutación reducido (GSH). Los productos de la reacción son el glutación oxidado (GSSG) y el agua (Indo et al., 2015; Dontha, 2016; Cárdenas Rodríguez and Pedraza Chaverri, 2005).



Glutación reductasa (GRs)

Es una enzima que se encuentra en citoplasma y tiene a la coenzima FAD en su sitio activo. Esta enzima cataliza la reducción de GSSG empleando la coenzima NADPH:

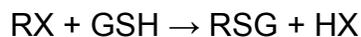


Aparentemente el NADPH reduce el FAD, el cual transfiere dos electrones a la unión disulfuro (-S--S-) entre dos residuos de cisteína del sitio activo. Los dos grupos -SH formados interactúan entonces con el GSSG reduciéndolo a dos moléculas de GSH.

Glutación S-transferasa (GST)

Hasta el momento se han encontrado las isoformas GST citosólicas y GST microsomales. Las GST citosólicas están divididas en cuatro familias principales: α , μ , π y θ , y en cuatro familias minoritarias: (ζ , σ , κ y ω). Las GST citosólicas están constituidas por dos subunidades proteínicas idénticas, mientras que las GST microsomales son trímeros (Indo et al., 2015; Dontha, 2016; Cárdenas Rodríguez and Pedraza Chaverri, 2005).

Su función primaria es catalizar la conjugación de GSH con una gran cantidad de compuestos orgánicos (RX). La reacción general de esta enzima es:



Se ha demostrado que las GST pueden reducir hidroperóxidos de lípidos por medio de una actividad de glutación peroxidasa independiente de selenio y que estas enzimas también pueden detoxificar al 4-hidroxinonal un producto de la peroxidación de lípidos (Indo et al., 2015; Dontha, 2016; Cárdenas Rodríguez and Pedraza Chaverri, 2005).

1.4.2. Agentes antioxidantes de bajo peso molecular

1.4.2.1. Compuestos Hidrosolubles

Vitamina C. También se conoce con el nombre de ácido ascórbico. Se localiza en el citosol y en los fluidos extracelulares. Tiene la capacidad de aceptar electrones y reaccionar directamente con el anión superóxido y el radical hidroxilo (Dontha, 2016).

Glutación. El glutación reducido protege los grupos sulfhidrilo de las proteínas de la acción antioxidante de los RL y tiene la capacidad de reaccionar con el peróxido de hidrógeno, el anión superóxido y el radical hidroxilo (Dontha, 2016).

Ácido úrico. Es producto final del metabolismo de las purinas en los primates y funciona como un buen atrapador de RL. Cuando el ácido úrico reacciona con ERO se generan alantoína, ácidos cianúrico y parabénico y otros productos. Además, algunos informes sugieren que el ácido úrico forma complejos con los metales de transición cuando interacciona con el ascorbato (Indo et al., 2015).

1.4.2.2. Compuestos Liposolubles

Vitamina E: La isoforma más abundante es el α -tocoferol. Es el antioxidante más distribuido en los seres vivos. Se encuentra en las membranas biológicas y tiene la capacidad de interrumpir la lipoperoxidación en la fase de propagación (Dontha, 2016).

Vitamina A: Se encuentra en las membranas impidiendo la lipoperoxidación al reaccionar principalmente con el $^1\text{O}_2$ y el $\text{OH}\cdot$.

Bilirrubina. Es el producto de degradación del grupo hemo en mamíferos; su precursor es la biliverdina. Es un poderoso atrapador de radicales peroxilo y de $^1\text{O}_2$. La bilirrubina unida a la albúmina protege a esta última molécula contra el daño por RL (Indo et al., 2015).

1.5. Métodos para evaluar potencial antioxidante

Las metodologías utilizadas para evaluar la actividad antioxidante deben desarrollarse cuidadosamente sobre la base del método analítico a realizar, para lograr una adecuada determinación del punto final de la oxidación. Se han perfeccionado innumerables cantidades de métodos regidos por dos enfoques diferentes. El primer enfoque se basa en la búsqueda del radical libre por el átomo de hidrógeno o por la existencia de donación de electrones y el segundo, incluye la presencia de sistemas antioxidantes durante la generación del radical, cuya actividad se mide y compara con la tasa de oxidación de la molécula diana. En la actualidad se reportan una gran variedad de métodos para evaluar la actividad antioxidante de productos/metabolitos de origen natural o sintético, los cuales pueden ser agrupados en estudios *in vitro* e *in vivo*. El más utilizado en los ensayos *in vitro* es el DPPH mientras que en los *in vivo* resultó ser el ensayo de lipoperoxidación (LPO) (**figura 5**) (Adam et al., 2018). De manera general detallaremos algunos de los

métodos más sencillos y a la vez más difundidos por su fiabilidad y reproducibilidad, ellos son: Ensayo del radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH), poder reductor, actividad quelante de metales y azul de molibdeno (**figura 6**). Este último se tomó como pieza angular para la realización de este trabajo.

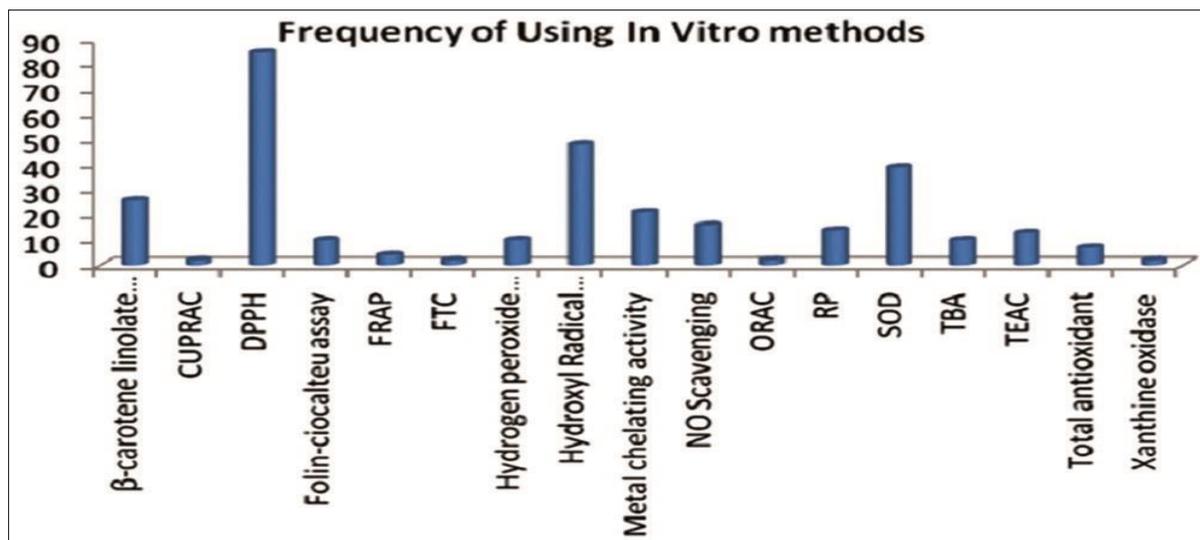


Figura 5: Frecuencia de uso de los métodos más utilizados *in vitro* para la determinación de antioxidantes (Dontha, 2016).

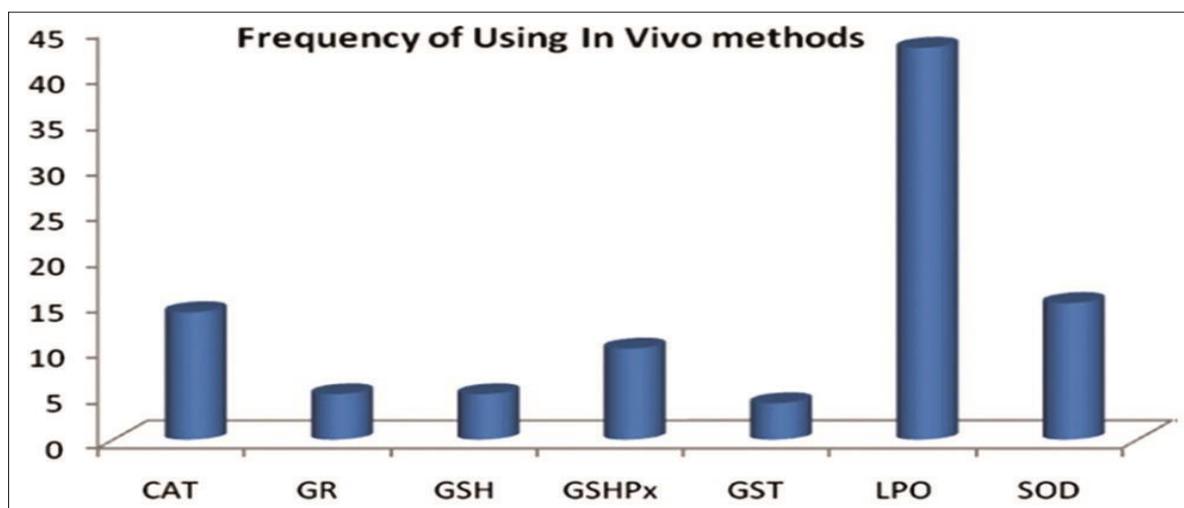


Figura 6: Frecuencia de uso de los métodos más utilizados *in vivo* para la determinación de antioxidantes (Dontha, 2016).

1.5.1. Ensayo del DPPH

El 1,1-difenil-2-picrilhidracilo es un radical libre estable debido a que en su estructura química se deslocaliza virtualmente un electrón libre, impidiendo su posible dimerización, como ocurre con otros radicales libres. Esta deslocalización electrónica brinda una coloración violácea (**figura 7**) y un máximo de absorción en etanol alrededor de los 517 nm. La reacción química consiste en que el radical libre DPPH sustrae un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (compuesto químico puro extracto), así el radical libre es neutralizado a su forma reducida obteniéndose 1,1-difenil-2-picrilhidracina; producto de este cambio se desarrolla un cambio de color, de violeta amarillo, al disminuir la concentración del radical libre; esta intensidad es leída en el espectrofotómetro después de un tiempo de 30 min de reacción (González González, 2016; Tian et al., 2017; Nascimento et al., 2017; Oboh et al., 2017; Essien et al., 2017; Phull et al., 2017; Nagoor Meeran and Hussain, 2017; Agregan et al., 2016).

Para la evaluación de la capacidad secuestradora de radicales libres de un producto natural, se preparan mezclas reactivas etanólicas o hidroalcohólicas, donde se encuentren los presuntos antioxidantes y el DPPH; determinándose espectrofotométricamente la cantidad de radical neutralizado. Este es un método ampliamente reportado en investigaciones recientes.

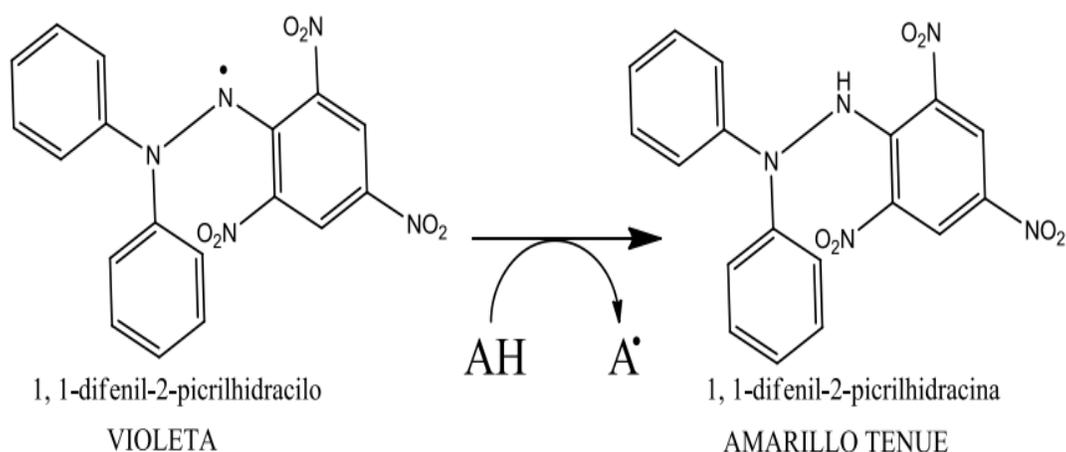


Figura 7: Reducción del radical 1, 1-difenil-2-picrilhidracilo a la correspondiente hidracina y variación del color. AH: antioxidante en su forma reducida, A.: Antioxidante en su forma oxidada (Dontha, 2016).

1.5.2. Poder reductor del Hierro

Este método se basa en el principio de aumento de la absorbancia en las mezclas de reacción, indicando un aumento de la actividad antioxidante. En el mismo, el compuesto antioxidante promueve la reducción del Fe^{3+} presente en el ferrocianuro de potasio, a la forma reducida Fe^{2+} , convirtiéndose en ferrocianuro de potasio, el cual forma a su vez un complejo coloreado en presencia de iones férricos; para lo cual es utilizado el cloruro férrico. Básicamente se trata de la formación de un complejo coloreado ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, azul Prusia) con un máximo de absorción a 700 nm, debido a la reducción del ión férrico (Fe^{3+}), presente en la mezcla reactiva, a ion ferroso (Fe^{2+}) por el antioxidante. La cantidad de complejo formado se determina espectrofotométricamente y es una medida de la cantidad de ión férrico, presente en el complejo $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, reducido por el antioxidante. Este ensayo es uno de los utilizados para evaluar la actividad antioxidante de productos naturales en publicaciones recientes (Haddouchi et al., 2014; Krupashree et al., 2014; Dhingra et al., 2017; Kumar et al., 2017a; Kumar et al., 2017b; Luan et al., 2017; Tajammal et al., 2017; Xu et al., 2017; Karuna et al., 2018; Javed et al., 2017).

1.5.3. Actividad quelante de cationes metálicos

Para determinar la capacidad quelante del extracto, se emplea una prueba en la cual se utiliza un compuesto capaz de formar complejos con cationes metálicos. La ferrozina es una molécula capaz de formarlos en presencia de Fe^{2+} y se evidencia mediante la aparición de un complejo de color rojo con un máximo de absorción a 560 nm. En ausencia de sustancias quelante, la cantidad de complejo Fe^{2+} -ferrozina formada resulta máxima. Luego de adicionar el Na_2EDTA , o un extracto secuestrador de metales, una parte del Fe^{2+} será captada dejando de formarse una cantidad correspondiente de complejo con ferrozina, lo cual se traduce en una decoloración del complejo de referencia. Esta reacción está restringida en presencia de otros agentes quelantes y

resulta en una disminución del color rojo de los complejos Fe^{2+} -ferrozina (Hernández Barreto, 2019, Oboh et al., 2017). La captación o capacidad secuestradora del Fe^{2+} juega un papel importante en el balance redox, pues impide la generación de especies radicáticas mediante reacciones tipo Fenton. Publicaciones recientes abordan estudios sobre la capacidad de muchos antioxidantes de formar complejos metálicos e influir sobre la generación de radical hidroxilo (Krupashree et al., 2014; Chang et al., 2018; Basu et al., 2017; Aderinola et al., 2019; Grochowski et al., 2017; Kumar et al., 2017b; Luan et al., 2017; Phull et al., 2017; Adam et al., 2018; Jafri et al., 2017).

1.5.4. Método del molibdeno azul

Durante la última década el campo de la química de los polioxometalatos ha experimentado una verdadera revolución. Gracias a los grandes avances en la instrumentación y herramientas informáticas más poderosas para el refinamiento y dilucidación estructural, se han podido caracterizar clúster de moléculas compuestas por hasta 368 átomos metálicos. La naturaleza versátil de estos compuestos en términos de estructura, tamaño, comportamiento redox, fotoquímica, distribución de cargas, entre otros aspectos, ha hecho que la química de los polioxometalatos sea uno de los campos de la química inorgánica de mayor crecimiento, expandiéndose a contextos multidisciplinarios como estudios sobre: nuevos materiales, nanotecnología, biología, efectos antitumorales y antivirales, efectos insulino miméticos, catálisis, materiales supramoleculares, coloides, sistemas electro-fotocrómicos, materiales moleculares y magnetismo (Long et al., 2007).

El gran número de estructuras en la química de los polioxometalatos se pueden agrupar en tres clases fundamentales:

- a) Heteropolianiones: clúster de óxido metálico que incluyen aniones tales como SO_4^{2-} y PO_4^{2-} . Constituyen los clúster de polioxometalatos más estudiados.
- b) Isopolianiones: constituidos por el óxido metálico pero sin la presencia interna de heteroátomos o polianiones. Son los sistemas polioxometalatos menos estables.
- c) Polioxometalatos de azul de molibdeno reducido: Son los polioxometalatos de todos los sistemas conocidos como azul de molibdeno. Su estructura fue

desconocida hasta 1995, donde sintetizó y elucidó estructuralmente a partir de una solución de azul de molibdeno, constando de un clúster de elevada nuclearidad (Mo_{154}) en forma de anillo.

Como método espectrofotométrico, el molibdeno azul se emplea para la cuantificación de la capacidad antioxidante total y emplea reactivos de relativamente bajo coste, en comparación con otras técnicas. De manera general se basa en la reducción del molibdeno VI (Mo^{6+}) a molibdeno V (Mo^{5+}) por el antioxidante y la posterior formación, a pH ácido, de un complejo de fosfato/ Mo^{5+} de color verde-azul con un máximo de absorción a 700 nm; es necesario agregar que dicho complejo es muy estable y no se ve afectado por algunos disolventes orgánicos utilizados para la extracción de tocoferoles. Si los valores de absorbancia son altos, indican que la muestra posee actividad antioxidante significativa, pues redujo una cantidad apreciable de Mo^{6+} aumentando la cantidad del complejo fosfomolibdeno formado. Por el contrario, bajo poder antioxidante no permite la obtención de suficiente Mo^{5+} , resultando pobre la formación del referido complejo. El método ha sido validado en cuanto a linealidad, repetitividad y reproducibilidad, sin embargo esta metodología no puede distinguir entre varios isómeros del tocoferol (Singh and Singh, 2008). Publicaciones recientes utilizan este método para estimar la actividad antioxidante de productos naturales (Ishtiaq et al., 2014; Iqbal et al., 2014; Murugan et al., 2016; Umamaheswari and Chatterjee, 2008; Almulaiky et al., 2018; Hong-Lin et al., 2016; Haddouchi et al., 2014; Krupashree et al., 2014; Dhingra et al., 2017; Muthukrishnan et al., 2018; Renugadevi et al., 2018; Zhang et al., 2018; Udayaprakash et al., 2015; Zhao et al., 2015; Ghagane et al., 2017; Phull et al., 2017; Jafri et al., 2017, de Queiroz Ferreira, 2017).

En la química analítica clásica el molibdato de sodio es uno de los reactivos más utilizados para la determinación de sílice o fosfatos mediante la formación del complejo “Molibdeno Azul”, a diferentes estados de oxidación con la adición de reductores y oxidantes (Pradhan and Pokhrel, 2013; Yatirajam and Ram, 1973).

A parte de sus diversas aplicaciones en la determinación de antioxidantes este método es muy utilizado en la determinación de fósforo en aguas naturales, en productos de fermentación de microorganismos en jugo de caña de azúcar, fertilizantes y detergentes (Pradhan and Pokhrel, 2013). Es de importancia agregar a que en muchas de estas determinaciones se utilizan variantes alternas del método azul de molibdeno, tales como: el método espectrofotométrico para la formación del complejo amarillo del ácido vanadomolibdofósforico, el método de formación del complejo bismuto-fosfomolibdeno y antimonio-fosfomolibdeno.

1.6. Estabilidad de flavonoides como metabolitos naturales de interés

Las principales propiedades beneficiosas de los flavonoides (**figura 8**) son: su capacidad antioxidante, inhibición enzimática, quelación de metales y regulación de la expresión genética por lo que son muy utilizados en terapias farmacológicas como reguladores estrogénicos, agentes antimicrobianos, diuréticos antiinflamatorios, gastroprotectores, cardiotónicos, antioxidantes, etc (Pérez Abril, 2017). Estos compuestos ejercen su actividad antioxidante en diversos sistemas biológicos y, por otro lado, esta capacidad va a depender de su relativa hidrofiliidad/y de las interacciones que se establezcan con las macromoléculas (Pérez Abril, 2017).

Compuesto	Efecto metabólico	Fruta
<i>Flavanonas</i> Naringenina Hesperidina Eriocitrina	Protegen la peroxidación Afectan a la permeabilidad de los lípidos Antitumoral Hormonal Antimicrobiano Antidepresivo	Cítricos Miel Tomates Menta
<i>Flavonas</i> Luteolina Apigenina	Actividad de fitoestrógenos Antimicrobiano	Pimiento Apio Perejil
<i>Isoflavonas</i> Daidzeína Genisteína	Antioxidante Actividad estrogénica	Soja Plantas leguminosas
<i>Flavonoles</i> Quercetina Miricetina Kaempferol	Antioxidante Disminuyen la agregación plaquetaria Disminuyen la oxidación de las LDL Antimutagénico Antiinflamatorio Antimicrobiano	Manzana Uva Cereza Granada Cebollas Escarola Té Brócoli
<i>Flavanoles</i> Catequinas Proantocianidinas	Antioxidante Antimutagénico Antiinflamatorio	Uva Manzana Pera

Figura 8: Propiedades beneficiosas de los flavonoides y su presencia en alimentos (Pérez Abril, 2017).

La intensidad de la actividad antioxidante depende en gran medida de su estructura química (**figura 10**) (Ali et al., 2013; Amic et al., 2007; Banjarnahor and Artanti, 2014; Furuno et al., 2002; Lien et al., 1999; Lu et al., 2006), esta se ve influenciada por el número y la posición de los grupos hidroxilos en los anillos B y A y por el grado de conjugación entre los anillos B y C. Ejemplos concretos de estas modificaciones son: la estructura o-dihidroxi (3',4'-diOH, es decir, catecol)' sustituida en el anillo B confiere una gran estabilidad al radical fenoxílico mediante el puente de hidrógeno formado; la doble unión C2-C3 (en conjugación con el 4-oxo) favorece la estabilización del radical debido a la fuerte deslocalización de electrones del anillo; la presencia de grupos 3-OH y 5-OH aporta una máxima actividad antirradicálica. También es favorable la sustitución de grupos hidroxilos para formar una estructura catecólica en el anillo A compensando la ausencia de la agrupación o-dihidroxi en el anillo B (Amic et al., 2007; Banjarnahor and Artanti, 2014) (**figura 9**). En cuanto a la presencia de azúcares, los flavonoides glicosilados son más resistentes a la degradación que sus homólogos no glicosilados (Sokolová et al., 2011; Zenkevich and Guschina, 2010; Chaaban et al., 2016).

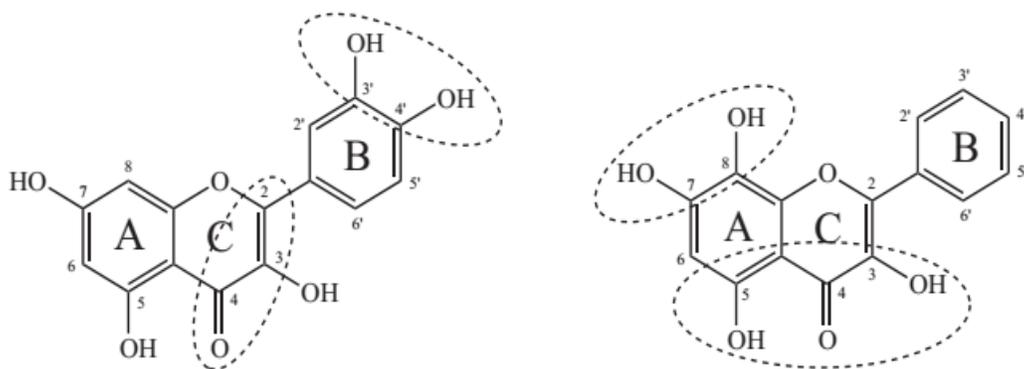


Figura 9: Modificaciones estructurales de los flavonoides (Amic et al., 2007).

La estabilidad de los flavonoides muchas veces se ve afectada por la acción de numerosos factores. En consecuencia, se han publicado un gran número de artículos relacionados con la estabilidad de polifenoles. Entre los factores que afectan la estabilidad de polifenoles se encuentran la estructura química, la luz, la temperatura y el

Revisión bibliográfica

tiempo de almacenamiento (Limmatvapirat et al., 2011; Sokolová et al., 2011; Zenkevich and Guschina, 2010).

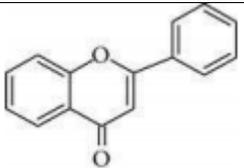
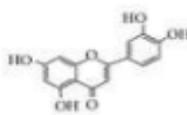
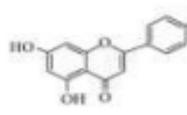
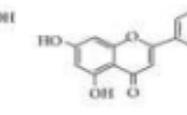
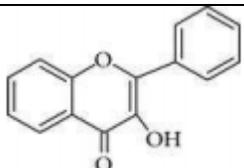
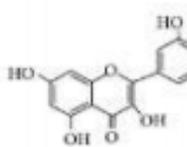
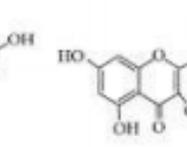
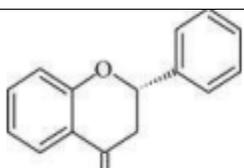
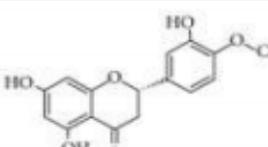
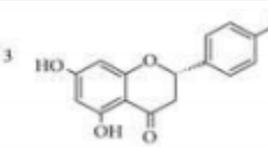
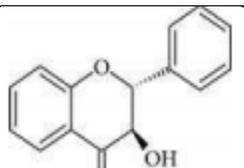
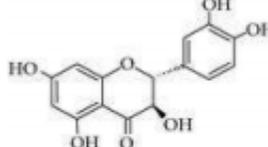
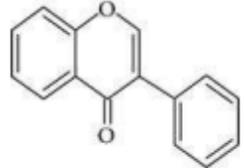
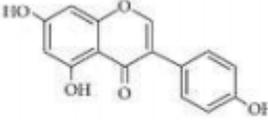
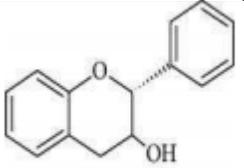
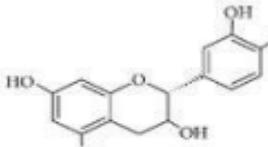
FLAVONAS		 Luteolina  Apigenina  Crisina
FLAVONOL		 Quercetina  Kaempferol
FLAVONONAS		 Hesperidina  Naringenina
FLAVONONOL		 Taxifolin
ISOFLAVONA S		 Genisteína
FLAVAN-3-OL		 Catequina

Figura 10: Clases químicas representativas de los flavonoides (Pérez Abril, 2017).

En disolución el mecanismo de oxidación y su estabilidad depende del pH. Por otra parte, la degradación oxidativa de los flavonoides ha sido informada en la literatura por varios autores (Sokolová et al., 2011; Zenkevich and Guschina, 2010), sin embargo, su efecto sobre la determinación de pK nunca ha sido considerado. Según los resultados obtenidos por (Díaz-Rivas et al., 2019) basándose en un estudio realizado a las infusiones de salvilla (*Buddlejas cordioides*) afirman que en general los flavonoides presentan un comportamiento ácido-base neutro a condiciones ácidas (por debajo de pH= 3), mientras que en condiciones cercanas a la neutralidad presentan una carga negativa, lo cual interfiere con muchas de sus propiedades benéficas como antioxidantes, por lo que sería deseable acidificar las infusiones obtenidas antes de ser comercializadas. Indagando en estudios realizados por (Busso Casati, 2016) a las antocianinas se encontró también que a valores de pH inferiores a 2, básicamente el 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable el catión flavilio (AH^+) de color rojo intenso, por su parte a valores más altos de pH ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2 y ha valores básicos por encima de 7 se presentan formas quinoidales de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire, hecho este que hace coincidir con lo planteado anteriormente en (Díaz-Rivas et al., 2019) y nos permite concluir sobre el efecto estabilizante del pH ácido sobre los flavonoides en general.

Se ha demostrado que la temperatura tiene efectos sobre la estabilidad de los flavonoides lo que ocasiona cambios en su estructura, actividad y efecto biológico. Paralelamente su estructura química influye notablemente en su degradación al ser sometida a estrés térmico, ejemplo de esto son los flavonoides quercetina y rutina **(Figura 11 y 12)**.

Un aspecto relevante lo constituye el hecho de que la degradación de un flavonoide en particular puede variar la actividad antioxidante resultante, de la siguiente manera:

1. actividad antioxidante decrece.
2. se mantiene constante.
3. aumenta considerablemente (Chaaban et al., 2016).

En dependencia de la naturaleza de los productos de degradación obtenidos se van a obtener los resultados anteriores, en el caso de nuestro estudio las variaciones de interés son la 1 y la 3 las cuales pueden falsear los resultados de los experimentos sobrestimándose o subestimándose la actividad antioxidante.

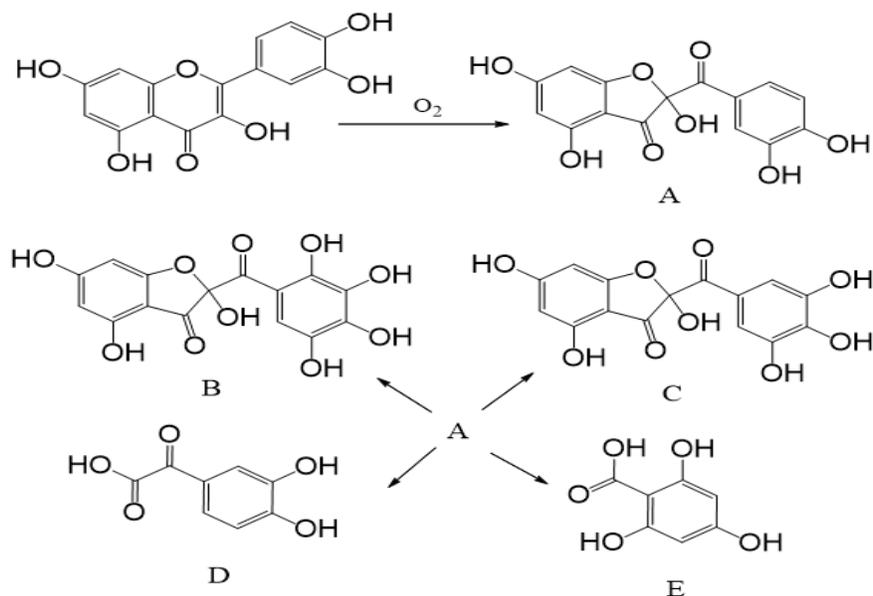


Figura 11: Productos de degradación de la quercetina (Chaaban et al., 2016).

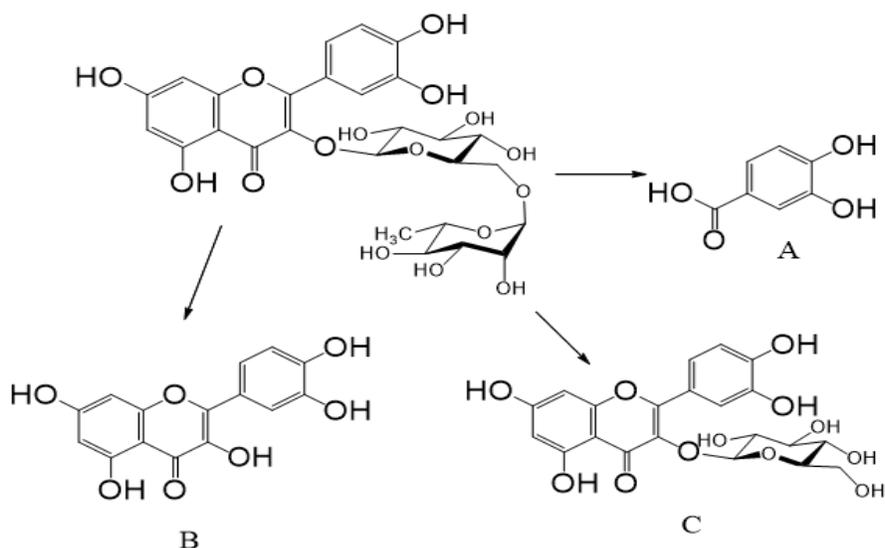


Figura 12: Productos de degradación de la Rutina (Chaaban et al., 2016).

Investigaciones recientes realizadas por (Chaaban et al., 2016), sobre la cinética de degradación de algunos flavonoides, tales como rutina, naringina, luteolina y mesquitol, eriodictiol, luteolina, luteolina 7-O glucósido en medio acuoso, a diferentes temperaturas y tiempo de incubación, revelaron diversos comportamientos asociados a las variaciones estructurales. La naringina resultó ser uno de los flavonoides más estables al estrés térmico. Temperaturas superiores de hasta 130 °C, sólo degradan parcialmente (20 %) el producto inicial; resultando prácticamente estable a 100 y 110 °C, condiciones que resultan extremas para los demás compuestos estudiados. La rutina, un flavonoide glicosilado derivado de la quercetina, mostró una estabilidad baja, al analizar los gráficos de sus productos residuales se aprecia que la misma a 70°C durante una hora no sufre degradación pero a las 2 h ya se ha degradado el 10 % de su totalidad, resultado diferente se obtiene a los 90 °C durante 1 h de incubación donde las concentraciones de los productos de degradación ascienden al 20 % de la concentración del metabolito original, al llegar a la temperatura de 110 °C transcurrida 1h ya se observa casi una total degradación (80 %) de la rutina. Por su parte el mesquitol fue altamente sensible a degradarse a bajas temperaturas y la luteolina 7-O glucósido mostró una estabilidad más alta que la luteolina cuando el tratamiento térmico aplicado fue inferior a 100 °C, mientras que a temperaturas más altas la luteolina 7-O glucósido se convirtió en más sensible que la luteolina.

En otro estudio las hojas de Daun Dewa (*Gynura divaricata*) fueron sometidas a temperaturas de 40 °C a 100 °C. Se encontró que el contenido total de compuestos fenólicos y contenido total de flavonoides se vio aumentado a partir de 90 °C, además aseguran que a esta misma temperatura hay mayor capacidad antioxidante y captación de radicales libres, también se demostró que el tratamiento térmico de vapor-blanqueado y escaldado con agua a 90 °C y 100 °C producen la inactivación de las polifenol-oxidasas y el contenido de polifenoles es más alto en tiempos de calentamientos bajos (1-4 min) (Delgado Flores, 2015). Según el análisis realizado por (Muñoz Muñoz et al., 2015) se sometió a hidrólisis ácida a una temperatura de 80 °C a un extracto hidroalcohólico de quercetina (relación 1:1:1 de extracto, ácido y agua respectivamente) obteniéndose como resultado que dicho flavonoide se degrada entre un 5 y un 27 % en las condiciones descritas para la hidrólisis ácida, oxidación y exposición de la luz. Sin embargo en otro

estudio realizado por (Trigueros Fernández, 2016) afirman que la quercetina en una solución acuosa sobresaturada y de concentración conocida no sufre degradación a la temperatura de trabajo (75 °C en baño termostático) ni al estar sometida a radiación por microondas (70 W).

Los hallazgos anteriores confirman la posibilidad de degradación de algunos flavonoides bajo condiciones de estrés térmico o catálisis ácida. Numerosos artículos (Almulaiky et al., 2018; Hong-Lin et al., 2016; Haddouchi et al., 2014; Krupashree et al., 2014; Dhingra et al., 2017; Umamaheswari and Chatterjee, 2008; Muthukrishnan et al., 2018; Renugadevi et al., 2018; Zhang et al., 2018; Udayaprakash et al., 2015; Zhao et al., 2015; Ghagane et al., 2017; Phull et al., 2017; Jafri et al., 2017; de Queiroz Ferreira, 2017) citan la metodología establecida por (Prieto et al., 1999), estos utilizan altas concentraciones de ácido (0.6 M) que pueden llegar a ser estresantes para los metabolitos e incluso para la formación de los complejos de polioxometalatos, altas temperaturas (95 °C) y tiempos de incubación largos (90 min). Lo que puede ocasionar que se estime de manera incorrecta el potencial antioxidante debido a la interferencia de los productos de degradación de estos polifenoles (Chaaban et al., 2016). Estudios sumamente interesantes muestran que las condiciones de estrés térmico pueden disminuirse aparentemente en un rango por debajo de 70 °C, los tiempos de exposición al calor también, hasta llegar a intervalos de tiempo de 30 a 60 min y los valores de pH demasiados ácidos pueden variarse en rangos factibles para lograr una mayor formación de complejo azul de molibdeno sin falsear los resultados de la estimación que se realiza.

Capítulo II. Materiales y Métodos.

2.1. Equipos y reactivos utilizados

La investigación se realizó en el Laboratorio de Farmacología del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. En todos los procedimientos desarrollados se utilizó cristalería específica de laboratorio, reactivos de calidad analítica y equipos certificados como aptos para el uso.

2.1.1. Instrumentos y equipos

- Agitador tipo zaranda: THYS2, MLW, Alemania.
- Balanza analítica digital: Sartorius, modelo BS 124 S.
- Destilador modelo DEP 01-02
- Espectrofotómetro UV–Vis: Génesis, 10UV, USA.
- Estufa: modelo DHG–9146A, China.
- pH–metro: pH300, *HANNA instruments*.
- Ordenador personal: Intel(R) Core(TM) i5-2450M CPU 2.50 GHz, 4.0 GB RAM, 500GB HDD.
- Micropipetas

2.1.2. Reactivos, solventes y fármacos utilizados

UniChem®: Ácido ascórbico, H₂SO₄, HCl, Na₂HPO₄, ácido gálico, pirogalol, ácido acético glacial, etanol.

Reachim: (NH₄)₆ Mo₇O₂₄·4H₂O.

Acros Organics: Quercetina, rutina

2.2. Análisis Factorial

Considerando la variedad de factores que pueden influir sobre la formación de los complejos de Molibdeno azul (buscar) se procedió a realizar un diseño experimental fraccionado 3^4 (se analizaron cuatro factores en tres niveles) que consta de una serie de 27 experimentos aleatorizados en pos de determinar el factor o los factores más significativos. En este estudio se definieron como factores a evaluar la temperatura, el tiempo de desarrollo del color, el tipo de ácido y la acidez en términos de normalidad (tabla 1), manteniéndose constantes el agente reductor, la concentración empleada del mismo, así como la de $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y Na_2HPO_4 (**tabla 1**).

Tabla 1: Diseño experimental.

Factores	Niveles		
	Bajo	Medio	Alto
Temperatura (°C)	40	65	90
Tipo de Ácido	CH_3COOH	H_2SO_4	HCl
Tiempo de incubación (minutos)	15	60	120
c(x) de ácido (N)	0.0025	0.025	0.25

2.2.1. Procedimiento para obtener los valores de absorbancia de los complejos de azul de fosfomolibdeno

Se preparó una mezcla reactiva constituida por 1.0 ml de ácido (0.7 M), 0.7 ml Na_2HPO_4 (28 mM) y 0.7 ml de $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (4 mM) se le añadieron 0.6 ml del agente reductor (ácido ascórbico, 0.15 mM), el blanco se preparó bajo el mismo procedimiento solo que se añadió agua destilada en vez de ácido ascórbico. La mezcla se agitó e incubó a diferentes tiempos y temperaturas de acuerdo al análisis factorial diseñado. Luego de ser enfriada se leyó la absorbancia a 695 nm como indicador de la cantidad de complejo

de azul de molibdeno formado. Como se comentó anteriormente los ácidos empleados fueron:

2.2.2. Preparación del Agente Reductor (ácido ascórbico)

Se preparó la solución madre de ácido ascórbico de 0.5 mg/ml pesando 5 mg del reductor y enrasando con agua destilada en un matraz aforado de 10 ml. Después se toma una alícuota de 6.605 ml que se trasvasa a otro matraz aforado de 25 ml. Se vuelve a tomar una alícuota de 0.6 ml que garantiza una concentración aproximada de 0.15 mM en la solución reactiva (3 ml).

2.2.3. Preparación de las soluciones ácidas para el Análisis Factorial

Tipos de ácidos utilizados:

1. CH_3COOH glacial (D= 1.049 g/ml, MM= 60.0211 g/mol)
2. H_2SO_4 (MM= 36.44 g/mol, D =1.8 g/mol)
3. HCl (32%, MM= 36.44 g/mol)

2.2.4. Métodos para preparar las soluciones de ácidos a las tres concentraciones previstas (Alta: 0.25 N, Media: 0.025 N, Baja: 0.0025 N) en el Análisis Factorial

2.2.4.1. Soluciones (Alta: 0.25 N, Media: 0.025 N, Baja: 0.0025 N) de ácido acético glacial

Para el ácido acético glacial se estima obtener una concentración alta de 0.25 N, para lograrlo se prepara una solución acuosa de 0.75 N, para ello se toma una alícuota de 4.2913 ml de ácido acético glacial, luego se trasvasa a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua destilada, acto seguido se toma una alícuota de 1 ml y se le adiciona a la mezcla reactiva (3 ml) lo que proporciona la concentración adecuada (0.25 N).

Para obtener una concentración media de 0.025 N de ácido acético glacial se prepara una solución acuosa de 0.075 N, para ello se toma una alícuota de 0.4291 ml ácido acético glacial, luego se trasvasa a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua destilada, después se toma una alícuota de 1 ml y se le adiciona a la mezcla reactiva (3 ml) lo que proporciona la concentración adecuada (0.025 N).

Para obtener una concentración baja de 0.0025 N de ácido acético glacial se prepara una solución acuosa de 0.0075 N, para ello se toma una alícuota de 0.04291 ml ácido acético glacial, luego se trasvasa a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua destilada, después se toma una alícuota de 1 ml y se le adiciona a la mezcla reactiva (3 ml) lo que proporciona la concentración adecuada (0.0025 N).

2.2.4.2. Soluciones (Alta: 0.25 N, Media: 0.025 N, Baja: 0.0025 N) de ácido sulfúrico

Para el ácido sulfúrico se estima obtener una concentración alta de 0.25 N, para lograrlo se prepara una solución acuosa de 0.75 N, para ello se toma una alícuota de 2.043 ml ácido sulfúrico, luego se trasvasa a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua destilada, acto seguido se toma una alícuota de 1 ml y se le adiciona a la mezcla reactiva (3 ml) lo que proporciona la concentración adecuada (0.25 N).

Para obtener una concentración media de 0.025 N, se prepara una solución acuosa de 0.075 N, para ello se toma una alícuota de 0.204 ml ácido sulfúrico, luego se trasvasa a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua destilada, acto seguido se toma una alícuota de 1 ml y se le adiciona a la mezcla reactiva (3 ml) lo que proporciona la concentración adecuada (0.025 N).

Para obtener una concentración baja de 0.0025 N, se prepara una solución acuosa de 0.075 N, para ello se toma una alícuota de 0.020 ml ácido sulfúrico, luego se trasvasa a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua destilada, acto seguido se toma una alícuota de 1 ml y se le adiciona a la mezcla reactiva (3 ml) lo que proporciona la concentración adecuada (0.025 N).

2.2.4.3. Soluciones (Alta: 0.25 N, Media: 0.025 N, Baja: 0.0025 N) de ácido clorhídrico

Para el ácido clorhídrico se estima obtener una concentración alta de 0.25 N, para lograrlo se prepara una solución acuosa de 0.75 N, para ello se toma una alícuota de 8.545 ml ácido clorhídrico, luego se trasvasa a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua destilada, después se toma una alícuota de 1 ml y se le adiciona a la mezcla reactiva (3 ml) lo que proporciona la concentración adecuada (0.25 N).

Para obtener una concentración media de 0.025 N, se prepara una solución acuosa de 0.075 N, para ello se toma una alícuota de 0.855 ml ácido clorhídrico, luego se trasvasa a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua destilada, después se toma una alícuota de 1 ml y se le adiciona a la mezcla reactiva (3 ml) lo que proporciona la concentración adecuada (0.025 N).

Para obtener una concentración baja de 0.0025 N, se prepara una solución acuosa de 0.075 N, para ello se toma una alícuota de 0.855 ml ácido clorhídrico, luego se trasvasa a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua destilada, después se toma una alícuota de 1 ml y se le adiciona a la mezcla reactiva (3 ml) lo que proporciona la concentración adecuada (0.025 N).

2.2.5. Preparación de la solución de $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Se pesa 1.225 g de patrón $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ luego en un matraz aforado de 250 ml se enrasa con agua destilada garantizando una concentración adecuada de 4 mM, este factor se mantuvo constante para todo el estudio.

2.2.6. Preparación de la solución de Na_2HPO_4

Se pesa 0.9925 g de patrón Na_2HPO_4 luego en un matraz aforado de 250 ml se enrasa con agua destilada garantizando una concentración adecuada de 2 mM, este factor se mantuvo constante para todo el estudio.

2.3. Volúmenes de la solución de HCl (1N) para obtener diferentes concentraciones de ácido en términos de normalidad

Para estudiar con mayor profundidad la influencia de la acidez en la formación de los complejos de azul de molibdeno y considerando que además de catálisis térmica la presencia de un medio ácido fuerte ($\text{pH} \leq 3$) puede favorecer la degradación de numerosos metabolitos naturales, se elaboraron 8 soluciones base de HCl de normalidad creciente en un amplio rango de 0.0025 N a 1 N (**tabla 2**). Para ello se prepara inicialmente una solución madre de HCl (3 N), para lograrlo se toma una alícuota de 34.18 ml de ácido clorhídrico concentrado, se transfiere a un matraz aforado de 100 ml,

y se enrasa con agua destilada. A partir de esta solución madre se toman distintas alícuotas para obtener soluciones de distinto grado de acidez.

Tabla 2: Alícuotas para obtener soluciones de acidez creciente, empleando un matraz aforado de 25 ml y una solución madre de HCl (3 N). Se indica el valor de pH obtenido en la solución donde se forma el complejo de fosfomolibdeno.

No.	alícuota (ml)	Concentración (N)	pH (solución final)
1	0.063	0.0025	5.359
2	0.125	0.005	5.093
3	0.250	0.01	3.123
4	0.625	0.025	2.150
5	1.25	0.050	1.695
6	2.50	0.100	1.356
7	6.25	0.250	0.967
8	12.5	0.500	0.624
9	-	1.000	0.326

2.3.1. Mezcla reactiva para emplear en la determinación de la influencia de la concentración y tipo de agente reductor en la formación del complejo azul de Molibdeno

Luego de definidos las condiciones óptimas para desarrollar los estudios antioxidantes mediante el método de azul de molibdeno, en cuanto a tipo de ácido y concentración de éste expresada en normalidad, se consideró preparar una mezcla reactiva que propiciara la optimización del tiempo de experimentación y los recursos en la investigación (**tabla 3**).

Tabla 3: Composición de la mezcla reactiva.

Mezcla reactiva (en 250 ml)	
Componente	masa (g) / volumen (ml)
$(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.3573 g
Na_2HPO_4	0.2895 g
HCl	0.4355 ml

2.4. Estudio del empleo de cosolventes en la formación del complejo azul de molibdeno

Se preparan dos soluciones reactivas pero con diferentes cosolventes (etanol y agua) para estudiar la influencia que tienen en la formación del complejo, para ello se escogen las parejas de valores de temperatura y tiempo de incubación previstos para la optimización del método (65 °C, 40 min; 55 °C, 15 min). El procedimiento a seguir se describe a continuación:

En un primer paso se pesan 0.005 g del agente reductor, enrasando con agua en un matraz aforado de 10 ml, luego de la solución madre tomamos una alícuota y enrasamos con agua en otro matraz de 10 ml garantizando la concentración adecuada. Obtenido esto se toman 2.4 ml de la mezcla reactiva preparada con anterioridad, se le adicionan 3 ml de agua y 3ml de la solución de agente reductor preparada, después se incuba a 65 °C durante 40 min y se mide la absorbancia a 695 nm. Proceso similar se desarrolla en el segundo experimento excepto que en vez de añadir 3 ml de agua se adiciona la misma cantidad pero de etanol.

2.5. Evaluación de la actividad antioxidante mediante el método de azul de molibdeno optimizado

2.5.1. Evaluación de la actividad antioxidante del ácido ascórbico

Se prepara una solución madre del mismo pesando 0.0125 g del agente reductor y enrasando con agua en un matraz aforado de 25 ml, luego de la solución madre tomamos

las alícuotas y enrasamos con agua en un matraz de 10 ml garantizando las concentraciones adecuadas (**tabla 4**). Obteniendo esto se toman 2.4 ml de la mezcla reactiva preparada con anterioridad, se le adicionan 0.3 ml de etanol y 0.3 ml de la solución de agente reductor preparada, después se incuba a 65 °C durante 40 min y se mide la absorbancia a 695 nm.

Tabla 4: Alícuotas que garantizan la concentración adecuada de ácido ascórbico en el escalado de concentraciones.

No.	Concentración de ácido ascórbico (mM)	Cantidad de ml que garantiza la concentración adecuada en una alícuota de 10ml
1	0.025	0.8806
2	0.05	1.7612
3	0.075	2.642
4	0.100	3.5224
5	0.125	4.403
6	0.15	5.2836

2.5.2. Evaluación de la actividad antioxidante de la quercetina

Se prepara una solución madre del mismo pesando 0.005 g del agente reductor y enrasando con etanol en un matraz aforado de 10 ml, luego de la solución madre tomamos las alícuotas y enrasamos con agua en otro matraz de 10 ml garantizando las concentraciones adecuadas (**tabla 5**). Obteniendo esto, se toman 2.4 ml de la mezcla reactiva preparada con anterioridad, se le adicionan 0.3 ml de agua y 0.3 ml de la solución con el agente reductor previamente preparada, después se incuba a 65 °C durante 40 min y se mide la absorbancia a 695 nm.

Tabla 5: Alícuotas que garantizan la concentración adecuada de quercetina en el escalado de concentraciones.

No.	Concentración de quercetina (mM)	Cantidad de ml que garantiza la concentración adecuada en una alícuota de 10ml
1	0.01	0.64
2	0.02	1.28
3	0.04	2.56
4	0.06	3.84
5	0.08	5.12
6	0.10	6.4

2.5.3. Evaluación de la actividad antioxidante de la rutina

Se prepara una solución madre del mismo pesando 0.005 g del agente reductor y enrasando con etanol en un matraz aforado de 10 ml, luego de la solución madre tomamos las alícuotas y enrasamos con etanol en otro matraz de 10 ml garantizando las concentraciones adecuadas (**tabla 6**). Obteniendo esto, se toman 2.4 ml de la mezcla reactiva preparada con anterioridad, se le adicionan 0.3 ml de etanol y 0.3 ml de la solución de agente reductor previamente preparada, después se incuba a 65 °C durante 40 min y se mide la absorbancia a 695 nm.

2.5.4. Evaluación de la actividad antioxidante del ácido gálico

Se prepara una solución madre del mismo pesando 0.050 g del agente reductor y enrasando con agua en un matraz aforado de 25 ml, luego de la solución madre tomamos las alícuotas y enrasamos con agua en otro matraz de 10 ml garantizando las concentraciones adecuadas (**tabla 7**). Obteniendo esto, se toman 2.4 ml de la mezcla reactiva preparada con anterioridad, se le adicionan 0.3 ml de etanol y 0.3 ml de la solución de agente reductor previamente preparada, después se incuba a 65 °C durante 40 min y se mide la absorbancia a 695 nm.

Tabla 6: Alícuotas que garantizan la concentración adecuada de rutina en el escalado de concentraciones.

No.	Concentración de rutina (mM)	Cantidad de ml que garantiza la concentración adecuada en una alícuota de 10ml
1	0.01	0.6646
2	0.02	1.3292
3	0.04	2.6584
4	0.06	3.9876
5	0.08	5.3168
6	0.10	6.646

Tabla 7: Alícuotas que garantizan la concentración adecuada de ácido gálico en el escalado de concentraciones.

No.	Concentración de ácido gálico (mM)	Cantidad de ml que garantiza la concentración adecuada en una alícuota de 10ml
1	0.01	0.425
2	0.025	0.8506
3	0.05	1.7012
4	0.10	3.4024
5	0.20	5.1036
6	0.40	6.8048
7	0.80	8.506

2.5.5. Evaluación de la actividad antioxidante del pirogallol

Se prepara una solución madre del mismo pesando 0.005 g del agente reductor y enrasando con agua en un matraz aforado de 10 ml, luego de la solución madre tomamos

Materiales y métodos

las alícuotas y enrasamos con agua en otro matraz de 10 ml garantizando las concentraciones adecuadas (**tabla 8**). Obteniendo esto, se toman 2.4 ml de la mezcla reactiva preparada con anterioridad, se le adicionan 0.3 ml de etanol y 0.3 ml de la solución de agente reductor previamente preparada, después se incuba a 65 °C durante 40 min y se mide la absorbancia a 695 nm.

Tabla 8: Alícuotas que garantizan la concentración adecuada de pirogalol en el escalado de concentraciones.

No.	Concentración de pirogalol (mM)	Cantidad de ml que garantiza la concentración adecuada en una alícuota de 10ml
1	0.005	1.2611
2	0.01	0.2522
3	0.02	0.5044
4	0.03	0.7566
5	0.06	1.5133

Capítulo III. Resultados y Discusión

3.1. Resultados diseño experimental

Como se ha comentado anteriormente, sobre la formación de complejos de polioxometalatos, específicamente en el azul de molibdeno, influyen numerosos factores. En un intento de modificar las condiciones estresantes bajo las que se emplea el método anterior para evaluar la actividad antioxidante de productos de interés, es pertinente determinar cuáles factores, relacionados fundamentalmente con el riesgo de degradación de metabolitos naturales, son más importantes en la cantidad de complejo que se forma bajo condiciones pre-establecidas. Lo anterior significaría arribar a un compromiso entre favorecer la formación de estas estructuras químicamente complejas y disminuir el riesgo de catálisis o degradación de diferentes moléculas antioxidantes o productos de origen natural que se estudien.

Los resultados obtenidos para el diseño experimental, tomando como base para el análisis, el grado de significación de los factores en estudio y su relación con la cantidad de complejo azul de molibdeno formado; permiten conocer aquellos que muestran una relación más fuerte.

Al establecerse un corte en el nivel de significación, comprobamos que a la derecha se encuentran los factores que más influyeron en la formación del complejo y a la izquierda los que menos contribuyeron. Esclarecido esto, Se observó que la concentración de ácido fue el factor que más influyó, por su parte la temperatura tuvo una contribución pequeña, pero positiva, mientras que el tiempo de incubación, el tipo de ácido y la combinación de factores no mostró influencia alguna (**figura 13**). Así mismo se aprecia una relación cuadrática fuerte entre la acidez y la cantidad de complejo azul de molibdeno (**figura 15**), por lo que el incremento de esta favorece la formación del mismo, hasta determinado valor de normalidad a partir del cual influye de manera negativa (concentración de ácido Q). Una vez definidos los factores con mayor significación, fijamos los valores de aquellos que aportaron la menor significación para el estudio.

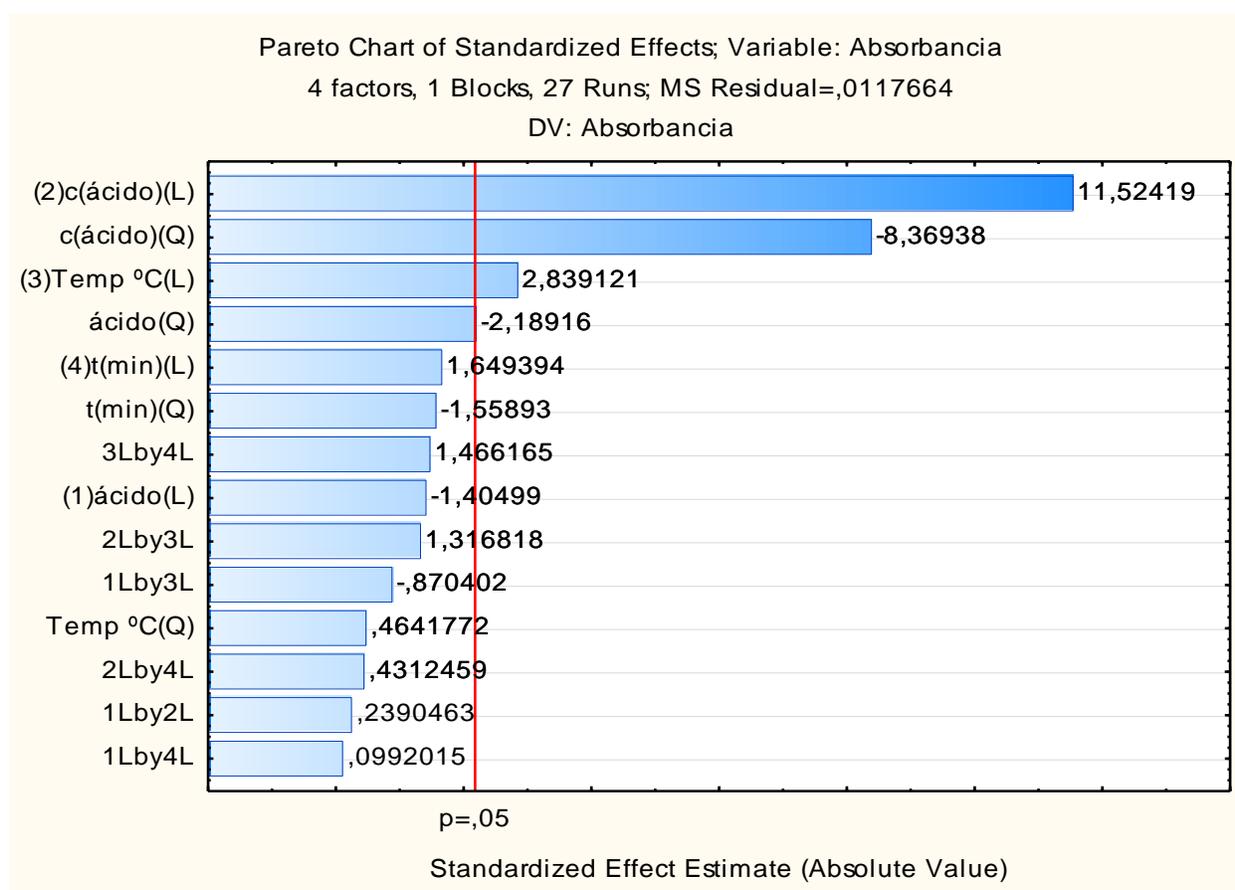


Figura 13: Gráfico de Pareto inicial considerando todos los factores estudiados y sus combinaciones.

El HCl fue seleccionado por ser el ácido más fuerte de los tres utilizados y el que garantizó una correcta coloración del complejo y una acidificación del medio instantánea, por otra parte el tiempo de incubación escogido fue el menor utilizado en el diseño experimental (15 min).

La eliminación de los factores de menor contribución para explicar el incremento de la cantidad de complejo formado nos permite simplificar el modelo a obtener, de esta forma la remoción de la combinación de factores y el tiempo de incubación, permitió arribar a una estimación en la cual continúan siendo la concentración de ácido (lineal y cuadrática) y la temperatura (lineal) los factores más influyentes (**figura 14**).

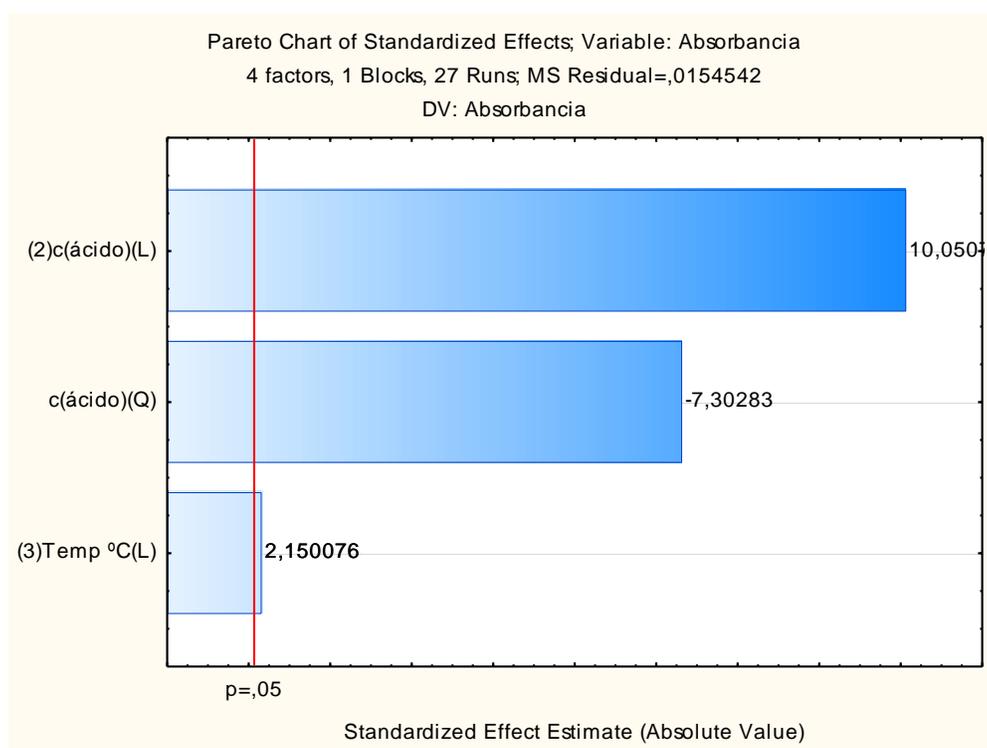


Figura 14: Efectos estandarizados luego de eliminadas las contribuciones de los factores no significativos.

La ecuación del modelo ajustado es la siguiente:

$$Abs = -0.21524319740618 + 22.824142661182 * x - 80.96770170845 * x^2 + 0.00252 * y$$

Donde:

Abs: Absorbancia [cantidad de complejo formado], x: Concentración de ácido (N), y: Temperatura (°C)

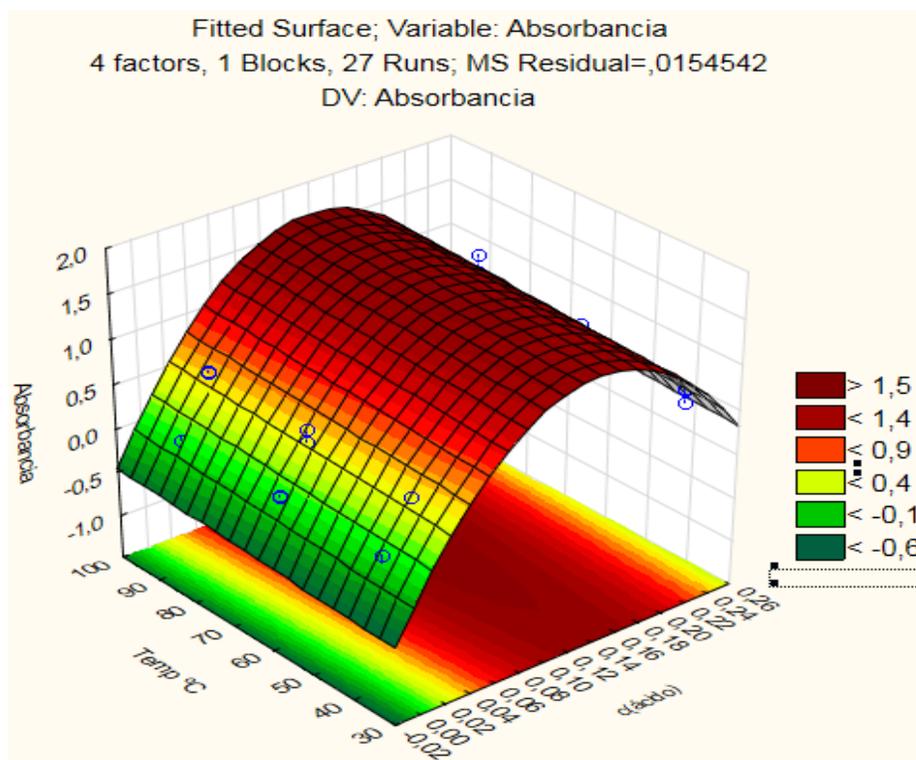


Figura 15: Superficie-respuesta para los factores más significativos (concentración de ácido y temperatura). Obsérvese la influencia cuadrática de la concentración de ácido.

3.1. Determinación de la influencia de la concentración de ácido en la formación del complejo azul de molibdeno

Para dicha determinación se escogieron nueve concentraciones de ácido ascendentes las cuales arrojaron una clara conclusión, la influencia de la acidez es positiva para la formación del complejo, pero cuando se alcanzan valores altos de este factor la absorbancia decrece, hecho que coincide con los resultados obtenidos por (Chaaban et al., 2016).

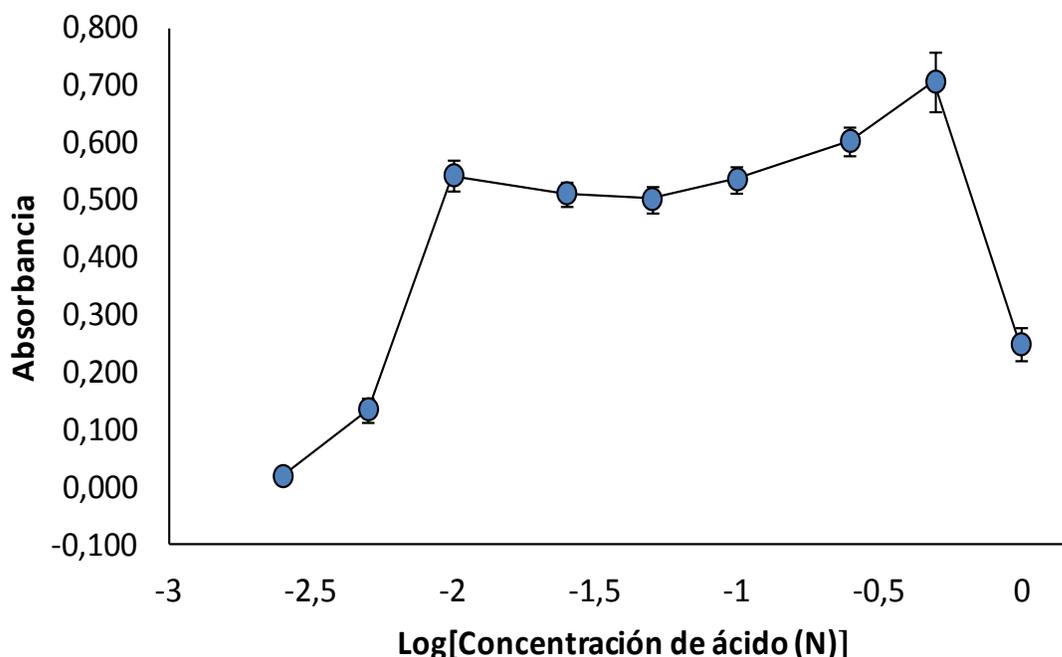


Figura 16: Influencia de la acidez en la formación del complejo azul de molibdeno.

Al expresar los valores de absorbancia en función de las concentraciones normales en términos logarítmicos (**figura 16**), se aprecia que para los valores de concentración de ácido más bajos ensayados (0.0025 N, 0.005 N, 0.01 N) la cantidad de complejo formado se incrementa rápidamente alcanzándose valores relativamente óptimos. Por encima de 0.01 N, el desarrollo del color se mantiene relativamente constante hasta 0.1 N, lo que coincide con el rango de acidez reportado en la literatura que permite la formación adecuada de estos complejos de molibdeno azul. Un incremento posterior de la acidez, particularmente a valores de 1 N, inducen una decoloración (se forma poco complejo) de la solución, presumiblemente porque la intensa acidez está afectando al agente reductor, mediante algún tipo de catálisis ácida. Conclusiones similares ofrecen otros autores en trabajos de investigación donde se consideran únicamente la acidez del medio y el tiempo de desarrollo del color como factores que afectan la formación (cantidad) de azul de Molibdeno en la mezcla reactiva en estudio (Chaaban et al., 2016).

Resultados y discusión

Duncan test; variable Abs1 (C HCI) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 0.00074, df = 36.000									
c(HCI) N	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
0.0025		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.005	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.01	0.000	0.000		0.093	0.032	0.687	0.001	0.000	0.000
0.025	0.000	0.000	0.093		0.561	0.167	0.000	0.000	0.000
0.05	0.000	0.000	0.032	0.561		0.066	0.000	0.000	0.000
0.1	0.000	0.000	0.687	0.167	0.066		0.001	0.000	0.000
0.25	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001		0.000	0.000
0.5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

Códigos: 1: 0.0025 N; 2: 0.005 N; 3: 0.01 N; 4: 0.025 N; 5: 0.05N; 6: 0.1 N; 7: 0.25N; 8: 0.5 N; 9: 1N

Tabla 9: Prueba de Duncan para el análisis del efecto de la concentración de ácido (N) en la formación del complejo de azul molibdeno.

Este comportamiento resulta en extremo interesante pues se tratan de hechos aparentemente contradictorios. Por un lado es sabido que estos complejos de Molibdeno requieren un medio ácido para su formación (Long et al., 2007), lo que se traduciría, en un razonamiento simple, que los valores de absorbancia, la intensidad de la coloración de la solución reactiva y consecuentemente la cantidad de complejo formado debería aumentar rápidamente, de manera lineal, al aumentar este factor. Sin embargo, además de la acidez necesaria para la formación y estabilidad de estos complejos, se precisa, como otro factor determinante, la existencia de un agente reductor capaz de reducir el estado de oxidación de estos molibdatos ($[\text{MoO}_4]^{2-}$) y formar los óxidos correspondientes (MoO_3) que integran los bloques o clúster de construcción de la estructura particularmente entramada de estos complejos (Long et al., 2007). La influencia negativa sobre el agente reductor, por algún tipo de catálisis ácida, probablemente, podría explicar

el comportamiento observado con anterioridad (**figura 16**). De esta forma la disminución de la cantidad de complejo obedece, no al efecto directo del incremento de la acidez sobre la estructura química del complejo de polioxometalato, sino a la posible degradación del agente reductor necesario para la formación de la cantidad adecuada de Mo^{5+} (Iorio et al., 1991).

De la relación entre estos dos factores, aparentemente contradictorios, encontramos, al menos, tres rangos de acidez (HCl) con comportamientos distintivos. Entre 0.0025 N y 0.01 N, aumenta rápidamente la coloración de la solución en una relación prácticamente lineal. El menor valor de acidez ensayado no logra la formación de cantidades apreciables de complejo ($\text{Abs} \sim 0$) mientras que para 0.01 N la coloración azul resulta intensa ($\text{Abs} \geq 0.5$) y muy significativa estadísticamente (**tabla 9**) cuando se ha incrementado 4 veces la acidez. A partir de este valor de acidez (0.01 N), se observa un rango de acidez donde el incremento en la cantidad de complejo formado permanece relativamente constante o varía en menor medida. Esta zona o región de acidez se enmarca entre los 0.01 N y 0.5 N. Un análisis detallado permite detectar que entre 0.01 N y 0.1 N, el incremento de la acidez no se traduce en un incremento significativo de la cantidad de complejo que se forma (**tabla 8**), aun cuando la concentración de ácido se ha elevado 10 veces; luego aumenta discretamente al continuar incrementándose la acidez hasta 0.5 N. En resumen, para este segundo rango de valores de acidez, muy distinto al primero observado, la acidez permanece casi constante o, para los valores más elevados, aumenta ligeramente. Lo anterior es el resultado de la acción contrapuesta de los dos factores referidos, la acidez al aumentar favorece la formación estructural de los clúster que integran el complejo de polioxometalato y por otro, a su vez, afecta, aparentemente no en igual medida, al agente reductor necesario. Esto sugiere, que a pesar de obtenerse a 0.5 N la mayor coloración (y cantidad de complejo formado) y que la misma es estadísticamente significativa (**tabla 9**), este incremento ha sido a costa de un aumento de 50 veces en la acidez de la solución, lo que se considera un gasto de reactivo injustificado. Por otra parte la idea de usar la mínima concentración de ácido que permite la formación de una cantidad apreciable de complejo, reduce el riesgo de catálisis ácida para algunos metabolitos de origen vegetal. Los bajos valores de absorbancia obtenidos para 1 N, revelan que a partir de 0.5 N, la acidez del medio es

tal que se afecta seriamente al agente reductor empleado (ácido ascórbico), un hecho comentado en otros trabajos de investigación (lorio et al., 1991) y que se manifiesta en el análisis del diseño de experimentos al encontrarse una fuerte influencia negativa de la acidez (Q) como factor cuadrático (**figura 15**).

En términos de valores de pH, de manera general, los bajos registros de absorbancia en los dos primeros valores de concentración de ácido se deben a que el rango de pH que garantiza la mezcla reactiva no es el adecuado para formación de complejos de polioxometalatos. Según (Long et al., 2007) el rango de pH favorable es 1-3, lo que sustenta aún más nuestro criterio, pues los valores de pH experimentales tomados para estas concentraciones de ácido son mayores que 5 (para 0.0025 N, pH= 5.359; 0.005, pH= 5.093). En los grupos 7 y 8, donde se registran los mayores valores de absorbancia, la acidez es relativamente menor al rango indicado anteriormente (para 0.25 N, pH= 0.967; 0.50 N, pH= 0.624). Por último el grupo 9, donde el valor de concentración del ácido es 1 N, y esto expresado en pH de la mezcla reactiva correspondiente toma el valor de 0.326, la absorbancia del complejo azul decrece significativamente con respecto a los altos valores obtenidos anteriormente. En este caso el valor de pH calculado se encuentra muy por debajo del rango efectivo reportado, donde el efecto mayoritario es producto a que se afecta el agente reductor (lorio et al., 1991).

3.3. Evaluación del desarrollo del color al emplear ácido ascórbico (0.15 mM) como agente reductor y considerando el efecto de la temperatura

Se analizó el comportamiento de desarrollo del color a diferentes temperaturas (90 °C, 65 °C, 55 °C, 45 °C), donde se observa, en primer lugar, que la formación del complejo azul de molibdeno, requiere un tiempo mínimo, en el cual estaría actuando el agente reductor. Así a t_0 (0 min), leyendo la absorbancia inmediatamente luego de homogeneizar la solución reactiva, no hay cantidad apreciable (solución incolora) de complejo formado (**figura 17**).

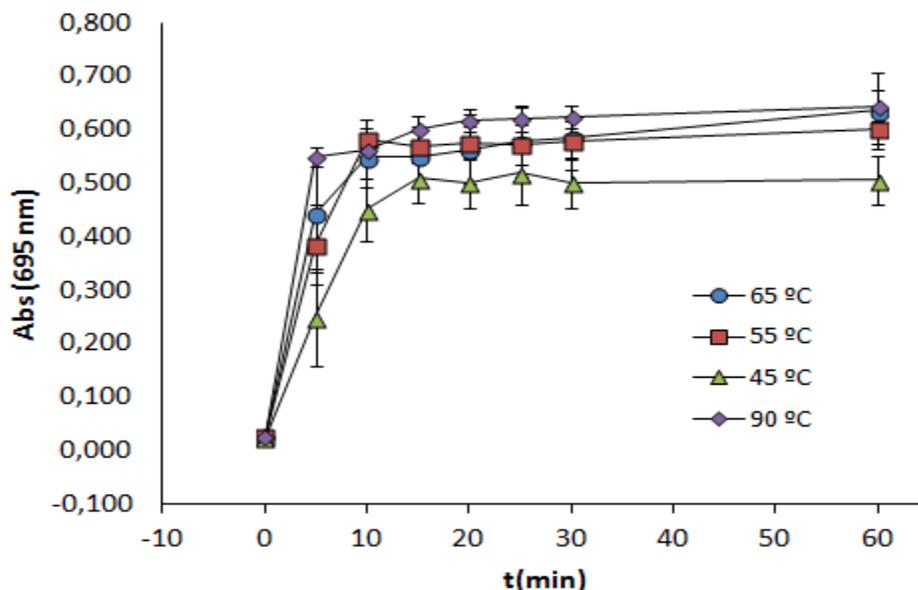


Figura 17: Desarrollo del color al emplear ácido ascórbico (0.15 mM) como agente reductor y considerando el efecto de la temperatura.

Este tiempo mínimo requerido para que actúe el agente reductor, en nuestro caso, ácido ascórbico, está en torno a los 10-15 min para las distintas curvas en función de la temperatura de incubación. Aparentemente los cambios más sustanciales en el incremento de la absorbancia en función del tiempo, ocurren por debajo de los 10 min, pues a 90 °C se obtiene la mayor coloración a los 5 min y decrece significativamente con la disminución de la temperatura. Excepto para el desarrollo del color experimentado bajo una temperatura de incubación de 45 °C, no se observaron diferencias respecto a la cantidad de complejo formado a los 10 min para cualquiera de las otras temperaturas en estudio. Luego a 90 °C, los valores de absorbancia obtenidos son ligeramente mayores, pero no estadísticamente significativos, aún cuando el tiempo de incubación es de una hora (**Anexo 1**).

Por otra parte, se observa un intervalo de interés (15-30 min) entre las temperaturas 55 °C y 65 °C donde las diferencias entre los valores de absorbancia no son significativos (Duncan, $p > 0.05$) (**Anexo 2 y 3**) y manifiestan una uniformidad aparente a pesar de ser

a temperaturas diferentes, aplicándose esto también para el intervalo de tiempo de 30-60 min (**tabla 10**).

En este punto es preciso considerar el estrés térmico que sufren algunos flavonoides y de manera particular la rutina y la quercetina (Chaaban et al., 2016), al pretender la optimización de un método para estimar el potencial antioxidante de productos de origen vegetal, específicamente flavonoides y fenoles en sentido general. Esta degradación se incrementa en función del tiempo y de temperaturas por encima de 70 °C de manera notable (Chaaban et al., 2016). Si se añade a lo anterior, que el medio en el que se forman los complejos de azul de molibdeno son francamente ácidos, pues además de la temperatura, sería muy probable una catálisis ácida de muchos metabolitos vegetales, lo cual justifica la elección de la menor acidez posible para el medio reactivo.

Un aspecto a resaltar radica en el hecho que la adaptación más popularizada del azul de molibdeno como método espectrofotométrico para la estimación del potencial antioxidante de productos naturales (metabolitos, diferentes tipos de extractos, fracciones diversas, etc.) es la reportada por (Prieto et al., 1999). La metodología referida propone una temperatura de 95 °C durante 90 min, como condiciones para el desarrollo del complejo azul de molibdeno; así mismo utiliza el H₂SO₄ como ácido a una normalidad superior a 1. La mayoría de estudios donde se emplea la formación de estos complejos bajo la denominación de Actividad Antioxidante Total, como denominación del método, emplean estas mismas condiciones (Ishtiaq et al., 2014; Iqbal et al., 2014; Murugan et al., 2016; Umamaheswari and Chatterjee, 2008; Almulaiky et al., 2018; Hong-Lin et al., 2016; Haddouchi et al., 2014; Krupashree et al., 2014; Dhingra et al., 2017; Muthukrishnan et al., 2018; Renugadevi et al., 2018; Zhang et al., 2018; Udayaprakash et al., 2015; Zhao et al., 2015; Ghagane et al., 2017; Phull et al., 2017; Jafri et al., 2017; de Queiroz Ferreira, 2017) las cuales consideramos muy enérgicas. Precisamente estudios recientes demuestran que no sólo son susceptibles los flavonoides a degradarse bajo estas condiciones estresantes, sino que la actividad antioxidante resultante puede variar no en función del flavonoide evaluado sino por la mezcla de productos de degradación que están presentes en la mezcla reactiva (Chaaban et al., 2016). Esto último resulta determinante, pues si se quiere disponer de un método

espectrofotométrico para estimar el potencial antioxidante de un metabolito o extracto natural en cuestión, la interpretación de los resultados puede falsearse al considerarse el aporte de los productos de degradación presentes.

Los resultados obtenidos en el estudio confirman que la temperatura y el tiempo de incubación referidos en los estudios consultados puede resultar innecesariamente elevados y estiman incorrectamente el verdadero potencial antioxidante de productos de interés de origen natural. Presumiblemente se puede sugerir, hasta este nivel de discusión de los resultados, la menor temperatura y tiempo posible, lo que permiten aumentar la rapidez del método, eliminando posibles metabolitos o productos de degradación como interferencias potenciales. Así resultaría, considerando únicamente el comportamiento del ácido ascórbico, que al no haber diferencias significativas en un amplio rango de tiempo y temperatura (**tabla 10**), valores de 55 °C y 15 min de incubación son suficientes para desarrollar el método espectrofotométrico.

Tabla 10: Prueba de Duncan para el análisis de la cantidad de complejo azul de molibdeno formado a partir de 15 min de incubación a diferentes temperaturas empleando como agente reductor ácido ascórbico (0.15 mM).

<i>Duncan test, variable Abs (Vit C) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error. Between</i>								
<i>MS = 0.00169, df = 48.000</i>								
t (min)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
	0.54893	0.56114	0.58186	0.58521	0.56886	0.57271	0.57157	0.57607
15' 65 °C		0.581	0.203	0.165	0.399	0.344	0.356	0.288
20' 65 °C	0.581		0.418	0.353	0.727	0.637	0.659	0.553
25' 65 °C	0.203	0.418		0.879	0.605	0.699	0.675	0.794
30' 65 °C	0.165	0.353	0.879		0.523	0.610	0.588	0.699
15' 55 °C	0.399	0.727	0.605	0.523		0.871	0.902	0.769
20' 55 °C	0.344	0.637	0.699	0.610	0.871		0.959	0.879
25' 55 °C	0.356	0.659	0.675	0.588	0.902	0.959		0.849
30' 55 °C	0.288	0.553	0.794	0.699	0.769	0.879	0.849	

3.4. Resultados del desarrollo del color de la quercetina considerando el efecto de la temperatura

Los polifenoles, y dentro de ellos los flavonoides, difieren estructuralmente del ácido ascórbico. Es probable que esta diferencia estructural explique, independientemente que todos manifiesten propiedades antioxidantes, un comportamiento en el tiempo algo distinto, y que incluya no solo la posibilidad de intervenir en reacciones redox, sino la velocidad o rapidez con que se donan electrones para lograr el efecto reductor o neutralizador de radicales libres. En el caso de la quercetina el estudio del desarrollo del color en función del tiempo se observó que a diferencia del ácido ascórbico los valores de absorbancia se estabilizaron a los 40 min para cada temperatura.

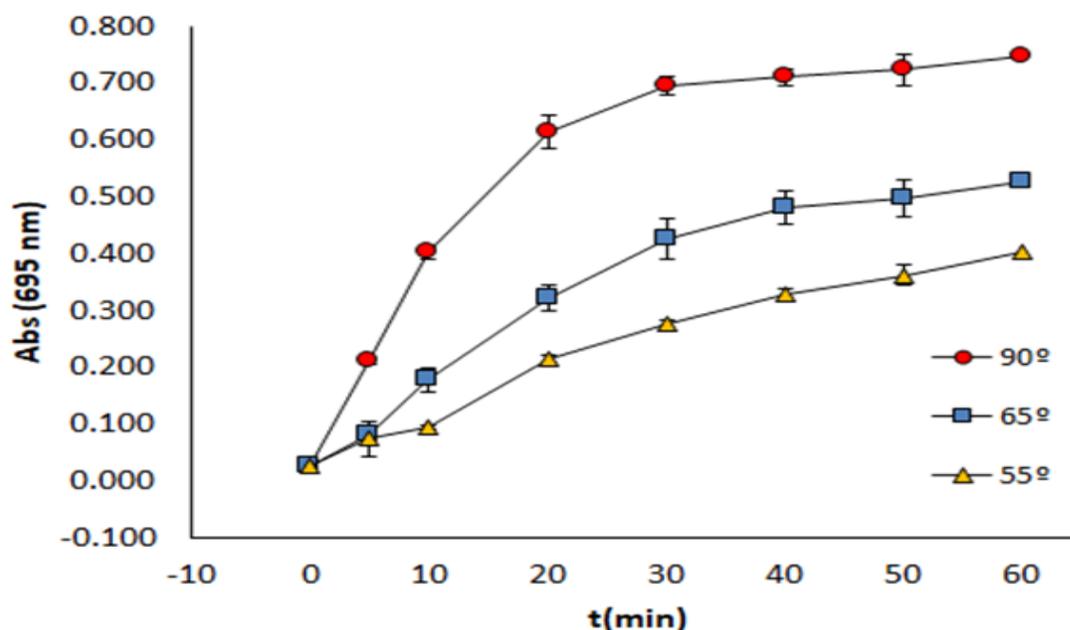


Figura 18: Desarrollo del color al emplear quercetina (0.1 mM) como agente reductor y considerando el efecto de la temperatura.

En el gráfico se describen comportamientos muy diferentes entre sí (**figura 18**), el desarrollo del color difiere notablemente en función de la temperatura, la que describe el experimento realizado a 90 °C es la que registra los mayores valores de absorbancia, estos son significativamente diferente a las curvas de 65 °C y 55 °C (**Anexo 4**), según lo sugerido por (Muñoz Muñoz et al., 2015) los valores de temperatura de 80 °C o más degradan a la quercetina, por lo que es posible que se esté estimando la potencia antioxidante con interferencia de sus productos de degradación. Sin embargo a la temperatura de 55 °C todavía la formación del complejo no se ha estabilizado transcurrida 1 h y las diferencias entre sus valores son significativas (Duncan, $p < 0.05$) (**Anexo 6**). Estos hechos reafirman que este valor de temperatura no es favorable para el estudio del desarrollo del color de la quercetina, a diferencia del ácido ascórbico, que en estas condiciones se estabilizó a los 15 min. Lo anterior demuestra la diferencia de comportamiento redox existente entre los dos metabolitos, considerando la influencia térmica como factor decisivo para la activación de su mecanismo antioxidante. Un aumento hasta 65 °C logra estabilizar la cantidad de complejo formado a los 40 min por

el flavonoide, una temperatura que sugiere poco riesgo de estrés térmico (**Anexo 5**), unos de las expectativas del presente estudio.

3.5. Determinación del efecto del etanol en la formación del complejo azul de molibdeno

Considerando la limitada solubilidad en agua de numerosos productos de origen natural, especialmente flavonoides no glicosilados o fracciones orgánicas diversas que poseen un potente efecto secuestrador de radicales libres; se consideró oportuno introducir en la mezcla reactiva una cantidad determinada de etanol, útil como cosolvente. La importancia de lo anterior radica en que es posible que la presencia de solventes orgánicos pueda variar la cantidad de complejo formado o corrimientos del máximo de absorción a la longitud de onda que se emplea para la detección (695 nm). Si se cumple la premisa anterior, es preciso, cuando se evalúen compuestos de diferente polaridad, homogenizar con una mezcla hidroalcohólica, las condiciones químicas en las que se forman los polioxometalatos.

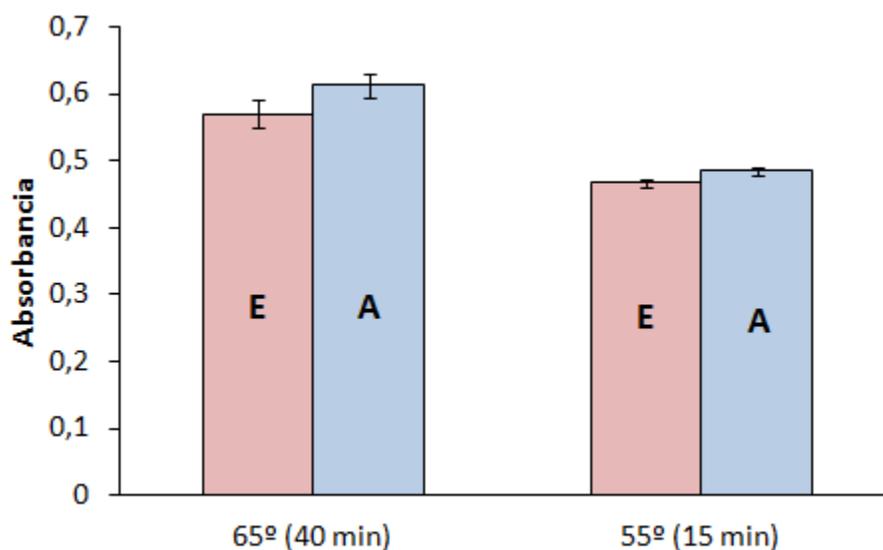


Figura 19: Efecto del solvente (etanol) sobre la formación del complejo azul de fosfomolibdeno. E: en presencia de etanol (1 % v/v), A: en ausencia de etanol.

Los resultados obtenidos (**figura 19**) confirman que la presencia de etanol en la solución reactiva disminuye la absorbancia de manera significativa (**tabla 11**) aunque la magnitud del efecto no es considerable y permite utilizar dicho solvente para favorecer la solubilidad de los flavonoides o fracciones orgánicas con poca solubilidad en soluciones acuosas.

Tabla 11: Prueba de Duncan para el análisis de la influencia del solvente (etanol) en el desarrollo del color empleando como agente reductor ácido ascórbico (0.15 mM).

<i>Duncan test; variable Abs Approximate Probabilities for Post Hoc Tests</i>				
<i>Error: Between MS = ,00020, df = 8,0000</i>				
Temp/solv	{1}	{2}	{3}	{4}
65 °C etanol	0,570	0,613	0,467	0,484
65 °C agua	0,006	0,006	0,000	0,000
55 °C etanol	0,000	0,000	0,175	0,175
55 °C agua	0,000	0,000	0,175	0,175

3.6. Evaluación de la actividad antioxidante total de algunos metabolitos naturales

La actividad antioxidante total de los patrones estudiados mostró una relación estrecha con el comportamiento concentración-dependiente para cada sustancia ensayada, excepto para la rutina, la cual en el rango de concentración evaluado, no mostró actividad (**figura 21**). Todas las CE_{50} calculadas (**tabla 12**) fueron significativamente diferentes (Duncan, $p < 0.05$). La respuesta lineal obtenida ($y=4.2526x - 0.0625$, $R^2 = 0.9924$) (**figura 20**) permite, además de los cálculos de CE_{50} habituales, expresar la actividad antioxidante total como equivalentes de ácido ascórbico. Como aspecto interesante resaltaremos que bajo las mismas condiciones el pirogalol mostró mayor linealidad en su respuesta ($y=8.9219x-0.0077$, $R^2 = 0.9998$).

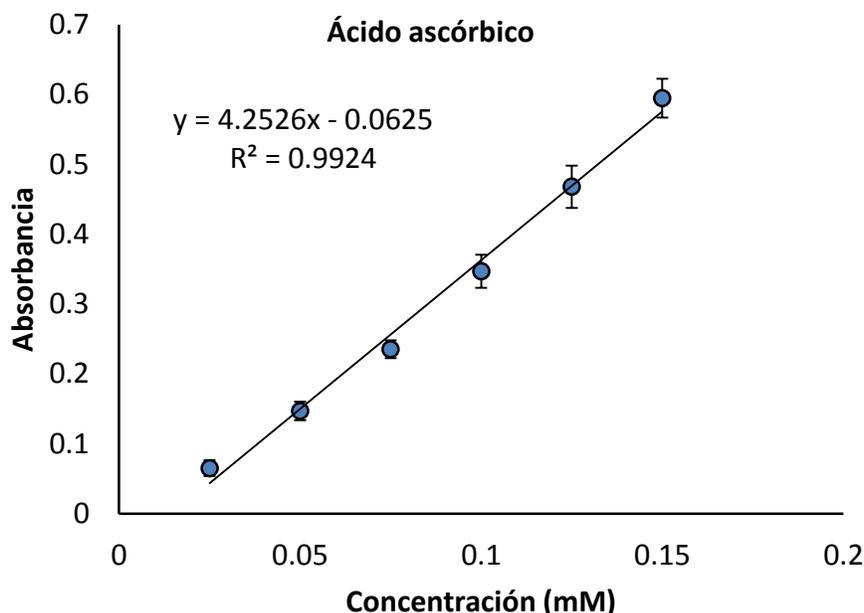


Figura 20: Respuesta lineal obtenida para el ácido ascórbico en la formación del complejo de azul de molibdeno.

El pirogalol, un polifenol muy similar estructuralmente al ácido gálico, mostró la mayor actividad secuestradora de radicales, manifestando una diferencia notable en cuanto a actividad con respecto a este último. Las diferencias estructurales entre estos dos metabolitos explican dicho comportamiento. La presencia de tres grupos hidroxilos fenólicos vecinales, justifica su gran potencia reductora, en cambio el ácido gálico posee un grupo funcional carboxilo, como sustituyente de tipo electroceptor, que afecta la estabilidad del radical fenoxilo y por consiguiente su actividad antioxidante. En este punto señalaremos que la facilidad con la que un compuesto fenólico dona electrones para reducir a un agente determinado, y de esa manera, ejercer su acción reductora o antioxidante, está íntimamente relacionada con la estabilidad de los radicales fenoxilo que se producen.

El fenol (compuesto fenólico más simple) muestra una pobre capacidad neutralizadora de radicales libres, la cual se incrementa espectacularmente en el catecol, derivado donde se ha incluido un grupo OH en posición orto. Así mismo una sustitución con un grupo amino en posición 2, para rendir el 2-aminofenol, incrementa en gran medida el efecto antirradicálico, tanto como en el catecol, pero al hacerlo con nitro (2-nitrofenol)

prácticamente desaparece la actividad. Otros comportamientos interesantes se encuentran al sustituir el ácido salicílico, el cual posee poca actividad neutralizadora de radicales libres. Al sustituir este ácido orgánico con grupos nitro (ácido 2, 3-dinitro salicílico) prácticamente desaparece la acción antioxidante, similar a lo encontrado en el ácido 4-fenolsulfónico; un derivado del fenol con un sustituyente fuertemente electroceptor como el sulfonilo. Otros derivados fenólicos, como el ácido gálico, muestran gran efecto antirradicálico. A pesar de tener un grupo carboxilo, electroceptor; la presencia de tres grupos hidroxilos, similar al pirogalol, contrarresta en gran medida este hecho e incrementa notablemente su actividad (Iorio et al., 1991).

De lo anterior se deduce que la presencia de sustituyentes electrodonadores, en los compuestos fenólicos, favorecen la acción antioxidante y los electroceptores la dificultan. Como resulta obvio, el número de grupos hidroxilos fenólicos se relaciona directamente con el potencial antioxidante, aunque influenciado por la presencia de diferentes sustituyentes como se explicó anteriormente.

Algunos estudios relacionados con la temática, de gran interés, han sido publicados por algunos autores (Furuno et al., 2002; Lien et al., 1999; Lu et al., 2006).

Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran que la quercetina registró el segundo menor valor de CE_{50} (**tabla 12**), confirmando su gran actividad antioxidante. La rutina, flavonoide glicosilado derivado de la quercetina, exhibió en cambio una actividad casi nula en los rangos de concentración propuestos, no pudiéndose calcular los valores de CE_{50} ; demostrándose así que la glicosilación resulta una modificación estructural desventajosa para la actividad antioxidante.

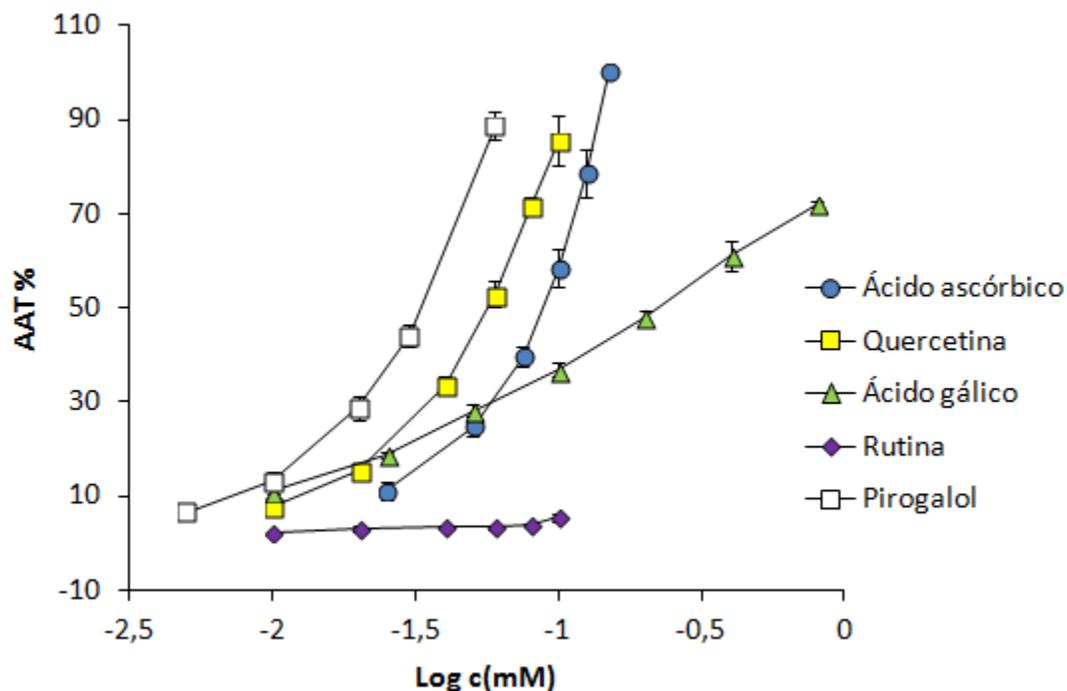


Figura 21: Actividad antioxidante total de algunos metabolitos naturales. La concentración se expresa en escala logarítmica (0.005 mM – 0.8 mM).

*AAT 100%: cantidad de complejo azul de fosfomolibdeno que se forma como resultado de la adición de ácido ascórbico (0.15 mM) a la mezcla reactiva (HCl: 0.01 N, t= 40 min, $\lambda= 695$ nm).

Tabla 12: Valores de CE_{50} calculados para algunos antioxidantes.

antioxidante	CE_{50}
ácido ascórbico	0.085±0.004
quercetina	0.058±0.002
ácido gálico	0.211±0.015
pirogallol	0.034±0.002

Todos los compuestos evaluados mostraron diferencias significativas en su poder reductor (**tabla 13**). El orden general de actividad mostrada por los compuestos

Resultados y discusión

evaluados fue el siguiente: pirogallol, quercetina, ácido ascórbico, ácido gálico y finalmente rutina, que como hemos comentado no mostró actividad alguna en el ensayo efectuado.

Tabla 13: Prueba de Duncan para el análisis de las CE₅₀ de 4 compuestos antioxidantes.

Duncan test; variable CE50 Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 0.00006, df = 8.0000				
antioxidante	{1}	{2}	{3}	{4}
ácido ascórbico	0.08470	0.05800	0.21087	0.03423
quercetina		0.004	0.000	0.000
ácido gálico	0.004		0.000	0.007
pirogallol	0.000	0.000		0.000
	0.000	0.007	0.000	

Estos resultados son consistentes con los obtenidos en estudios relacionados con la temática (Ali et al., 2013; Furuno et al., 2002; LIEN et al., 1999; Lu et al., 2006; Amic et al., 2007; Banjarnahor and Artanti, 2014), lo que justifica la validez del método optimizado propuesto para determinar el potencial antioxidante de productos de origen natural, y sobre todo proporciona una variante optimizada del ensayo que resulta más económica, más rápida y más fiable.

Conclusiones

Una vez concluida la presente investigación podemos arribar a las siguientes conclusiones:

1. Es posible optimizar el método azul de molibdeno para evitar condiciones estresantes tales como un medio ácido muy fuerte, tiempo prolongado de análisis y elevadas temperaturas, las cuales promueven degradación de metabolitos de origen natural.
2. La concentración de ácido y la temperatura resultaron los factores determinantes para la formación de los complejos de molibdeno. La presencia de etanol en la mezcla reactiva, estudiada en experimentos independientes, influye negativamente; aunque no impide su utilización como cosolvente.
3. Las condiciones bajo las que se considera óptimo el empleo del método azul de molibdeno para la estimación del potencial antioxidante de productos de origen natural fueron: Tipo de ácido: HCl; concentración de ácido/pH de la mezcla reactiva, 0.01N, ~ 3; temperatura de incubación: 65 °C, y tiempo de incubación: 40 min.
4. La relación lineal encontrada para el ácido ascórbico, permite expresar el potencial antioxidante de productos naturales como equivalentes de ácido ascórbico.

Recomendaciones

Emplear el método optimizado para estimar el potencial antioxidante de metabolitos o productos naturales de interés.

Referencias bibliográficas

- ADAM, M., ELHASSAN, G. O. M. & YAGI, S. 2018. In Vitro Antioxidant and Cytotoxic Activities of 18 Plants from the Erkowit Region, Eastern Sudan. *Natural Products and Bioprospecting*, 8, 98- 101.
- ADERINOLA, T. A., FAGBEMI, T. N., ENUJIUGHA, V. N. & ALASHI, A. M. 2019. In vitro antihypertensive and antioxidative properties of trypsin-derived Moringa oleifera seed globulin hydrolyzate and its membrane fractions. *Food Sci Nutr.* , 7, 134.
- ADESULU-DAHUNSI, A. T., SANNI, A. I. & JEYARAM, K. 2017. Production, characterization and In vitro antioxidant activities of exopolysaccharide from Weissella cibaria GA44. *LWT - Food Science and Technology*, 6.
- AGREGAN, R., MUNEKATA, P. E., DOMINGUEZ, R., CARBALLO, J., FRANCO, D. & LORENZO, J. M. 2016. Proximate composition, phenolic content and in vitro antioxidant activity of aqueous extracts of the seaweeds Ascophyllum nodosum, Bifurcaria bifurcata and Fucus vesiculosus. Effect of addition of the extracts on the oxidative stability of canola oil under accelerated storage conditions. *Food Research International*, 8.
- ALI, H. M., ABO-SHADY, A., SHARAF ELDEEN, H. A., SOROR, H. A. & SHOUSHA, W. G. 2013. Structural features, kinetics and SAR study of radical scavenging and antioxidant activities of phenolic and anilinic compounds. *Chemistry Central Journal*, 7, 3-7.
- ALMULAIKY, Y., ZEYADI, M., SALEH, R. & BAOTHMAN, O. 2018. Assessment of Antioxidant and Antibacterial Properties in Two Types of Yemeni Guava Cultivars. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3-6.
- AMIC, D., DAVIDOVIC, D., BESLO, D., RASTIJA, V. & TRINAJSTIC, N. 2007. SAR and QSAR of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*, 14, 829.
- ARMAS GONZÁLEZ, Y. 2010. *Evaluación preclínica de la actividad diurética y antioxidante de extractos de Dichrostachys cinerea (L.) Wight & Arn.*, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.
- BANJARNAHOR, S. D. S. & ARTANTI, N. 2014. Antioxidant properties of flavonoids. *Med J Indones*, 23, 240-243.
- BASU, T., PANJA, S. & MANDAL, N. 2017. A natural antioxidant, tannic acid mitigates iron-overload induced hepatotoxicity in Swiss albino mice through ROS regulation. *Environmental Toxicology*, 3.
- BHATTACHARYYA, A., CHATTOPADHYAY, R., MITRA, S. & CROWE, S. E. 2014. Oxidative Stress: An Essential Factor In The Patogenesis Of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiol Rev* 94, 329-343.

Referencias bibliográficas

- BOUTENNOUN, H., BOUSSOUF, L., RAWASHDEH, A., AL-QAOU, K., ABDELHAFEZ, S., KEBIECHE, M. & MADANI, K. 2017. In vitro cytotoxic and antioxidant activities of phenolic components of Algerian *Achillea odorata* leaves. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 404-408.
- BUSSO CASATI, C. I. 2016. *Estabilidad de polifenoles y caracterización físico-química y sensorial en pulpas de frutos rojos en relación a los procesos tecnológicos para la obtención de alimentos e ingredientes alimenticios*. Universidad de Buenos Aires
- CALDERÓN PEÑA, A., ASPAJO VILLALAZ, C. & PRETEL SEVILLANO, O. 2018. Estrés oxidativo y especies reactivas. *Rebiol*, 38, 54-61.
- CÁRDENAS RODRÍGUEZ, N. & PEDRAZA CHAVERRI, J. 2005. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química* 17, 164-172.
- CHAABAN, H., IOANNOU, I., CHEBIL, L., SLIMANE, M. & GHOUL, M. 2016. Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids. *J Food Process Preserv*, 2-10.
- CHANG, S.-H., WUB, C.-H. & TSAI, G.-J. 2018. Effects of chitosan molecular weight on its antioxidant and antimutagenic properties. *Carbohydrate Polymers*, 181, 1027.
- CHOUDHURY, F. K., RIVERO, R. M., BLUMWALD, E. & MITTLER, R. 2016. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90, 857-865.
- DE QUEIROZ FERREIRA, A. D. 2017. DESENVOLVIMENTO DE EXPERIMENTO VERDE COM A QUÍMICA DO MOLIBDÊNIO AZUL. *Revista Eletrônica FACP*, 17.
- DELGADO FLORES, M. L. 2015. *CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN DOS ESPECIES DE PETROSELINUM CON DIFERENTES TRATAMIENTOS*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.
- DHINGRA, N., KAR, A., SHARMA, R. & BHASIN, S. 2017. In vitro antioxidative potential of different fractions from *Prunus dulcis* seeds: Vis a vis antiproliferative and antibacterial activities of active compounds. *South African Journal of Botany*, 108, 185-189.
- DÍAZ-RIVAS, J. O., ESPARZA-CARRILLO, C., GALLEGOS-INFANTE, J. A., ROCHA-GUZMÁN, N. E., GONZÁLEZ-LAREDO, R. F. & MORENO-JIMÉNEZ, M. R. 2019. Use of a thin falling film evaporator and its effect on the polyphenolic profile of salvilla (*Buddleja scordioides*) infusions. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 21, 109-112.
- DONTHA, S. 2016. A Review: Antioxydants Methods. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9, 13-18.
- ESSIEN, E. E., ANTIA, B. S., SOLOMON, A. U. & CHOUDHARY, M. I. 2017. In vitro Cytotoxic, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Adoninia merrilli* and *Archontopheonix tukeri* Fruit Pericarps. *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*, 5.

Referencias bibliográficas

- FURUNO, K., AKASAKO, T. & SUGIHARA, N. 2002. The Contribution of the Pyrogallol Moiety to the Superoxide Radical Scavenging Activity of Flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* , 25, 20-21.
- GHAGANE, S. C., PURANIK, S. I., KUMBAR, V. M., NERLI, R. B. & JALALPURE, S. S. 2017. In vitro antioxidant and anticancer activity of *Leea indica* leaf extracts on human prostate cancer cell lines. *Integrative Medicine Research*, 6, 81.
- GONZÁLEZ GONZÁLEZ, L. 2016. *Composición fenólica y actividad antioxidante de las hojas de Mosiera crenulata*. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.
- GROCHOWSKI, D. M., UYSALB, S., AKTUMSEK, A., GRANICA, S., ZENGINB, G. & CEYLANB, R. 2017. In vitro enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical profile of *Potentilla thuringiaca*. *Phytochemistry Letters*, 20, 368-370.
- GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ, R., REYES ESTRADA, C. A., MARTÍNEZ RODRÍGUEZ, J. L., LÓPEZ, J. A. & LAZALDE RAMOS, B. P. 2018. ESTRÉS OXIDATIVO: PROMOTOR DE ENFERMEDADES. *Revista electrónica semestral en Ciencias de la Salud*, 1, 3-6.
- HADDOUCHI, F., CHAOUCHE, T. M. & KSOURI, R. 2014. Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of aqueous methanolic extracts of *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* and *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12, 416-419.
- HEREDIA RUIZ, D., FERNÁNDEZ CARABALLO, D., ALFONSO RODRÍGUEZ, J. & BALLESTEROS HERNÁNDEZ, M. 2015. El estrés oxidativo en la insuficiencia renal asociada con hipertensión. *Rev Cubana Invest Bioméd*, 31, 16-25.
- HERNÁNDEZ BARRETO, E. 2019. *Actividad antioxidante y vascular de la flores de Kigelia africana (BENTH)*. Universidad de la Habana
- HONG-LIN, C., JING, Z., GUAN-JUN, Z. & JUN-PING, K. 2016. An optimized micro-assay of myosin II ATPase activity based on the molybdenum blue method and its application in screening natural product inhibitors. *Chinese Journal of Natural Medicines* 14, 421-426.
- INDO, H. P., NAKANISHI, I., MATSUMOTO, K., TAMURA, M., NAGANO, Y., MATSUI, H. & OKUDA, T. 2015. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J. Clin. Biochem. Nutr.* , 56, 2-6.
- IORIO, A., RENDINA, A., PORCELLI, C., BARGIELA, M. & GORGOSCHIDSE, L. 1991. Estabilidad del complejo azul de fosfomolibdeno influencia de la acidez del medio y tiempo de desarrollo del color *Rev. Facultad de Agronomía*, 12, 249-252.
- IQBAL, P., AHMED, D. & ASGHAR, N. A. 2014. A comparative in vitro antioxidant potential profile of extracts from different parts of *Fagonia cretica*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7, 474-475.

Referencias bibliográficas

- ISHTIAQ, S., AHMAD, M. & HANIF, U. 2014. Phytochemical and in vitro antioxidant evaluation of different fractions of *Amaranthus graecizans* subsp. *silvestris* (Vill.) Brenan. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7, 344.
- JAFRI, L., SALEEM, S., ULLAH, N. & MIRZA, B. 2017. In vitro assessment of antioxidant potential and determination of polyphenolic compounds of *Hedera nepalensis* K. Koch. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3700–S3705.
- JAVED, R., MOHAMED, A., YÜCESAN, B., GÜREL, E., KAUSAR, R. & ZIA, M. 2017. CuO nanoparticles significantly influence in vitro culture, steviol glycosides, and antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 3.
- KARUNA, D. S., DEY, P., DAS, S. & KUNDU, A. T. B. 2018. In vitro antioxidant activities of root extract of *Asparagus racemosus* Linn. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8, 62.
- KRUPASHREE, K., HEMANTH KUMAR, K., RACHITHA, P., JAYASHREE, G. V. & KHANUM, F. 2014. Chemical composition, antioxidant and macromolecule damage protective effects of *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth. *South African Journal of Botany*, 94, 251-254.
- KUMAR, S., YADAV, A. & YADAV, M. 2017a. Effect of climate change on phytochemical diversity, total phenolic content and in vitro antioxidant activity of *Aloe vera* (L.) Burm.f. *BMC Research Notes*, 10, 4.
- KUMAR, S., YADAV, M., YADAV, A. & YADAV, J. P. 2017b. Impact of spatial and climatic conditions on phytochemical diversity and in vitro antioxidant activity of Indian *Aloe vera* (L.) Burm.f. *South African Journal of Botany*, 111, 51-52.
- LAWSON, M., JOMOVA, K., PATRIK POPRAC, KAMIL KUČA, KAMIL MUSÍLEK & VALKO, M. 2017 Free Radicals and Antioxidants in Human Disease. *Nutritional Antioxidant Therapies: Treatments and Perspectives*, 12, 284-300.
- LIEN, E. J., REN, S., BUI, H.-H. & WANG, R. 1999. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 286-288.
- LIMMATVAPIRAT, C., CHAROENTEERABOON, J., WETWITAYAKLUNG, P. & SUKONPAN, C. 2011. Stability and antioxidant activity of polyphenols in methanolic extracts of *Sonneratia caseolaris* seeds. *Advanced Materials Research*, 146-147, 1062-1065.
- LONG, D.-L., BURKHOLDERM, E. & CRONIN, L. 2007. Polyoxometalate clusters, nanostructures and materials: From self assembly to designer materials and devices. *Chemical Society Reviews*, 36, 106-115.
- LU, Z., NIE, G., BELTON, P. S., TANG, H. & ZHAO, B. 2006. Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. *Neurochemistry International*, 48, 266-269.

Referencias bibliográficas

- LUAN, F., LI, Q., TAN, W., WEI, L., ZHANG, J. & DONG, F. 2017. The evaluation of antioxidant and antifungal properties of 6-amino-6-deoxychitosan in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 8.
- MUÑOZ MUÑOZ, J. A., MORGAN MACHADO, J. E. & TRUJILLO GONZÁLEZ, M. 2015. Validación de una metodología por HPLC para cuantificar quercetina total en extractos de *Calendula officinalis*. *Rev Cubana de Farmacia*, 49, 95-102.
- MURUGAN, R., PRABU, J., CHANDRAN, R. & SAJESH, T. 2016. Nutritional composition, in vitro antioxidant and anti-diabetic potentials of *Breynia retusa* (Dennst.) Alston. *Food Science and Human Wellness*, 5, 32-35.
- MUTHUKRISHNAN, S., SENTHIL KUMAR, T. & GANGAPRASAD, A. 2018. Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activity of wild and in vitro derived plants of *Ceropegia thwaitesii* Hook – An endemic species from Western Ghats, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16, 623.
- NAGOOR MEERAN, M. & HUSSAIN, A. Z. 2017. Synthesis, Characterization and DPPH Scavenging Assay of Isatin Related Spiroheterocyclic Compounds. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 642.
- NASCIMENTO, E. M. M., RODRIGUES, F. F. G., COSTA, W. D., BOLIGON, A. A., SOUSA, E. O. & RODRIGUES, F. F. G. 2017. HPLC and In vitro evaluation of antioxidant properties of fruit from *Malpighia glabra* (Malpighiaceae) at different stages of maturation. *Food and Chemical Toxicology* 6.
- NAVIA-PELAEZ, J. M., CAMPOS MOTA, G. P., ARAUJO DE SOUZA, J. C., COSTA AGUILAR, E., STERGIOPULOS, N. & AGGUM CAPETTINI, L. S. 2017. nNOS uncoupling by oxidized LDL: implications in atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 2-25.
- OBOH, G., OGUNSUYI, O. B. & OLONISOLA, O. E. 2017. Does caffeine influence the anticholinesterase and antioxidant properties of donepezil? Evidence from in vitro and in vivo studies. *Metab Brain Dis*, 3-7.
- PÉREZ ABRIL, M. 2017. *Estudio de la complejación de flavonoides en ciclodextrinas.*, Universidad Católica San Antonio de Murcia.
- PHULL, A.-R., MAJID, M., HAQ, I.-U. & KHAN, M. R. 2017. In vitro and in vivo evaluation of anti-arthritis, antioxidant efficacy of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Harvey Suringar). *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 470.
- PISOSCHI, A. M. & POP, A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 56-70.
- PRADHAN, S. & POKHREL, M. R. 2013. SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF PHOSPHATE IN SUGARCANE JUICE, FERTILIZER, DETERGENT AND WATER SAMPLES BY MOLYBDENUM BLUE METHOD. *Scientific World*, 11, 58-62.

Referencias bibliográficas

- PRIETO, P., PINEDA, M. & AGUILAR, M. 1999. Cuantificación espectrofotométrica de la capacidad antioxidante mediante la formación de un complejo de fosfomolibdeno: aplicación específica para la determinación de vitamina E1. *Bioquímica Analítica* 269, 338-340.
- RENUGADEVI, K., VALLI NACHIYAR, C. & SOWMIYA, P. 2018. Antioxidant activity of phycocyanin pigment extracted from marine filamentous cyanobacteria *Geitlerinema* sp TRV57. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 239.
- SINGH, S. & SINGH, R. P. 2008. In Vitro Methods of Assay of Antioxidant: A Review. *Food Reviews International*, 394-406.
- SITI HAWA, N., YUSOF, K. & KAMSIYAH, J. 2015. The Role of Oxidative Stress, Antioxidants and Vascular Inflammation in Cardiovascular Disease (A Review). *Vascular Pharmacology*, 2-13.
- SOKOLOVÁ, R., DEGANI, I., RAMEŠOVÁ, Š., BULÍČKOVÁ, J., HRMADOVÁ, M., GÁL, M., FIEDLER, J. & VALÁŠEK, M. 2011. The oxidation mechanism of the antioxidant quercetin in nonaqueous media. *ElectrochimActa*, 56, 7422-7425.
- TAJAMMAL, A., BATOOL, M., RAMZAN, A., SAMRA, M. M., MAHNOOR, I., VERPOORT, F. & IRFAN, A. 2017. Synthesis, antihyperglycemic activity and computational studies of antioxidant chalcones and flavanones derived from 2,5 dihydroxyacetophenone. *Journal of Molecular Structure*, 1148, 514.
- TIAN, S., HAO, C., XU, G., YANG, J. & SUN, R. 2017. Optimization conditions for extracting polysaccharide from *Angelica sinensis* and its antioxidant activities. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25, 768.
- TRIGUEROS FERNÁNDEZ, H. 2016. *Estudio de la solubilidad de la quercetina en agua bajo radiación por microondas*. Universidad de Valladolid.
- UDAYAPRAKASH, N. K., RANJITHKUMAR, M., DEEPA, S. & SRIPRIYA, N. 2015. Antioxidant, free radical scavenging and GC-MS composition of *Cinnamomum iners* Reinw. ex Blume. *Industrial Crops and Products*, 69, 176.
- UMAMAHESWARI, M. & CHATTERJEE, K. 2008. IN VITRO ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF THE FRACTIONS OF COCCINIA GRANDIS L. LEAF EXTRACT. *Afr. J. Traditional*, 5, 64.
- VALDÉS REYES, J. M., PADRÓN CHACÓN, R. & EL GHANNAM RUISÁNCHEZ, Y. 2016. Estrés oxidativo en las enfermedades bucales. *Rev Cubana Estomatol* 53, 1-8.
- VIADA PUPO, E., GÓMEZ ROBLES, L. & CAMPAÑA MARRERO, I. R. 2017. Estrés oxidativo. *Correo Científico Médico de Holguín*, 172-183.
- VIRDIS, A., DURANTI, E. & TADDEI, S. 2011. Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II. *International Journal of Hypertension*, 1, 1-5.

Referencias bibliográficas

- WANG, X., WANG, W., LI, L. & PERRY, G. 2014. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1842, 1241-1245.
- XU, Y., NIU, X., LIU, N., GAO, Y., WANG, L., XU, G., LI, G. & YANG, Y. 2017. Characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of degraded polysaccharides from blackcurrant(*Ribes nigrum* L.) fruits. *Food Chemistry*, 11.
- YATIRAJAM, V. & RAM, J. 1973. Separation of molybdenum from interfering elements by extraction as phosphomolybdenum blue. *Talanta*, 20, 885-889.
- ZENKEVICH, I. & GUSCHINA, S. 2010. Determination of dissociation constants of species oxidizable in aqueous solution by Air oxygen on an example of quercetin. *J Anal Chem* 65, 372–373.
- ZHANG, Z.-P., MA, J., HE, Y.-Y., LU, J. & REN, D.-F. 2018. Antioxidant and hypoglycemic effects of Diospyros lotus fruit fermented with *Microbacterium flavum* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2.
- ZHAO, H.-X., ZHANG, H.-S. & YANG, S.-F. 2015. Phenolic compounds and its antioxidant activities in ethanolic extracts from seven cultivars of Chinese jujube. *Food Science and Human Wellness*, 2-4.

Anexos:

Anexo 1: Prueba de Duncan para el análisis del desarrollo del color incubando a 90 °C empleando como agente reductor ácido ascórbico (0.15 mM).

<i>Duncan test; variable Abs (4 Temp vit C) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between</i>								
MS = .00044, df = 48.000								
t (min)	{0} 0.027	{5} 0.548	{10} 0.554	{15} 0.599	{20} 0.614	{25} 0.620	{30} 0.624	{60} 0.644
0		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.000		0.584	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.000	0.584		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
15	0.000	0.000	0.000		0.198	0.083	0.050	0.000
20	0.000	0.000	0.000	0.198		0.579	0.415	0.014
25	0.000	0.000	0.000	0.083	0.579		0.753	0.044
30	0.000	0.000	0.000	0.050	0.415	0.753		0.070
60	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.044	0.070	

Anexo 2: Prueba de Duncan para el análisis del desarrollo del color incubando a 65 °C empleando como agente reductor ácido ascórbico (0.15 mM).

<i>Duncan test; variable Abs (4 Temp vit C) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between</i>								
MS = .00222, df = 48.000								
t (min)	{0}	{5}	{10}	{15}	{20}	{25}	{30}	{60}
	0.02669	0.42064	0.54707	0.54893	0.56114	0.58186	0.58521	0.63586
0		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.000	0.000		0.942	0.603	0.215	0.184	0.002
15	0.000	0.000	0.942		0.630	0.224	0.196	0.002
20	0.000	0.000	0.603	0.630		0.415	0.374	0.008
25	0.000	0.000	0.215	0.224	0.415		0.895	0.047
30	0.000	0.000	0.184	0.196	0.374	0.895		0.050
60	0.000	0.000	0.002	0.002	0.008	0.047	0.050	

Anexo 3: Prueba de Duncan para el análisis del desarrollo del color incubando a 55 °C empleando como agente reductor ácido ascórbico (0.15 mM).

<i>Duncan test, variable Abs (4 Temp vit C) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between</i>								
MS = .00103, df = 48.000								
t (min)	{0}	{5}	{10}	{15}	{20}	{25}	{30}	{60}
0	0.02513	0.35321	0.58214	0.56886	0.57271	0.57157	0.57607	0.60243
0		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.000	0.000		0.498	0.608	0.580	0.725	0.242
15	0.000	0.000	0.498		0.834	0.875	0.706	0.091
20	0.000	0.000	0.608	0.834		0.947	0.845	0.119
25	0.000	0.000	0.580	0.875	0.947		0.807	0.114
30	0.000	0.000	0.725	0.706	0.845	0.807		0.153
60	0.000	0.000	0.242	0.091	0.119	0.114	0.153	

Anexo 4: Prueba de Duncan para el análisis del desarrollo del color incubando a 90 °C empleando como agente reductor quercetina (0.1 mM).

Duncan test; variable Abs (Quercetina) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00030, df = 16.000								
t (min)	{0}	{5}	{10}	{20}	{30}	{40}	{50}	{60}
0		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
30	0.000	0.000	0.000	0.000		0.312	0.086	0.004
40	0.000	0.000	0.000	0.000	0.312		0.392	0.028
50	0.000	0.000	0.000	0.000	0.086	0.392		0.120
60	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.028	0.120	

Anexo 5: Prueba de Duncan para el análisis del desarrollo del color incubando a 65 °C empleando como agente reductor quercetina (0.1 mM).

Duncan test; variable Abs (Quercetina) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00055, df = 16.000

t (min)	{0} – 0.02517	{5} – 0.08017	{10} – 0.17767	{20} – 0.32150	{30} – 0.42567	{40} – 0.48067	{50} – 0.49850	{60} – 0.52733
0		0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.011		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
30	0.000	0.000	0.000	0.000		0.011	0.002	0.000
40	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011		0.364	0.033
50	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.364		0.150
60	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.150	

Anexo 6: Prueba de Duncan para el análisis del desarrollo del color incubando a 55 °C empleando como agente reductor quercetina (0.1 mM).

*Duncan test, variable Abs (Quercetina) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error:
Between MS = .00021, df = 16.000*

t (min)	{0} 0.025	{5} 0.074	{10} 0.107	{20} 0.216	{30} 0.279	{40} 0.331	{50} 0.368	{60} 0.412
0		0,001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.001		0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.000	0.014		0,000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
30	0.000	0.000	0.000	0.000		0.001	0.000	0.000
40	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001		0.007	0.000
50	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007		0.002
60	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	

Anexo 7: Prueba de Duncan para el análisis del desarrollo del color incubando a 45 °C empleando como agente reductor ácido ascórbico (0.15 mM).

Duncan test, variable Abs (4 Temp vit C) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 0.00163, df = 48.000

t (min)	{0}	{5}	{10}	{15}	{20}	{25}	{30}	{60}
	0.02257	0.21464	0.43393	0.51021	0.50236	0.50093	0.50086	0.50600
0		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.000	0.000		0.002	0.005	0.005	0.003	0.003
15	0.000	0.000	0.002		0.735	0.701	0.706	0.846
20	0.000	0.000	0.005	0.735		0.948	0.949	0.867
25	0.000	0.000	0.005	0.701	0.948		0.997	0.827
30	0.000	0.000	0.003	0.706	0.949	0.997		0.832
60	0.000	0.000	0.003	0.846	0.867	0.827	0.832	