

# UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

## FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

### PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS  
OLEORRESINAS Y EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE *Curcuma longa* L.  
(Palillo) Y *Rosmarinus officinalis* (Romero)”

Tesis Presentada por la Bachiller:

**Zea Linares, Andrea Estefanía**

Para optar el Título Profesional de:

Químico Farmacéutico

Asesor: Jaime Cárdenas García,  
PhD

AREQUIPA - 2013

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios, por ser el pilar fundamental en mi vida.*

*A mi asesor, el Doctor Jaime Cárdenas García, por su constante apoyo y los consejos brindados, durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.*

*A las cuatro personas que más amo en este mundo: Henry, Rosmeri, Vanesa y Marco; por su amor incondicional, sus palabras de aliento y su constante apoyo.*

*A mis familiares y amigos por darme ánimos y compartir los momentos buenos y difíciles durante toda esta etapa.*

*A todas las personas que colaboraron en el desarrollo de este trabajo.*

*A las cuatro personas más importantes en mi vida.*



## INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
HIPÓTESIS .....	6
OBJETIVOS.....	7
CAPÍTULO I.....	8
1. MARCO TEÓRICO .....	8
1.1. Oleorresinas.....	8
1.2. Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) .....	12
1.3. Cúrcuma ( <i>Curcuma longa L.</i> ) .....	15
1.4. Compuestos Fenólicos .....	18
1.5. Radicales Libres .....	19
1.6. Estrés Oxidativo .....	23
1.7. Antioxidantes .....	27
1.8. Determinación de la Capacidad Antioxidante.....	36
CAPÍTULO II.....	40
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
2.1. Campo de Investigación.....	40
2.2. Materiales.....	40
2.3. Métodos.....	41
CAPÍTULO III .....	52
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
3.1. Extracción de Oleorresinas .....	52
3.2. Obtención de Extractos Etanólicos .....	53
3.3. Preparación de la Gráfica Estándar de Trolox .....	56
3.4. Determinación de la Capacidad Antioxidante de Oleorresinas y Extractos Etanólicos.....	58
3.5. Análisis Estadístico de los Resultados .....	61
CONCLUSIONES.....	71
RECOMENDACIONES .....	72

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73
ANEXOS .....	77



## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación, se obtuvieron oleorresinas y extractos etanólicos a partir de dos especias distintas, *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Curcuma longa L.* (palillo); las primeras se obtuvieron mediante el método de percolación, usando como solvente una mezcla de heptano y acetona en diferentes proporciones; (60:40), (70:30), (50:50) y (90:10), para luego poder comparar los rendimientos y las segundas, mediante el método de agitación por ultrasonido, utilizando etanol 96%. Se determinó la capacidad antioxidante, de las oleorresinas y extractos etanólicos obtenidos a partir de ambas especias, mediante el método ABTS [ácido-2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)].

El mayor rendimiento de la oleorresina de palillo se obtuvo con la proporción (60:40), para la oleorresina de romero el mayor rendimiento se consiguió con una mezcla de (50:50). Los menores rendimientos para ambas se obtuvieron con la mezcla (90:10).

Los rendimientos obtenidos de los extractos etanólicos secos fueron los más bajos, comparados a los rendimientos de las oleorresinas, ya sean de palillo o romero.

Los valores de capacidad antioxidante para las oleorresinas y extracto etanólico de palillo, oscilan entre 682.35 – 1060.00  $\mu\text{mol}$  de Trolox/ g de muestra. En el caso de las oleorresinas y extracto etanólico de romero, los valores de capacidad antioxidante oscilan entre 744.44 – 903.92  $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de muestra. En ambos casos, las oleorresinas obtenidas con proporción (60:40), fueron las que presentaron mayor capacidad antioxidante, mientras que las obtenidas con una proporción de solventes (90:10), presentaron menor capacidad antioxidante.

En este estudio se determina que las oleorresinas y extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Curcuma longa L.* (palillo), presentan una buena capacidad antioxidante; por lo tanto una dieta rica en estas especias, podría ayudar a mejorar la calidad de vida de las personas, para prevenir el desarrollo y la degeneración de enfermedades causadas por una sobreexposición a radicales libres; así como también, su uso podría ser de gran interés en las industrias, por su uso como conservantes en reemplazo de los antioxidantes sintéticos.

## ABSTRACT

In the present investigation, we obtained oleoresins and ethanol extracts from two different spices, *Rosmarinus officinalis* (rosemary) and *Curcuma longa L.* (turmeric) the first ones were obtained by percolation, using as solvent a mixture of heptane and acetone in different proportions (60:40), (70:30), (50:50) and (90:10) for compare the yields and the second one by ultrasonic agitation method, using 96% ethanol. Antioxidant activity was determined, the ethanol extracts and oleoresins from spices both by the ABTS method [acid-2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)].

The highest yield of oleoresin was obtained from turmeric to the ratio (60:40), to the oleoresin rosemary the highest yield was achieved with a mixture (50:50). The lower yields were obtained for both oleoresins using mixture (90:10).

The yields of dry ethanol extracts were the lowest, compared to oleoresins, whether rosemary or turmeric.

The antioxidant activity values for oleoresins and turmeric ethanolic extract, range between 682.35-1060 0.00 micromol of Trolox / g sample. In the case of oleoresins and rosemary ethanolic extract, antioxidant activity values range from 744.44 - 903.92 micromol Trolox / g of sample. In both cases, the oleoresin obtained ratio (60:40), were those which showed the highest antioxidant activity, whereas those obtained with a solvent ratio (90:10) exhibited lower antioxidant activity.

This study determined that oleoresins and ethanol extracts of *Rosmarinus officinalis* (rosemary) and *Curcuma longa L.* (turmeric), show good antioxidant activity, therefore a diet rich in these spices may help improve the quality of life of people, to prevent the development and degeneration of diseases caused by over-exposure to free radicals, and as well as its use could be of great interest in the industries, for use as preservatives to replace synthetic antioxidants.

## INTRODUCCIÓN

Las especias vegetales *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Curcuma longa L.* (palillo), presentan en su composición química diversos tipos de componentes, entre los que se encuentran los polifenoles, que presentan en su estructura química, varios grupos –OH, por lo que se les atribuye actividad antioxidante, ya que esos grupos, pueden ser donadores de electrones a los radicales libres, para poder neutralizarlos.

Las oleorresinas son sustancias que resultan de la mezcla de aceites esenciales y resinas, generalmente se obtienen de especias, como romero y palillo y pueden extraerse mediante diversas técnicas, según sea el caso, maceración, extracción por soxhlet, percolación, extracción con fluidos supercríticos, entre otras. Las oleorresinas poseen en su composición, sustancias de carácter volátil y no volátil, es decir contienen una serie de componentes, lo que permite que puedan tener varias aplicaciones y de este modo presentan características favorables para su inserción en la industria. El etanol es el solvente más común, para obtener extractos de plantas o especias, debido a su inocuidad y a que es un solvente polar capaz de captar gran cantidad de principios activos de plantas y/o especias diversas como por ejemplo, romero y palillo.

El estrés oxidativo es causado por una sobreproducción de radicales libres en nuestro organismo, estos radicales libres son productos secundarios de la respiración celular y es por ello que en nuestro organismo, existe diversos mecanismos antioxidantes de defensa para poder neutralizarlos. En los últimos años, el estrés oxidativo ha aumentado considerablemente, debido a la producción excesiva de radicales libres a causa de diversos factores; como, un estilo de vida no adecuado, la contaminación ambiental, radiación excesiva, exposición a xenobióticos y muchos otros factores, que aumentan la generación de radicales libres en nuestro organismo, desencadenando o empeorando enfermedades como la diabetes, enfermedades cardíacas, neurodegenerativas y cáncer.

Para revertir este proceso, juegan un papel muy importante los antioxidantes, que son captadores de radicales libres y de este modo inhiben el daño que produce en nuestro organismo, el estrés oxidativo. Nuestro organismo produce de forma endógena sustancias antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa,

transferrina, entre otras), pero cuando existe una sobreexposición a los factores que originan el estrés oxidativo, por lo tanto mayor generación de radicales libres; estos mecanismos antioxidantes endógenos ya no son suficientes para atenuar el estrés oxidativo; es por ello que es necesario incluir en nuestra dieta alimentos ricos en antioxidantes naturales.

Hoy en día, la demanda de consumo de los denominados alimentos funcionales, que contienen principios bioactivos o fitoquímicos con propiedades antioxidantes, ha aumentado, con la intención de tener una vida saludable y prevenir enfermedades causadas por el estrés oxidativo, los sistemas antioxidantes endógenos deben de ser también, complementados con las fuentes exógenas de antioxidantes, de esta manera se pueden neutralizar los radicales libres y a su vez evitar el desarrollo de enfermedades. Existen muchos alimentos que contienen dichos antioxidantes (ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, antocianinas, flavonoides, polifenoles, carotenoides) y estos a su vez podrían ser aislados bajo la forma de extractos, aceites esenciales u oleorresinas para su posterior uso en las industrias cosmética y alimentaria, para reemplazar a los antioxidantes sintéticos usados comúnmente (BHT, BHA, PG), ya que muchos de los oxidantes provienen de las sustancias químicas sintéticas.

Estos antioxidantes naturales son mucho más seguros para el ser humano que los sintéticos, si bien es cierto que no se han reportado reacciones adversas con el uso de los sintéticos, tampoco se ha demostrado que los antioxidantes sintéticos puedan tener la misma acción en nuestro organismo, como aquellos de origen natural, de ahí la importancia de fomentar el uso y consumo de antioxidantes naturales, esto porque los naturales podrían tener un mejor efecto biológico.

Por ello se realizó este estudio con el fin de determinar la actividad antioxidante de oleorresinas y extractos etanólicos obtenidos de dos especias accesibles y comunes en nuestro medio, como la *Curcuma longa* L. (palillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero), por presentar en su composición fitoquímica, polifenoles, a los cuales se les atribuye capacidad antioxidante y de esta manera puedan retardar el envejecimiento de las células y evitar el daño producido por los radicales libres, previniendo enfermedades degenerativas, incluyendo el cáncer; así como también para demostrar su capacidad como potenciales antioxidantes naturales que puedan reemplazar a los antioxidantes

sintéticos en la industria alimentaria y cosmética, evitando los procesos de degradación de sus productos, a causa de procesos oxidativos.



## HIPÓTESIS

Dado que la literatura refiere que el *Rosmarinus officinalis* “romero” y la *Curcuma longa L.* “palillo”, presentan en su composición química polifenoles; es probable que los componentes presentes en las oleorresinas y extractos etanólicos de ambas especias, presenten capacidad antioxidante.



## OBJETIVOS

1. Obtener oleorresinas y extractos etanólicos de *Curcuma longa L.* (palillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero).
2. Determinar la actividad antioxidante, mediante el método ABTS [ácido-2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)] de las oleorresinas y extractos etanólicos obtenidos, de las especias ya mencionadas.
3. Comparar los resultados obtenidos de capacidad antioxidante para las muestras de *Curcuma longa L.* (palillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero).



# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. OLEORRESINAS

Las oleorresinas son sustancias de naturaleza líquida densa o semisólidas que se obtienen a partir de especias, que contienen mezclas homogéneas de resinas y aceites esenciales. Se obtienen mediante el tratamiento de la droga seca con solventes. En su composición presentan los aceites esenciales, aceites fijos, compuestos resinosos, coloreados, entre otros. Constituyen las verdaderas esencias de las especias en su forma más concentrada y contienen gran variedad de compuestos volátiles y no volátiles (aceites esenciales, aceites fijos, colorantes y principios activos de la planta), los cuales caracterizan el sabor, color y aroma de materias primas naturales. <sup>[1,2]</sup>

Las resinas o productos resinosos, son estructuras amorfas y con consistencia sólida o semisólida. Están formadas por mezclas complejas de sustancias sin coherencia química, es decir, de naturaleza variada, que pueden ser productos de secreción de la planta o productos de extracción del vegetal. Son insolubles en agua, generalmente solubles en alcohol. No son extraíbles mediante destilación por arrastre de vapor. Las resinas están principalmente compuestas por alcoholes aromáticos, alcoholes terpénicos, ácidos alifáticos, ácidos aromáticos, ácidos terpénicos, ésteres y otras sustancias.

Los aceites esenciales son productos volátiles de naturaleza compleja, aromáticos, elaborados por ciertos vegetales, a los que confieren un aroma agradable. Los aceites esenciales suelen ser insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos apolares, por tener un carácter lipófilo. Son solubles también en alcoholes de alta graduación. Se extraen mediante destilación por arrastre de vapor, tienen un índice de refracción elevado y actividad óptica.

Hoy en día, las oleorresinas, son de gran interés para las industrias alimentaria y farmacéutica, por sustituir a las especias, conservando sus propiedades farmacológicas y con amplias ventajas (estabilidad, uniformidad química e inocuidad microbiológica, facilidad de incorporar al producto terminado).

#### 1.1.1. Método de Extracción de Oleorresinas

La extracción de oleorresinas puede realizarse mediante diversos métodos, estos pueden ser métodos de extracción con disolvente y métodos de extracción con gases.

#### 1.1.1.1. Extracción con disolventes

La extracción con disolventes consiste en poner en contacto la droga, con un disolvente que es capaz de solubilizar los principios activos de la droga. Algunos ejemplos de métodos que utilizan la extracción con disolventes, son la extracción por soxhlet, percolación, maceración, entre otros. Este tipo de extracción es la que se emplea con mayor frecuencia. Para que una extracción con disolventes se lleve a cabo correctamente se deben tener en cuenta diversos factores: <sup>[1]</sup>

- *Características de la droga:* La droga debe de estar seca y con un grado de división adecuado, según la droga que se utilice, para facilitar el contacto.
- *Temperatura:* El aumento de temperatura favorece la extracción de principios activos, pero no es posible usar temperaturas altas para la extracción de principios activos que son termolábiles.
- *Control de la difusión celular:* Una correcta difusión se consigue cuando la droga ofrece un grado de división adecuado y cuando se renueva correctamente el disolvente utilizado en las extracciones.
- *Tiempo de contacto entre la droga y el disolvente:* Este es dependiente del tipo de droga y la naturaleza de los principios activos.
- *Medio Ambiente:* Se debe tratar de seleccionar a solventes que puedan ser reciclados y sean menos contaminantes que otros.
- *Naturaleza del disolvente:* Los solvente más usados son el agua y mezclas hidroalcohólicas debido a la inocuidad y estabilidad de sus extractos; pero también se pueden usar solventes de tipo orgánico.

De acuerdo a la bibliografía revisada, los solventes más adecuados para la extracción de oleorresinas, son aquellos lo suficientemente lipofílicos e hidrofílicos; de modo que, puedan captar la parte oleosa y resinosa de la planta o especia. Dentro del grupo de estos solventes están aquellos como el hexano, heptano, acetona, alcohol isopropílico, etanol, acetato de etilo, entre otros; que son los que se usan más comúnmente para la extracción de oleorresinas.

En el presente trabajo se seleccionaron dos solventes, heptano y acetona, para ser usados en diferentes proporciones en la extracción de oleorresinas; así como también, se obtuvieron extractos etanólicos a partir de las mismas muestras.

La mezcla de heptano y acetona, suele ser muy adecuada, práctica y eficaz, debido a diversos factores: <sup>[3]</sup>

- Sus puntos de ebullición son diferentes, lo que favorece su eliminación a un punto medio central de temperatura (77°C).
- No forman mezclas azeotrópicas.
- Ambos presentan una volatilidad suficiente, para ser eliminados en el rotavapor.
- El heptano, a diferencia del hexano, es un solvente más ecológico, por presentar menor toxicidad y presentar menor volatilidad.
- La acetona también es un solvente más aceptable ecológicamente, debido a que su recuperación y reciclaje no son complejos.
- Un sistema que combine ambos solventes, heptano y acetona; resulta ser eficiente y amigable con el medio ambiente, por la posibilidad del reciclaje de ambos solventes. Así como también, el uso adecuado de estos podría conllevar a beneficios económicos de laboratorios e industrias.

El etanol y el agua, son los solventes por excelencia, debido a su inocuidad y porque permiten el desarrollo de un método ambientalmente sostenible. Se ha demostrado en estudios anteriores, que estos solventes extraen de manera adecuada, componentes que poseen actividad antioxidante y brindan un buen rendimiento; dependiendo del tiempo, temperatura, método, entre otros. <sup>[4]</sup>

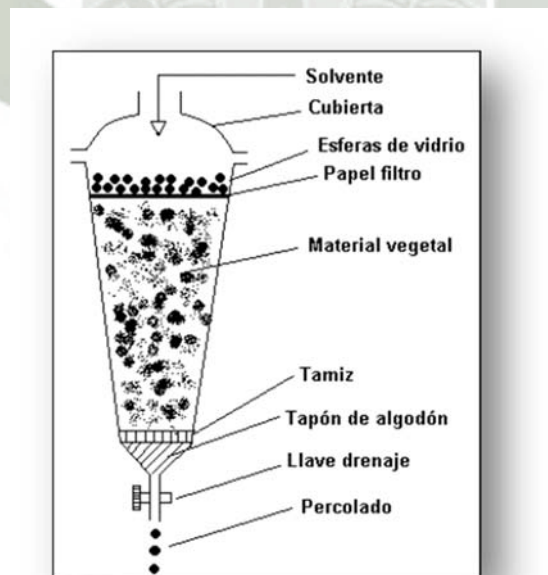
#### 1.1.1.2. Percolación

Es un procedimiento que se realiza a temperatura ambiente. La droga se coloca en una columna y está en contacto permanentemente con el disolvente, que gotea por la parte superior de la columna y atraviesa toda la zona, donde se encuentra la droga con los principios activos. La percolación es un método de extracción con disolventes de tipo continuo, porque el disolvente usado se renueva y actúa en una sola dirección; así en todo momento, existe un desequilibrio entre la concentración de la droga y el disolvente, lo que produce una difusión celular. La percolación puede llegar a conseguir extracciones prácticamente completas, pero con un elevado gasto de disolvente. <sup>[1]</sup>

Este método utiliza un equipo llamado lixiviador o percolador, que es equivalente a un embudo de decantación; si bien es cierto, dentro de esta técnica de extracción, existe una previa maceración, la diferencia es que en este caso el disolvente se renueva y este corre de arriba a abajo a través de la materia prima, el disolvente puro desplaza al que contiene la sustancia extraída, sin ser necesario aplicar presión. La calidad del extracto depende, al igual que la maceración; del grado de finura del material vegetal, la velocidad de difusión de las sustancias activas desde el vegetal al disolvente y en la velocidad de pasaje del disolvente. [1]

En este embudo se coloca una cantidad adecuada de material vegetal pulverizado, para luego proceder a humectarlo con el solvente extractor. La operación anterior se realiza con la llave cerrada, luego de transcurrido el tiempo de contacto de la muestra con el solvente, se procede a la recuperación del extracto, abriendo la llave, regulando el goteo y recuperando la misma cantidad en ml de extracto, que se usó de solvente.

Generalmente en la parte inferior del “embudo” se coloca un poco de algodón, para que sirva de filtro, enseguida la muestra y por encima papel filtro con algún peso encima para que fomente mayor contacto de la muestra con el solvente. El arreglo experimental queda como se muestra en la Figura 1.1.



*Figura N° 1.1. Arreglo Experimental de la Percolación*

### 1.1.1.3. Extracción con gases en condiciones supercríticas

En este tipo de extracción se trabaja con dispositivos especiales donde es posible controlar la presión y la temperatura, se trabaja a presiones y temperaturas superiores a las críticas.

### 1.1.2. Aplicaciones y usos de las oleorresinas

Las oleorresinas en su composición, presentan aceites volátiles, aceites fijos, sustancias resinosas y compuestos colorantes de las especias. Son muy estables y muchas de ellas presentan propiedades antibacterianas y antifúngicas. Debido a estas características y por presentar muchas ventajas, su utilización es de gran interés para las industrias alimentaria y farmacéutica.

Las oleorresinas son bastante usadas en la industria alimentaria, como saborizantes y colorantes, también pueden ser mejoradas por la adición del aceite esencial o aceites vegetales comestibles. Este proceso busca reconstituir el patrón en relación al aroma y sabor observados en la droga vegetal para atender a las conveniencias de la industria alimentaria. <sup>[1]</sup>

## 1.2. ROMERO (*Rosmarinus officinalis*)

### 1.2.1. Características

Es un arbusto leñoso con hojas lineales, puntiagudas y coráceas. Las hojas tienen la epidermis inferior recubierta de pelos tectores, pluricelulares y ramificados, por lo que se aprecia una fina pelusa plateada en el envés. Ambas epidermis de la hoja poseen pelos secretores, que hacen que toda la planta desprenda un agradable aroma alcanforado. <sup>[1,5]</sup>



Figura N° 1.2. Planta de Romero

### 1.2.2. Clasificación taxonómica

- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Asteridae
- Orden: Lamiales
- Familia: Labiataceae
- Subfamilia: Nepetoideae
- Tribu: Mentheae
- Género: *Rosmarinus*
- Especie: *Rosmarinus officinalis*

### 1.2.3. Composición Química

La droga contiene entre 10 y 25 ml/kg de aceite esencial cuyos constituyentes principales son cineol, alcanfor,  $\alpha$ -pineno, borneol y canfeno en proporciones variables. Contiene compuestos fenólicos, como flavonoides (heterósidos de luteolol, diosmetol y flavonas) y ácidos fenólicos, sobretodo derivados cafeicos: ácido cafeico, clorogénico y rosmarínico. El romero también se caracteriza por la presencia de diterpenos tricíclicos: ácido carnosólico y carnosol, mayoritariamente, rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, rosmaridinidifenol, rosmari-quinona, rosmadial, etc., así como triterpenos (ácido ursólico y oleanólico).

- Esencia: 1-2%. Esta formada principalmente por derivados de tipo terpénico: hidrocarburos como el pineno, alcoholes como el borneol y sus ésteres, o cetonas, como el alcanfor (15-25%).

- **Ácido Rosmarínico:** 3%. Es un derivado fenólico, éster del ácido cafeico y el alcohol 2-hidroxidihidrocafeico con propiedades antioxidantes.
- **Flavonoides:** tanto libres como en forma de heterósidos. Destacan sobre todo la apigenina y la luteolina.
- **Picrosalvina o carnosol:** es una lactona diterpénica con carácter amargo.
- **Derivados triterpénicos:** son cuantitativamente importantes y destaca el ácido ursólico(2-4%).

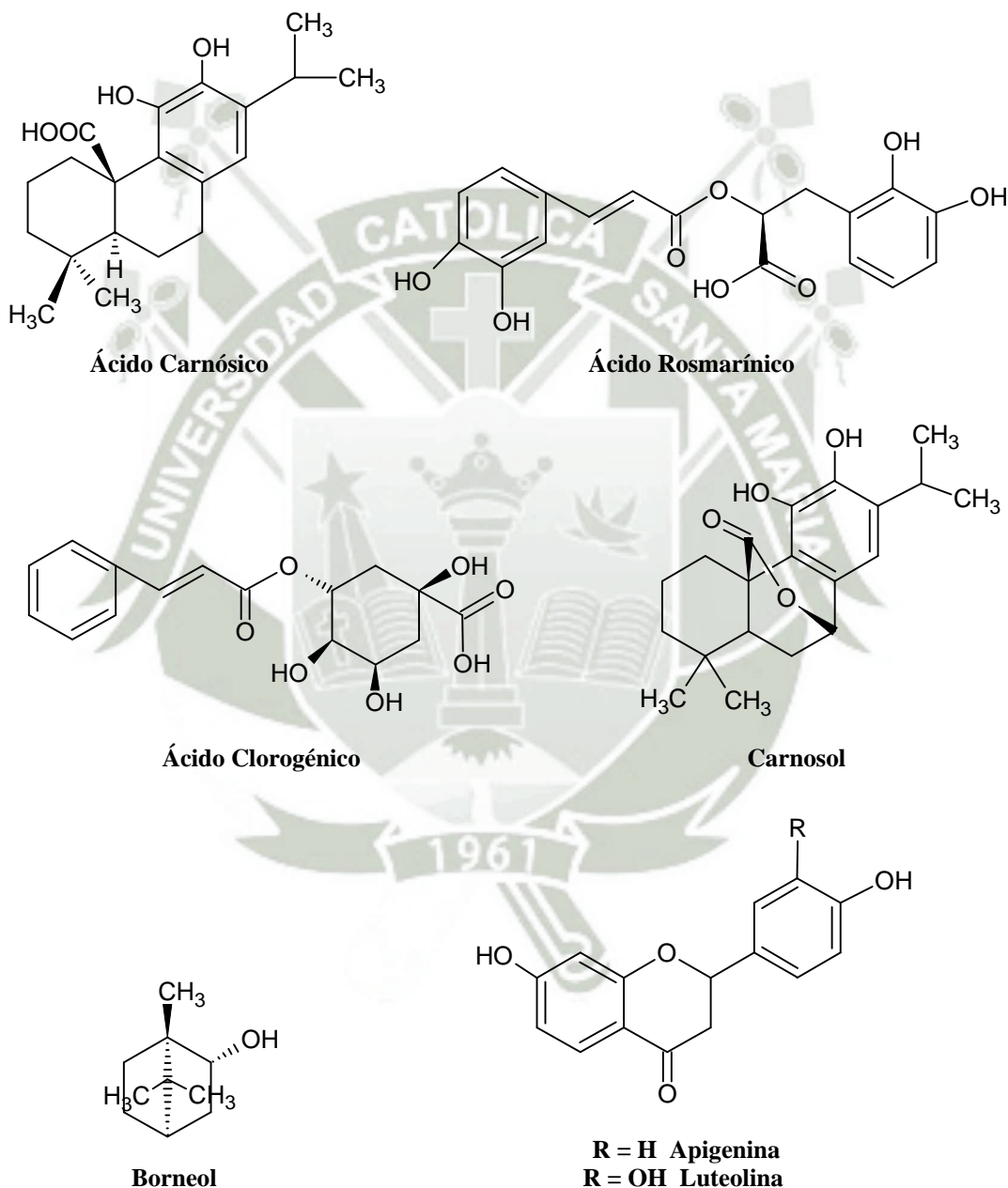


Figura N° 1.3. Estructuras Químicas de los Componentes del Romero

#### 1.2.4. Acción farmacológica

El principio activo es el ácido rosmarínico, pero su acción está potenciada por la presencia de los flavonoides; al aceite esencial se le atribuyen propiedades antibacterianas y antifúngicas. El ácido rosmarínico es antiinflamatorio y antioxidante, potenciado por los o-difenoles diterpénicos (carnosol, ácido carnósico) [6], que también se encuentran presentes en el romero. Siendo estos mucho más potentes que los antioxidantes sintéticos.

#### 1.2.5. Empleos

Es usado para aliviar trastornos digestivos, para facilitar las funciones de eliminación digestiva y urinaria, así como también por su efecto colerético y colagogo. Podría ser usado en la industria alimentaria por sus propiedades antioxidantes y conservantes.

### 1.3. CÚRCUMA (*Curcuma longa* L.)

#### 1.3.1. Características

Es una planta herbácea de la familia de las zingiberáceas. Vivaz por su rizoma, la cúrcuma posee grandes hojas envainadoras con limbo elíptico y penninervado. Las flores amarillas, agrupadas en una espiga bracteada, poseen una corola con el pétalo posterior desarrollado, el androceo reducido a un estambre fértil y a estaminoides que forman un labelo petaloide, un gineceo con tres carpelos.

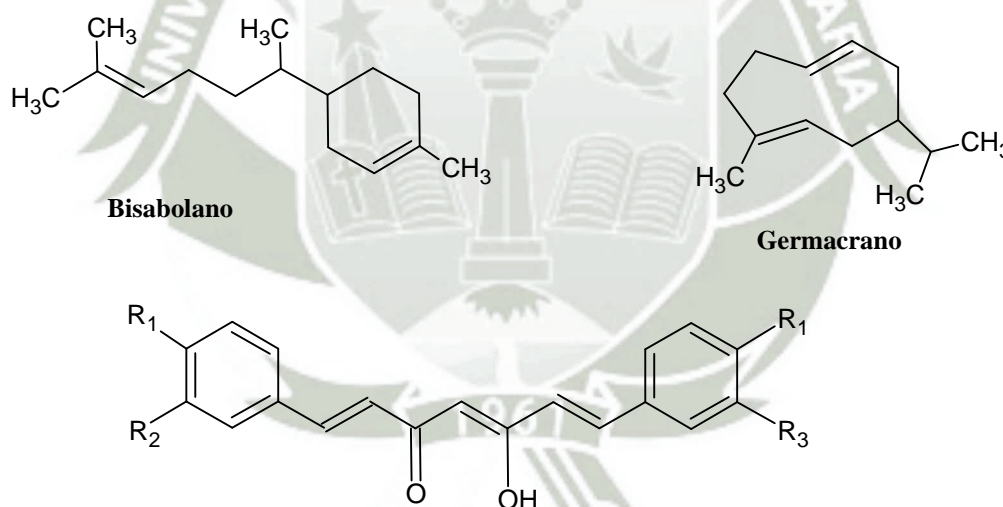
Actualmente se cultiva en varias partes del mundo, pero principalmente en la India. [1,5]



*Figura N° 1.4. Raíces de Palillo*

### 1.3.2. Composición Química

Rico en almidón (45-55%) y entre un 25 y 60 mg/kg de aceite esencial con sesquiterpenos monocíclicos: hidrocarburos (zingibereno,  $\beta$  y  $\gamma$ -curcumeno, *ar*-curcumeno) y sobretodo, derivados oxigenados: turmerona, curlona,  $\alpha$  y  $\gamma$ -atlantonas, también señala la presencia de derivados monoterpénicos. Los sesquiterpenos (bisabolanos y germacrano), se encuentran también en la oleorresina. Los principios colorantes de la droga son los curcuminoides. Estas moléculas se encuentran en cantidades variables, dependiendo del cultivar y pueden llegar a alcanzar hasta un 8%. El compuesto mayoritario es la curcumina (50-60%) ó [(E,E)-1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona], a esta también se le atribuye la mayor capacidad antioxidante.<sup>[7]</sup> Los demás pigmentos importantes son la demetoxicurcumina [feruloil-(4-hidroxinamoil)-metano] y la bismetoxicurcumina [bis-(4-hidroxinamoil)-metano]. En menor cantidad está presente la dihidrocurcumina [1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-hepteno-3,5-diona].<sup>[1,5]</sup>



Cuando  $R_1 = OH$ ,  $R_2 = OMe$  y  $R_3 = OMe$  CURCUMINA

Cuando  $R_1 = OH$ ,  $R_2 = OMe$  y  $R_3 = H$  DIMETOXICURCUMINA

Cuando  $R_1 = OH$ ,  $R_2 = H$  y  $R_3 = H$  BIS DIMETOXICURCUMINA

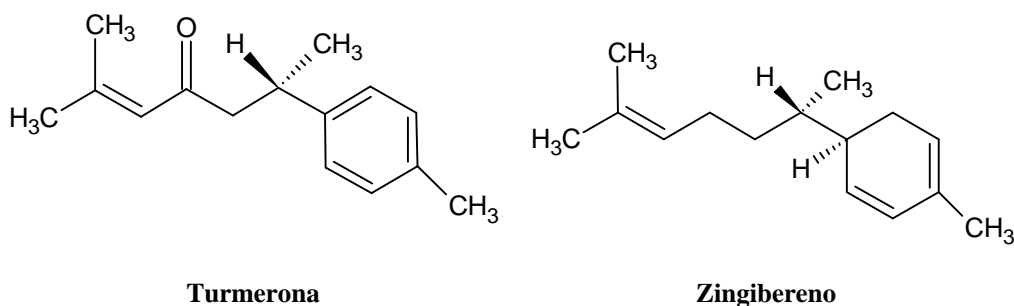


Figura N° 1.5. Estructura Química de los Componentes del Palillo

### 1.3.3. Clasificación Taxonómica

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Liliopsida
- Subclase: Zingiberidae
- Orden: Zingiberales
- Familia: Zingiberaceae
- Género: *Curcuma*
- Especie: *Curcuma longa*

### 1.3.4. Propiedades farmacológicas

La actividad antiinflamatoria de la curcumina ha sido demostrada en diversos estudios, aunque su mecanismo aún no está bien explicado, se cree que ejerce esta actividad debido a la inhibición del aumento de la actividad de las enzimas lisosomales, actividad sobre la síntesis de prostaglandinas, interferencia en la respuesta de los granulocitos a estímulos con el proceso inflamatorio. A nivel estomacal la curcumina tiene un efecto antiulceroso y citoprotector. <sup>[1,5]</sup>

### 1.3.5. Empleos

La curcumina puede ser usada como colorante alimenticio, siendo un colorante atóxico autorizado (E100) termoestable, poco sensible a variaciones de pH, se utiliza tanto el polvo de rizoma, como la oleorresina, como extractos y disoluciones de curcumina de contenido variable, a veces adsorbidos sobre hidrocoloides.

En farmacia, el rizoma de cúrcuma puede formar parte de la composición de fitomedicamentos que poseen las siguientes indicaciones: empleados tradicionalmente

como colerético o colagogo, en el tratamiento sintomático de trastornos digestivos funcionales de origen hepático y para estimular el apetito. [1,5]

#### 1.4. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas, de los que se identificado más de 8000 que difieren en estructuras químicas y en actividad. [8] Presentan en su estructura como elemento común, un anillo benceno hidroxilado, que puede incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. [9,10]

Los compuestos fenólicos, pueden clasificarse en 3 grandes grupos: fenoles simples y ácidos fenólicos, derivados del ácido cinámico y flavonoides. [11]

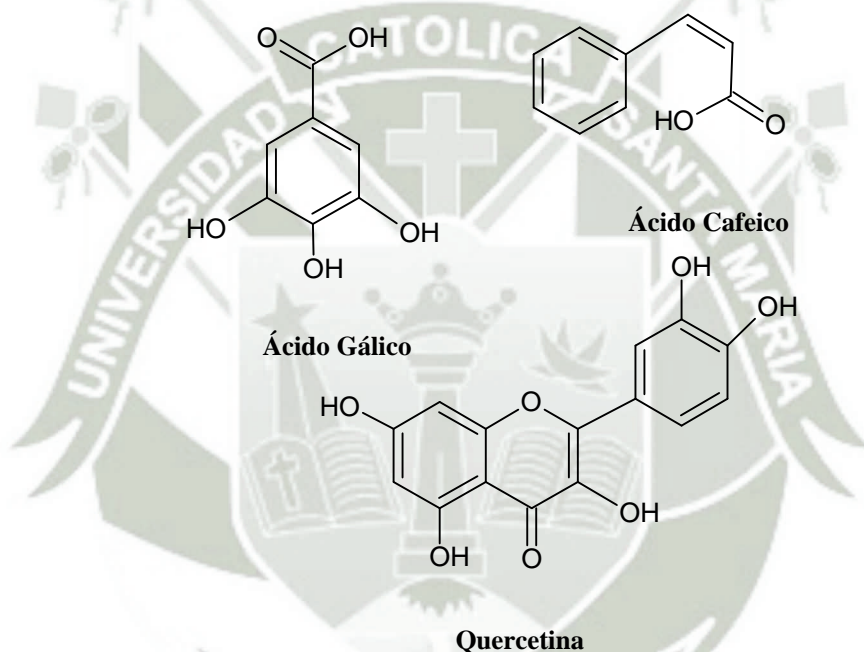


Figura N° 1.6. Diferentes estructuras de los Polifenoles

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos está determinada por su estructura química, por lo que existen grandes diferencias entre un compuesto y otro. Los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes, mediante dos mecanismos:

*Como captadores de radicales libres*, pueden actuar como donantes de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre, en reacciones de terminación que rompen el ciclo de generación de nuevos radicales; deteniendo las reacciones en cadena, originadas por los radicales libres. Al ceder este átomo de hidrógeno, se da lugar a la formación un radical intermediario, el cual es relativamente

estable debido a la resonancia con los electrones del anillo aromático, presente en estas sustancias. Los antioxidantes fenólicos actúan tanto en la etapa de iniciación, como en la etapa de propagación de la peroxidación lipídica, por su rápida donación de átomos de hidrógeno, a los radicales libres. [12,13]

*Como captadores de iones metálicos (hierro y cobre), por lo tanto pueden inhibir la generación de radicales libres.* [14,15]

Los compuestos fenólicos están asociados con la calidad sensorial y nutricional de los alimentos vegetales. Los polifenoles contenidos en los antioxidantes son abundantes en la dieta y juegan un rol importante, en la prevención de enfermedades producidas a causa del estrés oxidativo, incluyendo las enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, cáncer y accidente cerebro vascular (ACV). También se les atribuye actividades biológicas, como vasodilatadores, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, bactericidas, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, antivirales, efectos estrogénicos e inhibidores de enzimas prooxidantes. [15,16]

Finalmente, algunos polifenoles, además de su propia acción antioxidante, pueden potenciar las actividades de enzimas antioxidantes, como la genisteína, una isoflavona que potencia la catalasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa y la SOD.

### 1.5. RADICALES LIBRES

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. [17]

Los radicales libres están definidos como moléculas, o fragmentos de moléculas, que contienen uno o más electrones desapareados. Este electrón desapareado es inestable y por lo general da un grado significativo de reactividad al radical libre. Existen dos grupos de clasificación de los radicales libres, las especies reactivas del oxígeno y las especies reactivas de nitrógeno. A su vez también existe un grupo, que son llamados las especies no-radicales reactivas, que no son considerados como radicales libres, pero son dañinos para la salud y a partir de estos se pueden generar radicales libres. [17,18]

Tabla N° 1.1. Clasificación de Radicales Libres

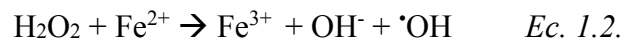
<b>Tipos de Radicales Libres</b>	
<b>Especies Reactivas de Oxígeno (EROS)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Radical Superóxido (<math>O_2^{\bullet}</math>)</li> <li>- Radical Hidroxil (<math>\bullet OH</math>)</li> <li>- Radical Peroxil (<math>ROO^{\bullet}</math>)</li> </ul>
<b>Especies Reactivas de Nitrógeno (ERNS)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Óxido Nítrico (<math>NO^{\bullet}</math>)</li> <li>- Dióxido de Nitrógeno (<math>NO_2^{\bullet}</math>)</li> </ul>
<b>Especies No-Radicales Reactivas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peróxido de Hidrógeno (<math>H_2O_2</math>)</li> <li>- Ozono (<math>O_3</math>)</li> <li>- Oxígeno Singulete (<math>^1O_2</math>)</li> <li>- Acido Hipocloroso (<math>HOCl</math>)</li> <li>- Acido Nitroso (<math>HNO_2</math>)</li> <li>- Trióxido de Dinitrógeno (<math>N_2O_3</math>)</li> </ul>

A partir de las especies no- radicales reactivas, se da lugar a la generación de radicales libres, por su interacción con otras moléculas, como es el caso de las reacciones que se muestran a continuación:

- *Reacción de Haber Weiss:*



- *Reacción de Fenton:*



### 1.5.1. Producción de radicales en nuestro organismo

Los radicales libres se forman en condiciones fisiológicas y en proporciones controlables por los mecanismos de defensa celulares de nuestro organismo. La producción de radicales libres en nuestro organismo es continua, por ello para contrarrestar sus efectos, debe de existir un equilibrio entre radicales libres y antioxidantes tanto endógena como exógenamente.

La producción de radicales libres en nuestro organismo se da a causa de factores endógenos y factores exógenos, los cuales se señalan a continuación: [18,19]

- En respuesta al ataque de patógenos, las células del sistema inmunitario generan especies reactivas de oxígeno.
- En procesos metabólicos, los radicales libres pueden ser generados en el metabolismo del ácido araquidónico, plaquetas y macrófagos.
- La peroxidación lipídica, esta es una importante fuente de radicales libres.
- En procesos inflamatorios, en donde los macrófagos liberan citoquinas y estas pueden producir la liberación de radicales libres.
- La contaminación, disolventes químicos, contaminantes gaseosos, contaminantes acuáticos, entre otros.
- El estrés, en el que se generan radicales libres como subproducto, además las hormonas que participan en este proceso (cortisol y catecolamina), pueden degenerar en radicales libres.
- La radiación, una exposición a la radiación UV, rayos X, rayos gamma, radiaciones de microondas, puede conducir a la generación de radicales libres.
- Factores alimenticios, el consumir alimentos que contengan aditivos y conservantes, alcohol, alimentos a la parrilla, azúcar en exceso, alimentos con exceso de grasa, aceites vegetales hidrogenados, pesticidas, alimentos procesado, conducen a una generación de radicales libres.
- Toxinas y drogas, como el tetracloruro de carbono, paraquat, benzopireno, anilina, tolueno, drogas como la bleomicina, mitomicina C, nitrofurantoína, dan lugar a la producción de radicales libres.

- Otros factores, como contaminación por gases de vehículos en mal estado, humo del tabaco, entre otras.

### 1.5.2. Sistema de defensa contra los radicales libres en nuestro organismo

Existen cinco niveles de defensa: [20,21]

- *Primer nivel*, consiste en evitar la reducción univalente del oxígeno, mediante sistemas enzimáticos, capaces de efectuar la reducción tetravalente consecutiva, sin liberar los intermediarios parcialmente reducidos. Esto lo logra con gran eficiencia el sistema citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial, responsable de más del 90% de la reducción del oxígeno en el organismo humano.
- *Segundo nivel*, está constituido por enzimas que captan al radical anión superóxido ( $O_2^-$ ), como la SOD, que es una metaloenzima que cataliza la dismutación del radical anión superóxido para dar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno.
- *Tercer nivel*, dado por un grupo de enzimas que neutralizan el peróxido de hidrógeno. En este grupo se encuentra la catalasa, que cataliza la reacción del peróxido de hidrógeno para dar oxígeno y agua; y la glutatión-peroxidasa, que cataliza la reacción de glutatión reducido con peróxido de hidrógeno para dar glutatión oxidado y agua.
- *Cuarto nivel*, el radical hidroxilo producido por la reacción de Haber-Weiss, puede ser neutralizado por la vitamina E ó la vitamina C.
- *Quinto nivel*, una vez producido el daño molecular, existe un quinto nivel de defensa, que es el nivel de reparación, mediante mecanismos enzimáticos.

### 1.5.3. Enfermedades asociadas a radicales libres

El daño producido por los radicales libres puede dar lugar al desarrollo o exacerbación de enfermedades, como ya se había mencionado en la parte de estrés oxidativo. Los radicales libres están involucrados en diversos y amplios procesos, que comprometen la salud de nuestro organismo: [20,21]

- Aparato cardiovascular: aterosclerosis, infarto del miocardio, cirugía cardíaca, diabetes, cardiopatía alcohólica.
- Sistema neurológico: enfermedad de Parkinson, Alzheimer, neuropatía alcohólica, hiperoxia, isquemia o infarto cerebral.
- Aparato ocular: cataratas, daño degenerativo de la retina.
- Aparato respiratorio: síndrome de dificultad respiratoria, cáncer de pulmón.
- Artritis reumatoidea.
- Riñón: síndrome autoinmune, nefrotoxicidad por metales.

## 1.6. ESTRÉS OXIDATIVO

El oxígeno es un elemento indispensable para la vida, desempeña un rol importante en varios fenómenos biológicos; pero así como es esencial para la vida, también puede causar daño en la célula mediante fenómenos oxidativos. El oxígeno es usado por la célula para generar energía bajo la forma de ATP (adenosin-trifostato) en las mitocondrias, como consecuencia de esto, se forman como intermediarios, los radicales libres. Alrededor del 5% del oxígeno inhalado se convierte en especies radicales de oxígeno, dañinas para nuestro organismo. <sup>[18]</sup>

El estrés oxidativo es un estado de la célula, en el cual se encuentra alterada la homeostasis de óxido-reducción intracelular, es decir, el balance entre prooxidantes y antioxidantes. Este desbalance se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) y por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, conduciendo a daño celular, que a su vez puede dar lugar al desarrollo de enfermedades, así como también, a la exacerbación de algunas de ellas, como son las enfermedades crónicas y de tipo degenerativo. <sup>[18]</sup>

Entonces, el estrés oxidativo es el desequilibrio entre el nivel de prooxidantes y antioxidantes en nuestro organismo, habiendo una mayor cantidad de los primeros, esto puede darse a causa de una producción aumentada de radicales libres ó por una deficiencia de antioxidantes en nuestro organismo. Las especies reactivas de oxígeno (EROS) son los subproductos resultantes del proceso redox de la respiración celular. Las especies reactivas de nitrógeno (ERNS) ( $\text{NO}^{\bullet}$ , radical óxido nítrico y  $\text{ONOO}^{\bullet}$ , peroxinitrito), también son producidas en procesos metabólicos normales del organismo, como la acción de la enzima óxido nítrico sintetasa a partir del aminoácido L-arginina que genera el  $\text{NO}^{\bullet}$  y a partir de la oxidación de éste se produce el

peroxinitrito. <sup>[18,22,23]</sup> El potencial tóxico de estos está relacionado con reacciones que conllevan a la formación del radical hidroxilo.

Estas especies juegan un doble rol en nuestro organismo, de este modo a niveles bajos o moderados ejercen efectos beneficiosos sobre la señalización redox celular y la función inmune; pero en concentraciones elevadas, desencadenan estrés oxidativo, que puede dañar la estructura y función celular, por ello el equilibrio entre ambos es un aspecto clave de la vida. Se ha demostrado científicamente que la presencia de este tipo de estrés oxidativo es causa o consecuencia de más de 250 enfermedades. <sup>[17,18]</sup>

Debido a este desbalance, se exagera la producción de radicales libres hasta volverse descontrolada, dando lugar así, a daño de moléculas, células y órganos, o algún daño de tipo irreversible. Este daño puede darse a nivel de proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos.

#### 1.6.1. Daño de proteínas

Todas las proteínas son potenciales blancos de oxidación, los radicales libres pueden causar la fragmentación con la pérdida de la función de estas, alterándose su estructura y la consecuente pérdida de la función. El radical  $\text{OH}^{\bullet}$  produce modificaciones en residuos de aminoácidos, particularmente en la tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína; forma entrecruzamientos de tipo covalente e induce a la fragmentación de la cadena polipeptídica, lo que se traduce en una pérdida de la función, o en mayor susceptibilidad a las enzimas proteolíticas.

Las proteínas oxidadas son fácilmente degradadas por enzimas proteolíticas debido a la formación de grupos carbonilo, a la creación de nuevos grupos N-terminales, o a cambios conformacionales de la molécula ( $\text{ONOO}^{\bullet}$  oxida a las proteínas membranales y citoplásmicas afectando su naturaleza física y química). La presencia de grupos carbonilo en proteínas se ha convertido en un parámetro a evaluar el daño oxidativo en proteínas. <sup>[24,25,26]</sup>

#### 1.6.2. Daño a Lípidos

Los radicales libres como hidroxilo y oxígeno singulete pueden reaccionar con los ácidos grasos de fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS), son más

susceptibles a la acción de estos radicales. [27] De este modo surge el proceso de peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo. La peroxidación lipídica es el proceso mediante el cual, los radicales libres captan electrones de los lípidos de las membranas celulares, mediante una reacción en cadena, producida por los mismos. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son los más afectados, por poseer en su estructura grupos metileno  $-CH_2-$ , los cuales poseen hidrógenos altamente reactivos. [28]

La peroxidación lipídica consta de tres etapas:

- **Iniciación**, generalmente esta reacción en cadena es iniciada por el radical hidroxil ( $\cdot OH$ ), que reacciona con el ácido graso poliinsaturado, dando lugar a agua y a un ácido graso poliinsaturado radical, este sufre un reacomodo molecular para formar un dieno conjugado, que a su vez reaccionará con oxígeno molecular ( $O_2$ ) para dar como producto el radical peroxilo.
- **Propagación**, este radical peroxil debido a su alta inestabilidad reacciona con otro ácido graso, dando lugar a un lípido radical y así sucesivamente; esta constituye una reacción en cadena por lo que no se detiene, salvo que exista la presencia de otro factor, como se mencionará en la etapa de terminación.
- **Terminación**, esta reacción en cadena se detendrá cuando dos radicales reaccionen y produzcan una especie no radical, para que esto suceda las especies radicales deben de estar en altas concentraciones. Existen moléculas que protegen la membrana celular y de esta manera dan lugar a la etapa de terminación, atrapando a radicales libres. Entre las moléculas protectoras de la membrana celular tenemos a la vitamina E y enzimas, como la superóxido dismutasa y la catalasa. Siendo la más efectiva por su afinidad lipofílica la vitamina E. [26,28,29,30]

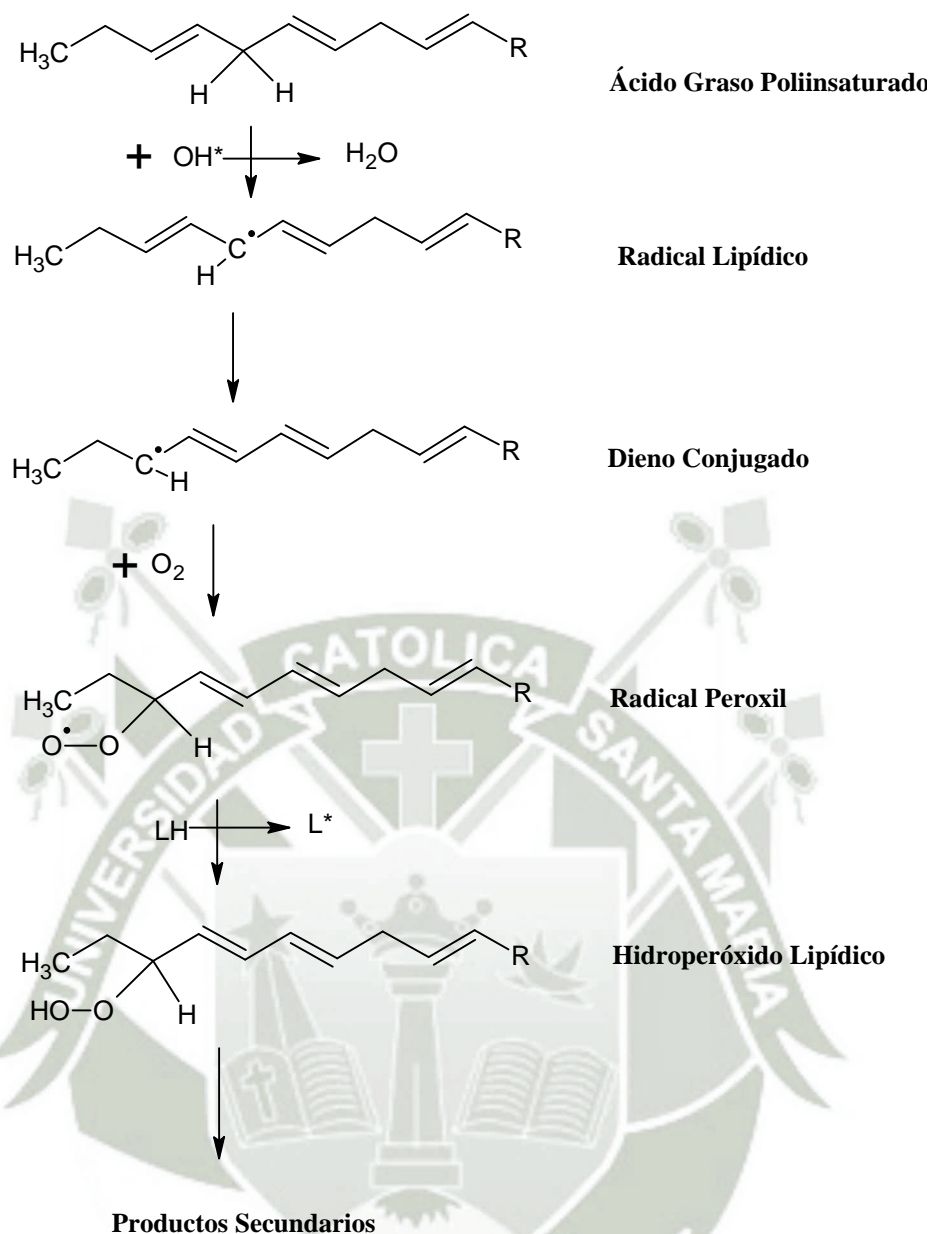


Figura N° 1.7. Peroxidación Lipídica

### 1.6.3. Daño a Carbohidratos

Los carbohidratos, son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Algunos azúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo, para producir sustancias reactivas. Del mismo modo, otros polisacáridos pueden sufrir el ataque de radicales libres, en este caso, fragmentándose a unidades más sencillas. Por ejemplo, se ha demostrado que el ácido hialurónico se despolimeriza en presencia de concentraciones elevadas de radical hidroxilo, provocando un descenso de la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones. [27]

#### 1.6.4. Daño a Acidos Nucleicos

El DNA, es muy susceptible al daño causado por los radicales libres, en especial al radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ). Generalmente se causan alteraciones en las bases y los azúcares de los ácidos nucleicos que conforman el DNA, los radicales libres también pueden causar la activación de la poli(ADP-ribosa) sinteasa, que puede causar la fragmentación del DNA y la muerte celular programada. Este proceso reduce el nivel celular de  $\text{NAD}^+$ , alterando de esta manera la función de cadena de transporte de electrones. Esto podría conllevar a fenómenos de mutaciones y carcinogénesis. <sup>[18]</sup>

#### 1.7. ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, mediante la liberación de electrones en nuestra sangre, los que son captados por los radicales libres. <sup>[17]</sup>

Halliwell, define los antioxidantes como un grupo de sustancias las que, en muy bajas concentraciones, tienen la capacidad de retardar significativamente el proceso de oxidación molecular mediante su propia oxidación. Son sustancias que captan radicales libres, neutralizándolos, de esta manera, ayudan a reducir la incidencia de las enfermedades y daños causados por el estrés oxidativo. Los vegetales, plantas y especias, constituyen una fuente muy rica en antioxidantes, que pueden incluirse en la dieta diaria. <sup>[31,32,33,34]</sup>

##### 1.7.1. Clasificación de Antioxidantes

Existen muchos tipos de clasificación de antioxidantes, pero para simplificar dicha clasificación, se definen tres tipos de antioxidantes que engloban las demás clasificaciones que se mencionarán más adelante:

- *Antioxidantes preventivos*, son los que evitan la iniciación de la propagación de a reacción del radical en la cadena. Pertenecen a este grupo, los metales quelantes y descomponedores de peróxido.
- *Antioxidantes rompe-cadenas (chain –breaking)*, reaccionan con un compuesto reactivo, ya formado y lo transforman en uno menos reactivo; poniendo fin a la reacción en cadena.

- *Antioxidantes reparadores*, actúan una vez producido el daño, se encuentran dentro de este grupo las fosfolipasas, proteasas, enzimas reparadoras de ADN y transferasas. Reparar el daño y reconstituyen tejidos.

Existen también otro tipo de clasificaciones más específicas, como las que se mencionan a continuación: <sup>[18]</sup>

### 1) Según su naturaleza:

#### a) *Antioxidantes Enzimáticos*

- Superoxido dismutasa (SOD)
- Catalasa (CAT)
- Glutación peroxidasa (GPx)
- Glutación reductasa (GR)

#### b) *Antioxidantes no Enzimáticos*

##### i) *Antioxidantes Metabólicos*

- Glutación reducido (GSH)
- Acido Lipoico
- L-arginina
- Coenzima Q10
- Melatonina
- Acido Urico
- Bilirrubina
- Proteínas quelantes de metales
- Transferrina, etc.

##### ii) *Antioxidantes con función nutritiva*

- Vitamina E

- Vitamina C ó ácido ascórbico
- Carotenoides
- Trazas de metales (Selenio, Manganeso, Zinc)
- Flavonoides
- Omega-3
- Omega-6
- Acidos grasos, etc.

## 2) Según su fuente de origen:

### a) *Antioxidantes de origen endógeno*

- Bilirrubina
- Glutación
- Acido Lipoico
- N-acetil cisteína
- NADPH y NADH
- Coenzima Q10
- Acido Urico
- Enzimas (SOD, CAT, GPx, GR)

### b) *Antioxidantes de origen exógeno*

- Vitamina C
- Vitamina E
- Betacaroteno y otros carotenoides
- N-acetil cisteína
- Flavonoides (polifenoles)

### c) *Proteínas captadoras de metales*

- Albúmina

- Ceruloplasmina
- Ferritina
- Mioglobina
- Transferrina

3) **Según su mecanismo de acción:**

a) *Sistemas catalíticos para neutralizar o desviar los ROS*

- SOD
- CAT
- GPx

b) *Captación o Inactivación de iones metálicos previniendo la producción de ROS, mediante la reacción de Haber-Weiss*

- Ferritina
- Ceruloplasmina

c) *Auto-suicida y rompedores de cadena, destruyendo los ROS*

- Vitamina C
- Vitamina E
- Acido úrico
- Glutación
- Flavonoides

d) *Captación de los ROS*

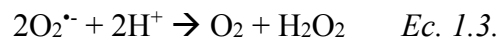
- Carotenoides
- Antocianinas

A continuación se mencionan algunos mecanismos de acción de diferentes tipos de antioxidantes: [35,36]

a) *Superóxido dismutasa (SOD)*

Es una enzima que encuentra en el citosol, mitocondria y a nivel extracelular. En el hombre esta enzima presenta tres isoformas SOD1, SOD2 Y SOD3, tiene como co-factores al zinc, cobre y manganeso.

Produce la dismutación del radical superóxido convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, como se muestra en la ecuación a continuación: <sup>[18,35,36]</sup>



b) *Catalasa (CAT)*

Es una enzima que está presente en los peroxisomas, participa en la dismutación del peróxido de hidrógeno, para descomponerlo en oxígeno molecular y agua. Como se muestra en la siguiente ecuación: <sup>[35]</sup>



c) *Glutación peroxidasa (GPx)*

Es una enzima que se encuentra en el citosol y la mitocondria de las células, reduce el peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos, convirtiéndolos en agua y oxígeno molecular.

El glutación (GSH) es un tripéptido no proteínico, que está presente en altas concentraciones en la mayoría de las células, en el citosol. Es esencial para la vida y se regenera él mismo, mediante la enzima glutación reductasa (GR), que cataliza la reducción del glutación oxidado (GSSG) a glutación reducido. Destruye las toxinas y/o radicales libres que ingresan a nuestro organismo y las elimina, a diferencia de otros sistemas antioxidantes, no se convierte en un radical menos reactivo y es activo frente a muchos tipos de radicales. El GSH es capaz de eliminar radicales libres directamente o enzimáticamente a través de la GPx, previene el daño de tejidos. <sup>[37,38,39]</sup>



d) *Acido úrico*

Es un producto del metabolismo de las purinas, se encuentra ampliamente distribuido, es un poderoso antioxidante y un secuestrante del oxígeno singulete y otros radicales como el superóxido, hidroxilo. [35]

*e) Cisteína*

Es un aminoácido y también está ampliamente distribuido, es un componente vital para la síntesis del glutatión y puede reducir compuestos orgánicos, donando electrones de sus grupos tiol –SH. La N-acetil-L-cisteína, es un derivado de la cisteína y también es un precursor de glutatión, capta el peróxido de hidrógeno y otros peróxidos.

*f) Coenzima Q10 (CoQ10)*

También es llamada ubiquinona, es sintetizada en las células humanas y también puede encontrarse en alimentos, como el salvado de trigo y pescado. Inhibe la peroxidación lipídica y reduce el estrés oxidativo mitocondrial, también es capaz de reciclar o regenerar la vitamina E.

*g) Transferrina*

Es la mayor proteína transportadora de hierro en el organismo. Se une a las sales de hierro, que podrían ser generadoras de radicales libres. [40]

*h) Lactoferrina*

Es una proteína de la leche que se encuentra extracelularmente. Tiene un mecanismo de acción similar a la transferrina, de unión al hierro.

*i) Ceruloplasmina*

Es una proteína extracelular que se une a metales, como el cobre. Cataliza la oxidación del  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ , ya que el  $Fe^{2+}$  da lugar a la formación de radicales libres. [40]

*j) Bilirrubina*

Es un producto del catabolismo del grupo “hemo”, a bajas concentraciones in vitro es eficiente en captar el radical peróxido y protege la unión de la albúmina con el ácido linoleico de la peroxidación inducida por radicales. Se encuentra en la sangre, tejidos, plasma y lugares extravasculares. [18] Al igual que la vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol, la bilirrubina tiene acción sinérgica con la vitamina C o ácido ascórbico.

a) *Vitamina C*

Capta los radicales superóxido, hidroxilo y neutraliza el oxígeno singlete; al captar los radicales libres, los neutraliza y se transforma en el radical dehidroascorbato, mucho menos reactivo, que los radicales ya mencionados. Existen sistemas enzimáticos intracelulares para regenerar este radical dehidroascorbato a su forma original, usando como poder reductor el NADH (semidehidroascorbato reductasa o GSH (dehidroascorbato reductasa). [42] La vitamina C regenera la forma oxidada de la vitamina E. Esta vitamina a su vez también puede actuar como prooxidante en presencia de metales como el hierro o el cobre, por tener la habilidad de convertir al  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , siendo este último un potente generador de radicales libres. [21]

b) *Vitamina E*

Capta directamente el radical superóxido e hidroxilo, neutraliza el oxígeno singlete y los peróxidos. Regula las enzimas antioxidantes y rompe las cadenas de lípidos en la peroxidación, por tener un carácter altamente lipofílico. La vitamina E, cede un hidrógeno al radical libre, convirtiéndolo en una molécula estable, para evitar la continuación de esta reacción en cadena, convirtiéndose en un radical “tocoferil”, pero tiene la ventaja que este radical puede volver a reducirse con la ayuda de otras sustancias, como la vitamina C.

La vitamina E o alfa-tocoferol, se encuentra en las membranas biológicas, debido a su hidrofobicidad, en donde desempeña un rol muy importante, protegiendo a las LDL de procesos oxidativos. Se ha determinado que cada molécula de vitamina E es capaz de proteger 500 moléculas de fosfolípidos que se encuentran dentro de las LDL. [20] Algunas fuentes de vitamina E son los aceites vegetales, cereales integrales, frutos secos, frutas, huevos, carne, etc. [41,42]

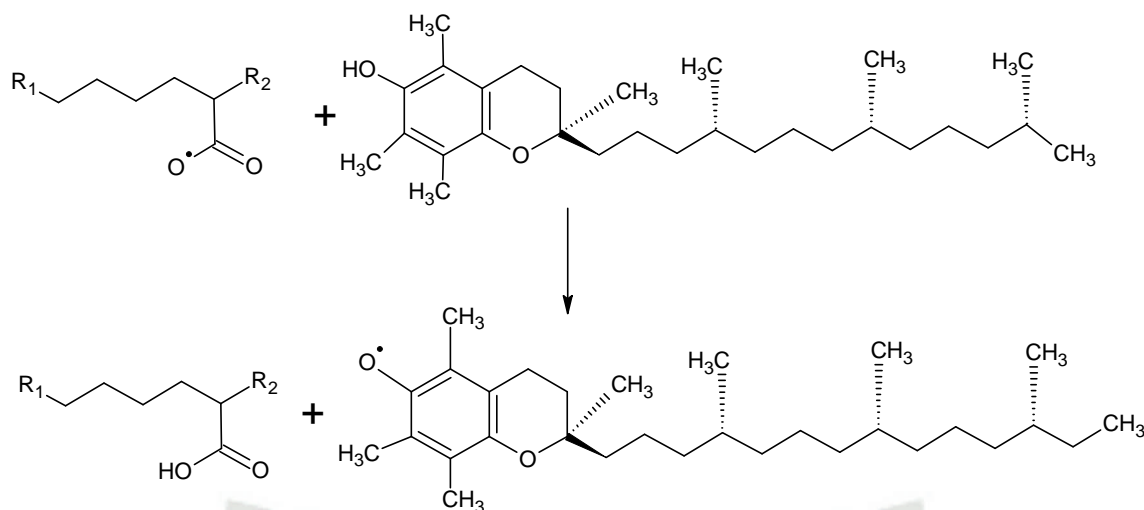


Figura N° 1.8. Reacción del  $\alpha$ -tocoferol con un radical peroxilo

c) *Carotenoides*

Su actividad antioxidante está basada en su capacidad de neutralizar el oxígeno singulete. Los carotenoides pueden captar radicales peroxilo, mediante transferencia de electrones o sustracción de átomos de hidrógeno, mecanismos que llevan a la formación de una gran variedad de carotenoides radicálicos. <sup>[44]</sup> Los carotenoides se usan para disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, cataratas, VIH y ciertos tipos de cáncer.

d) *Flavonoides*

Se encuentran también en diversas frutas, vegetales y especias; captan los radicales superóxido, hidróxido y lípido peróxido. Tienen importantes efectos en la salud.

1.7.2. Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintetizados químicamente, son aquellos que no están presentes en la naturaleza y se usan para prevenir la peroxidación lipídica en diferentes productos. Los más empleados en alimentos, son el BHT y BHA que tienen una buena actividad antioxidante, por separado, pero cuando se usan ambos potencian la misma.

Estos antioxidantes son ampliamente usados, pero su empleo ha sido cuestionado desde hace varios años, por ser productos de origen sintético, a los que se les atribuye potenciales efectos carcinogénicos. Si bien es cierto, han demostrado inocuidad para el ser humano, a bajas concentraciones, pero nunca serán del todo

aceptados y tolerados, al no ser compatibles con nuestro organismo, por ser de origen químico. Es por ello, que hoy en día ha aumentado el interés de parte de industrias y consumidores, por el uso y consumo de sustancias de origen natural, en este caso, antioxidantes. <sup>[18]</sup>

#### 1.7.2.1. Clasificación de Antioxidantes Sintéticos

*Tabla N°1.2. Clasificación de los Antioxidantes Sintéticos*

<b>Antioxidantes Sintéticos</b>	
<p style="text-align: center;"><b><i>Antioxidantes Sintéticos Primarios</i></b></p> <p>Previenen la formación de radicales libres.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Eliminadores de Radicales libres <i>Ej.: BHA, BHT, TBHQ, propilgalato.</i></li> <li>- Captadores de Oxígeno <i>Ej.: Sulfitos, glucosa oxidasa, ascorbil palmitato.</i></li> <li>- Agentes Quelantes <i>Ej.: EDTA, ácido tartárico, ácido cítrico.</i></li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b><i>Antioxidantes Sintéticos Secundarios</i></b></p> <p>Descomponen los hidroperóxidos formados durante la oxidación de lípidos, convirtiéndolos en productos estables.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Ej.: Acido Tiodipropiónico, Dilauril tiodipropionato.</i></li> </ul>

## 1.8. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los diferentes métodos para determinar la capacidad antioxidante, se basan en comprobar cómo un agente oxidante, induce daño oxidativo en un sustrato oxidable, daño que será inhibido o reducido en presencia de una sustancia antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la capacidad antioxidante del compuesto a determinar. Existen diversos métodos para medir o determinar la capacidad antioxidante de un compuesto; estos difieren en el agente oxidante o sustrato que utilicen, en la medida del punto final, en la técnica de instrumentación utilizada y en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción. Además los objetivos de los métodos son diversos por ejemplo, se mide la resistencia de un alimento a la oxidación, la evaluación cuantitativa del aporte de sustancias antioxidantes o la evaluación de la capacidad antioxidante en plasma una vez ingerido el alimento. [45]

Los métodos *in vitro*, comparan la capacidad antioxidante de diferentes muestras de alimentos, pero muchos de ellos presentan como inconveniente, que no reflejan la situación fisiológica, ya que usan radicales que no están presentes en el organismo. Por otra parte, la actividad antioxidante de un alimento *in vivo* difiere de su efecto antioxidante *in vitro*, ya que una vez ingerido el alimento sufre transformaciones metabólicas, que muchas veces modifican su capacidad, pudiendo ser esta, mucho mayor en algunos casos.

La mayoría de métodos para la determinación de la actividad antioxidante no emplean especies radicales con significado biológico, como es el caso de los métodos DPPH y ABTS; existen otros en los se emplean radicales peroxilo o hidroxilo como ORAC, TRAP, TOSC, entre otros. Estos métodos pueden clasificarse en dos grupos grandes; los ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), y los ensayos basados en la transferencia de electrones (SET).

- En los ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), se da una reacción competitiva entre el antioxidante y el sustrato por los radicales peroxilo generados térmicamente a través de la descomposición de los compuestos “azo”.

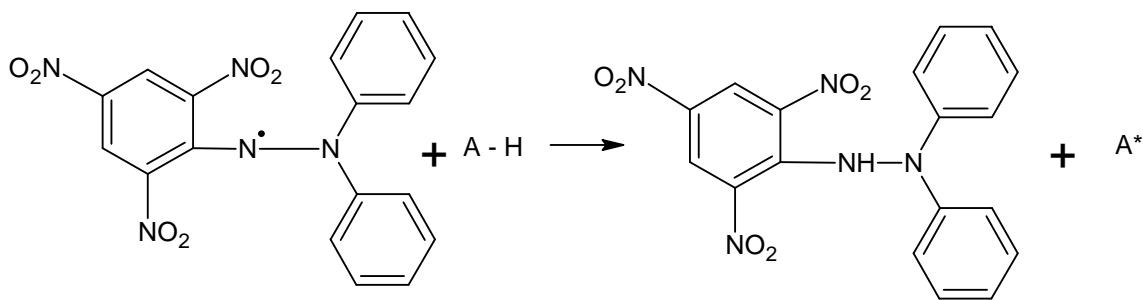
- Los ensayos basados en la transferencia de electrón (ET), miden la capacidad de reducción de un oxidante (que cambia de color) por la acción de un antioxidante. El grado de cambio de color se correlaciona con la concentración del antioxidante en la muestra determinada. [46]

Ensayos que utilizan el mecanismo HAT:

- ORAC (Capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno), este método es aplicado con frecuencia para determinar la capacidad antioxidante en plasma y muestras biológicas, pero también en alimentos. Se basa en la inhibición del radical peroxil inducido por el [2-2'-azobis(2-amidinopropane)-dihydrochloride] (AAPH), que es un compuesto de tipo “azo”. Esta inhibición se mide por la permanencia de la fluoresceína. De tal modo que el antioxidante actúa protegiendo la fluoresceína, mediante la inhibición de los radicales peroxilo. [44]
  - TRAP (Potencial total de atrapamiento de radicales peróxido), al igual que el método ORAC, determina la captación de radicales peroxilo son generados a partir del AAPH y se mide el oxígeno consumido, mediante un electrodo de oxígeno. [47]
- Existen otros métodos dentro de este grupo como el de inhibición de la absorción del oxígeno (IOU), la decoloración de la crocina (CBA), inhibición de la oxidación de las LDL e inhibición de la oxidación del ácido linoleico.

Ensayos que utilizan el mecanismo SET:

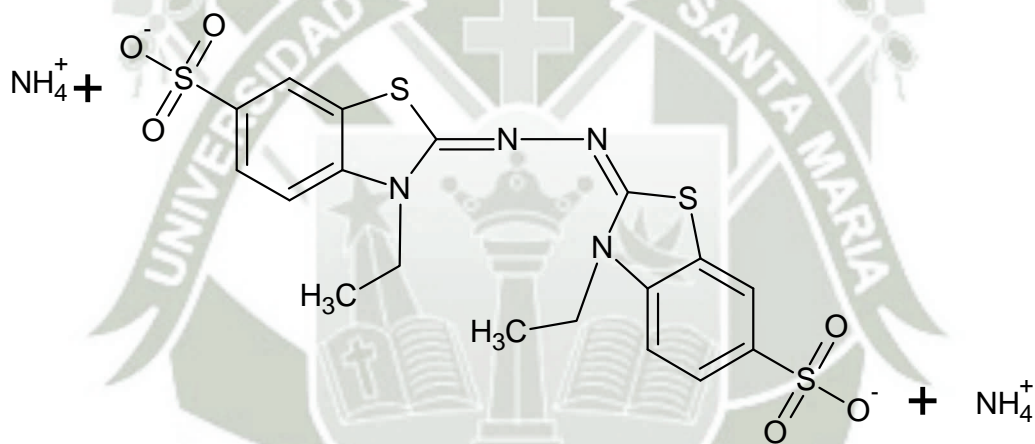
- DPPH(2, 2'-difetil-1-picrilhidrazilo), es un método colorimétrico basado en la disminución en la absorbanza que se mide a 515 nm. El radical es captado por el antioxidante y produce un cambio de color del reactivo (de violeta a amarillo) y por lo tanto, la disminución de la absorbanza ya mencionada. [47]



**DPPH (color morado, 517nm)**

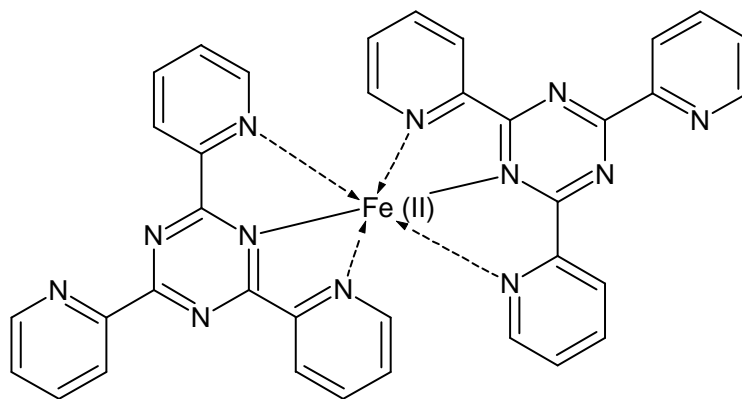
**DPPH - H (incoloro)**

- ABTS [ácido-2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)], se basa en la capacidad del antioxidante para capturar el radical catiónico ABTS, esta captura se evidencia mediante la decoloración y la disminución de la absorbancia que se mide a 734 nm. [48]



**Sal de ABTS (ácido - 2,2'-azinobis - (3 - etilbenzotiazolina - 6 - sulfónico)**

- FRAP (Potencial antioxidante para reducir al hierro), se basa en la reducción del complejo tripiridiltriazina férrica a su estado ferroso por un antioxidante en medio ácido. Esta reacción produce un cambio de color que es medido midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. [49]



**FRAP:  $[\text{Fe}(\text{II}) (\text{TPTZ})_2]^{2+}$  (Cation Ferroso de Tripiridiltriazina)**



## CAPÍTULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. CAMPO DE INVESTIGACIÓN

##### 2.1.1. Ámbito Geográfico

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo durante los meses de mayo a octubre del 2012, en el laboratorio H-204, Laboratorio de Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa-Perú.

##### 2.1.2. Unidades de Estudio

En el presente trabajo de investigación se utilizaron dos especias, romero y palillo.

##### 2.1.3. Estrategia de recolección de datos

Las presentes muestras se obtuvieron del mercado de especerías, en el mes de abril, la recolección del palillo, es más recomendable hacerla en otoño; en el caso del romero la recolección debe realizarse en primavera ó verano, cuando la planta se encuentra en estadio de floración, cuando la fotosíntesis es más activa; para que de este modo conserven mejor sus propiedades farmacéuticas.

#### 2.2. MATERIALES

##### 2.2.1. Reactivos Químicos

- ABTS [ácido-2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)] (Merck)
- Persulfato de potasio
- Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) (Merck)
- Etanol 96°(Merck)
- Heptano (Scharlau)
- Acetona (JTBaker)
- Agua destilada

- Hielo seco

### 2.2.2. Materiales de Laboratorio

- Buretas de 500 ml
- Tubos de ensayo con tapa
- Balones de vidrio de 100 ml
- Baguetas
- Fiolas de 5 ml y 10 ml
- Pipetas de 1,2,5 y 10 ml
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 ml
- Probeta de 100 ml
- Micropipeta de 5, 10 y 200  $\mu$ l.
- Cubetas de polietileno
- Vasos de precipitados de 10 y 100 ml
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Frascos ámbar tapa rosca
- Espátula
- Parafilm

### 2.2.3. Equipos

- Balanza analítica, Marca: Ohaus, Modelo: PA214.
- Espectrofotómetro, Marca: Shimadzu, Modelo: UV 1700.
- Rotavapor, Marca: Buchi, Modelo: R-114.
- Vórtex, Marca: Barnstead, Modelo: M37610-33.
- Equipo de Ultrasonido (Sonicador), Marca: Selecta, Modelo: 3000683.

## 2.3. MÉTODOS

### 2.3.1. Obtención de Oleorresinas

a) Método: Extracción por Percolación

Consiste en un método de extracción sólido-líquido, en el que ambas fases (sólida y líquida) se encuentran en un contacto directo, por un tiempo determinado, por lo que los componentes del sólido que son afines al solvente, quedan disueltos en el mismo. Después de transcurrido un tiempo determinado, se obtiene el extracto regulando el tiempo de goteo, que será un factor importante para las propiedades farmacológicas que posea el extracto. Se usará una mezcla de heptano con acetona, en diferentes proporciones.

b) Procedimiento

Primero se pulverizan las hojas de romero estabilizadas; con la ayuda de un mortero; en el caso del palillo se obtuvo el material seco y pulverizado. Se pesa una cantidad adecuada, de romero y de palillo, en proporción con el solvente (10 g de materia vegetal seca y pulverizada con 100 ml de mezcla de solventes).

Se adaptó un equipo para percolación, en el que se pone en contacto la materia vegetal seca, con una mezcla de solventes (heptano/acetona); este equipo se cubre con papel aluminio, para evitar cualquier tipo de degradación de las propiedades antioxidantes de ambas especias, a causa de la luz. Se deja reposar la muestra en contacto con la mezcla de solventes durante 24 horas, que fue el tiempo establecido en este trabajo.



*Figura N° 2.1. Arreglo Experimental para la extracción de Oleorresinas de Palillo*



*Figura N° 2.2. Arreglo Experimental para la extracción de Oleorresinas de Romero*

Después de transcurrido el tiempo establecido, se obtiene el extracto, regulando el goteo (1 gota/ segundo), a temperatura ambiente; hasta recuperar un volumen de extracto igual al volumen de mezcla de solventes, que se añadió a la muestra en un principio. El

extracto se recolecta en frascos ámbar y se almacenarán bajo refrigeración, en frascos bien cerrados.

Para eliminar la mayor cantidad de la mezcla de solventes presentes en los extractos, se somete el extracto al rotavapor, hasta la eliminación casi completa.



*Figura N° 2.3. Arreglo Experimental de las oleorresinas en el rotavapor*



*Figura N° 2.4 y 2.5. Oleorresinas de Palillo y Romero sometidas al rotavapor*

Para asegurar la eliminación completa de solventes, que puedan estar presentes en las oleorresinas, ya sean de palillo ó romero; se somete las muestras contenidas en los balones a destilación al vacío; de este modo se calienta ligeramente los balones para permitir la condensación de las trazas de solventes que puedan estar presentes en las muestras, este procedimiento duró 2 horas.



*Figura N° 2.6. Procedimiento de Destilación al vacío de las Oleorresinas*

Una vez obtenida la oleorresina libre de trazas de solventes, se conserva bajo refrigeración, en frascos ámbar bien cerrados; para ser procesadas después. Se calcula los rendimientos de cada una de las oleorresinas obtenidas, por diferencia de pesos.



*Figura N° 2.7. Oleorresina de Palillo*

c) Cálculo del porcentaje de Rendimiento

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso del balón lleno} - \text{Peso del balón vacío}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

*\*Los porcentajes de rendimiento pueden observarse en la Tabla N°3.1.*

### 2.3.2. Obtención de Extractos Etanólicos

#### a) Método: Extracción por agitación con ultrasonidos (Sonicación)

Es un método sencillo y económico, se utiliza con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado pasan rápidamente de la fase sólida al solvente.

#### b) Procedimiento

Se pesa una cantidad adecuada de muestra (romero y palillo), seca y pulverizada (2.5 g con 5 ml de solvente) y se mezcla. Se llevó a agitación en el ultrasonido por 10 minutos, luego se centrifuga a 2500 rpm, también durante 10 minutos.

El líquido sobrenadante es recuperado en un frasco ámbar limpio y seco, previamente tarado, para luego poder calcular el rendimiento. Luego a la muestra restante en el tubo, se le agrega 5 ml de etanol, se lleva al ultrasonido y se vuelve a centrifugar recuperando el sobrenadante. Este procedimiento se repite por cinco veces.



*Figura N° 2.8. y 2.9. Obtención de Extractos Etanólicos de Palillo y Romero*

Una vez recuperado el extracto, se procede al secado del mismo con ayuda de aire comprimido, para obtener el extracto seco y calcular el porcentaje de rendimiento.



Figura N° 2.10. Obtención del extracto seco

c) Cálculo del porcentaje de rendimiento

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso del balón lleno} - \text{Peso del balón vacío}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

\*Los porcentajes de rendimiento pueden observarse en la Tabla N°3.2.

### 2.3.3. Determinación de la Capacidad Antioxidante

Para la determinación de la capacidad antioxidante se utilizó el método de la captación del radical ABTS [ácido-2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)]. El compuesto ABTS, es un radical estable que presenta coloración azul y que absorbe radiación a una longitud de onda de 734 nm, de forma que su concentración se puede determinar mediante métodos espectrofotométricos. En el ensayo se determina la concentración inicial de ABTS y la concentración resultante una vez se ha añadido el posible antioxidante, de forma que una disminución de la absorción de radiación se traduce en una disminución de la concentración de ABTS debida a la cesión de electrones de la especie antioxidante.

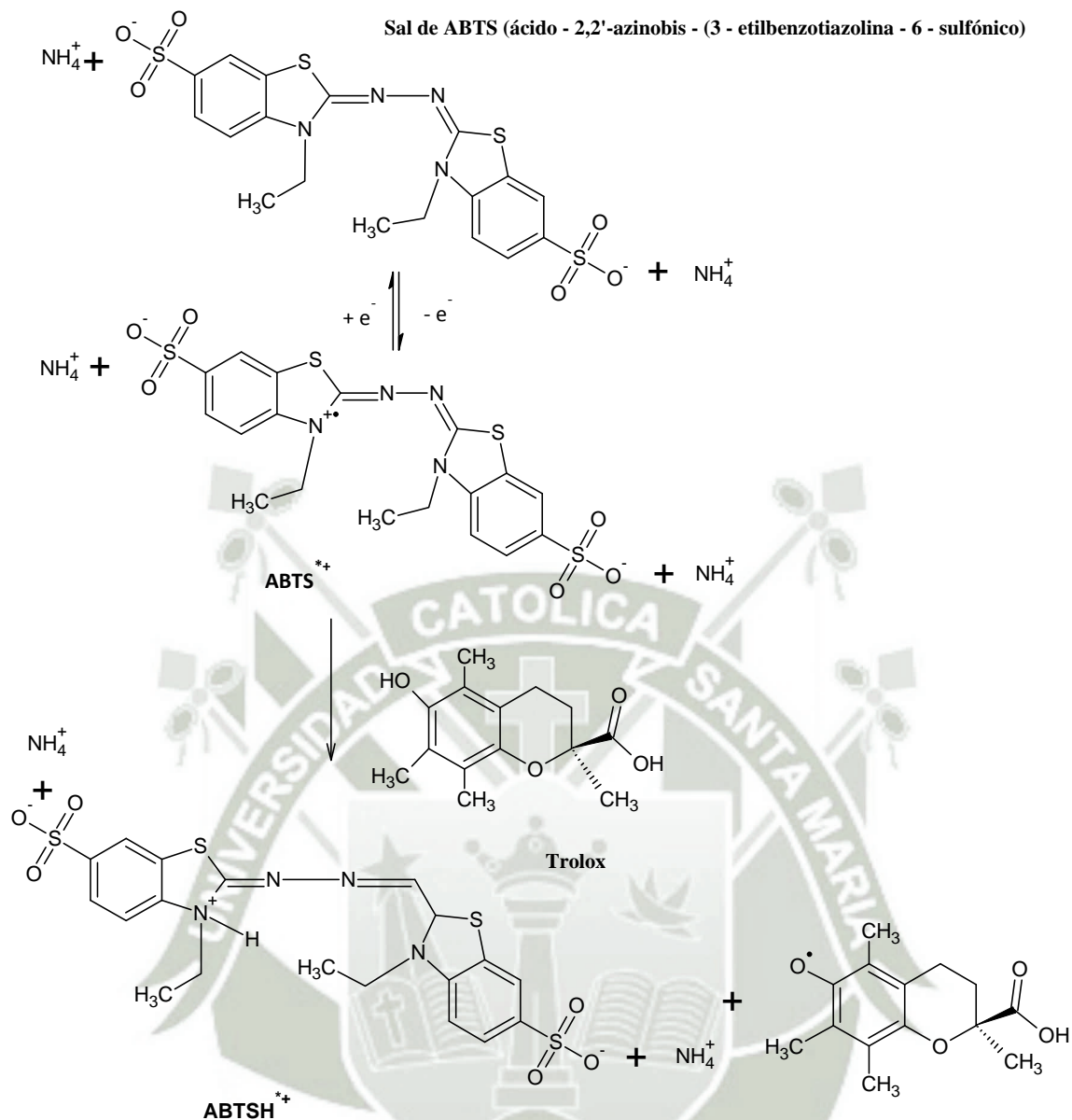


Figura N° 2.11. Reacción del radical ABTS con Trolox

### 2.3.3.1. Activación del radical ABTS

Se preparan dos soluciones, A y B. La solución A es una solución de ABTS, se prepara pesando 78.4 mg de reactivo en 10 ml de agua destilada y se guarda en un frasco ámbar. La solución B es una solución de persulfato de potasio, se prepara pesando 13.2 mg de persulfato de potasio más 10 ml de agua destilada, también se guarda en un frasco ámbar. Ambas soluciones A y B, deben de mantenerse protegidas de la luz y bajo refrigeración, de este modo se mantienen estables durante 5 días.

Para activar el radical ABTS, debe de mezclarse partes iguales (1:1) de los reactivos A y B, y dejarlos reaccionar durante 12 horas, culminado este tiempo, el radical estará activo y listo para su utilización. Esta activación del radical debe de hacerse en oscuridad y la mezcla se guarda a temperatura ambiente. Esta solución con el radical activo, se mantendrá estable durante 2 días y bajo refrigeración, una vez culminadas las 12 horas de reposo.

Se prepara una solución diluida, a partir de la solución del radical ya activo, se mide 1 ml de la solución del radical y se diluye con 60 ml de etanol. Esta solución debe de ajustarse a una absorbancia de 1.1 con un error de +/- 0.02, a una longitud de onda de 734 nm; es decir, la absorbancia de esta solución debe de oscilar entre el rango de 1.08 a 1.12, para empezar a trabajar.

### 2.3.3.2. Preparación del Gráfico Estándar

Se preparó el gráfico estándar con un patrón de referencia, para asegurarnos que los resultados obtenidos para nuestras muestras sean confiables. Para la realización del gráfico estándar, se utilizó como estándar Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico), análogo hidrosoluble la vitamina E, por su alta estabilidad.

Se preparó una solución madre de Trolox de concentración 10mM, a partir de la cual se hicieron diluciones para obtener las soluciones de trabajo de 80  $\mu$ M, 160  $\mu$ M, 240  $\mu$ M, 320  $\mu$ M, 400  $\mu$ M, 480  $\mu$ M y 560  $\mu$ M, respectivamente.

#### ***Preparación de la solución madre***

- Se pesa 12.5 mg de Trolox y se lleva a una fiola de 5 ml, completando el volumen con etanol. Esta solución se conserva bajo refrigeración.

$$PM \text{ Trolox} = 250.3 \text{ g/mol}$$

$$\frac{12.5 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times \frac{1 \text{ mmol}}{250.3 \text{ mg}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} = 10 \text{ mM} \quad \text{Ec. 2.1.}$$

#### ***Preparación de las soluciones de trabajo***

- Se preparan 7 soluciones de trabajo, de concentraciones 80  $\mu$ M, 160  $\mu$ M, 240  $\mu$ M, 320  $\mu$ M, 400  $\mu$ M, 480  $\mu$ M y 560  $\mu$ M.

- Se realizan los cálculos respectivos, para determinar el volumen a medir de la solución madre, para cada una de ellas y se enrasa en fioles de 10 ml con etanol. Los cálculos se realizan mediante la ecuación de dilución:

$$V \times C = V' \times C' \quad \text{Ec. 2.2.}$$

$$V \times 10 \text{ mM} = 10 \text{ ml} \times 0.08 \text{ mM}$$

$$V = 0.08 \text{ ml} \sim 80 \mu\text{l}$$

Donde:

V= Volumen a medir de la solución madre

C= Concentración de la solución madre

V'= Volumen que se desea preparar de cada una de las soluciones stock

C'= Concentración de la solución stock

#### 2.3.3.3. Determinación de la capacidad antioxidante de las soluciones stock de Trolox

Se miden 2850  $\mu\text{l}$  de reactivo ABTS más 150  $\mu\text{l}$  de cada una de las soluciones stock, cada una de ellas se mezcla en el vórtex, durante 10 segundos y se dejan reposar durante 90 minutos, en la oscuridad y en tubos tapados, para evitar la interferencia del oxígeno, en la reacción. Una vez transcurrido este tiempo, se lee la absorbancia de cada una de las soluciones de trabajo, a una longitud de onda de 734 nm en el espectrofotómetro.

Por último, se halla la ecuación y el coeficiente  $R^2$ , que sea lo más cercano a la unidad, para que pueda tomarse como referencia.

#### 2.3.3.4. Preparación de muestras

Se prepararon soluciones a partir de las oleorresinas y extractos etanólicos de palillo y romero. Para las oleorresinas y extracto etanólico de palillo se prepararon soluciones de concentración 500 ppm (mg/L); para las de romero se prepararon soluciones de una concentración de 300 ppm (mg/L); cada una de ellas con los cuidados adecuados, protegidas de la luz, en frascos ámbar y almacenadas bajo refrigeración.

#### 2.3.3.5. Determinación de la Capacidad Antioxidante de las Muestras (oleorresinas y extractos etanólicos de romero y palillo)

Se utilizó un método espectrofotométrico, en el que realizarán mediciones a una longitud de onda de 734 nm. Se miden 2850  $\mu\text{l}$  de reactivo ABTS (previamente diluido)

más 150  $\mu$ l de etanol, se mezcla en el vórtex durante 10 segundos y se lee en el espectrofotómetro para determinar la absorbancia del blanco. Para la muestra se miden 2850  $\mu$ l de reactivo más 150  $\mu$ l de muestra, se agitan en el vórtex durante 10 segundos y se lleva al espectrofotómetro, para su posterior lectura a tiempo cero.

A partir de este momento se tomó el tiempo y se hicieron lecturas en intervalos de 5 minutos cada una, para así poder determinar el tiempo de reacción de la muestra. Este procedimiento se repite para cada una de las muestras.

El tiempo de reacción de la muestra, esta dado por aquella absorbancia, a partir de la cual, la diferencia entre las siguientes sea constante. Una vez determinado el tiempo de reacción para cada muestra, se realiza la determinación de la actividad antioxidante por triplicado.

#### 2.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos se procesarán mediante un programa estadístico, IBM SPSS Statistics19, para determinar si existe diferencia significativa entre los valores resultantes de capacidad antioxidante para cada una de las muestras, ya sean oleorresinas y extractos etanólicos de romero o palillo. Se trabajará con un nivel de significancia de ( $p = 0.05$ ).

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. EXTRACCIÓN DE OLEORRESINAS

Se obtuvieron las oleorresinas de romero y palillo, mediante el método de percolación, con una mezcla de heptano y acetona en diferentes proporciones, después se calculó el porcentaje de rendimiento para cada una, por gravimetría mediante la ecuación por diferencia de pesos, como se señala a continuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso del balón lleno} - \text{Peso del balón vacío}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

*Ecuación 3.1.*

- *Oleorresina de Palillo obtenida con una mezcla de heptano/acetona (90:10)*

$$\% \text{ Rendimiento} = 10.47\%$$

- *Oleorresina de Palillo obtenida con una mezcla de heptano/acetona (70:30)*

$$\% \text{ Rendimiento} = 11\%$$

- *Oleorresina de Palillo obtenida con una mezcla de heptano/acetona (60:40)*

$$\% \text{ Rendimiento} = 15.6\%$$

- *Oleorresina de Palillo obtenida con una mezcla de heptano/acetona (50:50)*

$$\% \text{ Rendimiento} = 11.07\%$$

- *Oleorresina de Romero obtenida con una mezcla de heptano/acetona (90:10)*

$$\% \text{ Rendimiento} = 10.27\%$$

- *Oleorresina de Romero obtenida con una mezcla de heptano/acetona (70:30)*

$$\% \text{ Rendimiento} = 14.67\%$$

- *Oleorresina de Romero obtenida con una mezcla de heptano/acetona (60:40)*

*% Rendimiento = 15.07%*

- *Oleorresina de Romero obtenida con una mezcla de heptano/acetona (50:50)*

*% Rendimiento = 17.5%*

### 3.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS

Se obtuvieron los extractos etanólicos de palillo y romero, mediante el método de agitación con ultrasonido, se calcularon los porcentajes de rendimiento para cada uno de ellos.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso del frasco lleno} - \text{Peso del frasco vacío}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

- *Extracto Etanólico de Palillo*

*% Rendimiento = 9.53%*

- *Extracto Etanólico de Romero*

*% Rendimiento = 8.94%*

En las Tablas N° 3.1 y N° 3.2, se observan los porcentajes de rendimiento de las oleorresinas y extractos etanólicos de romero y palillo.

*Tabla N° 3.1. Porcentaje de Rendimientos de las muestras obtenidas de Palillo*

<b>% Rendimientos de Muestras de Palillo</b>	
Oleorresina Hep/Acet (90:10)	10.47%
Oleorresina Hep/Acet (70:30)	11%
Oleorresina Hep/Acet (60:40)	15.6%
Oleorresina Hep/Acet (50:50)	11.07%

---

Extracto Etanólico	9.53%
--------------------	-------

---

*Tabla N° 3.2. Porcentaje de Rendimientos de las muestras obtenidas de Romero*

---

**% Rendimientos de Muestras de Romero**

---

Oleorresina Hep/Acet (90:10)	10.26%
------------------------------	--------

---

Oleorresina Hep/Acet (70:30)	14.67%
------------------------------	--------

---

Oleorresina Hep/Acet (60:40)	15.07%
------------------------------	--------

---

Oleorresina Hep/Acet (50:50)	17.5%
------------------------------	-------

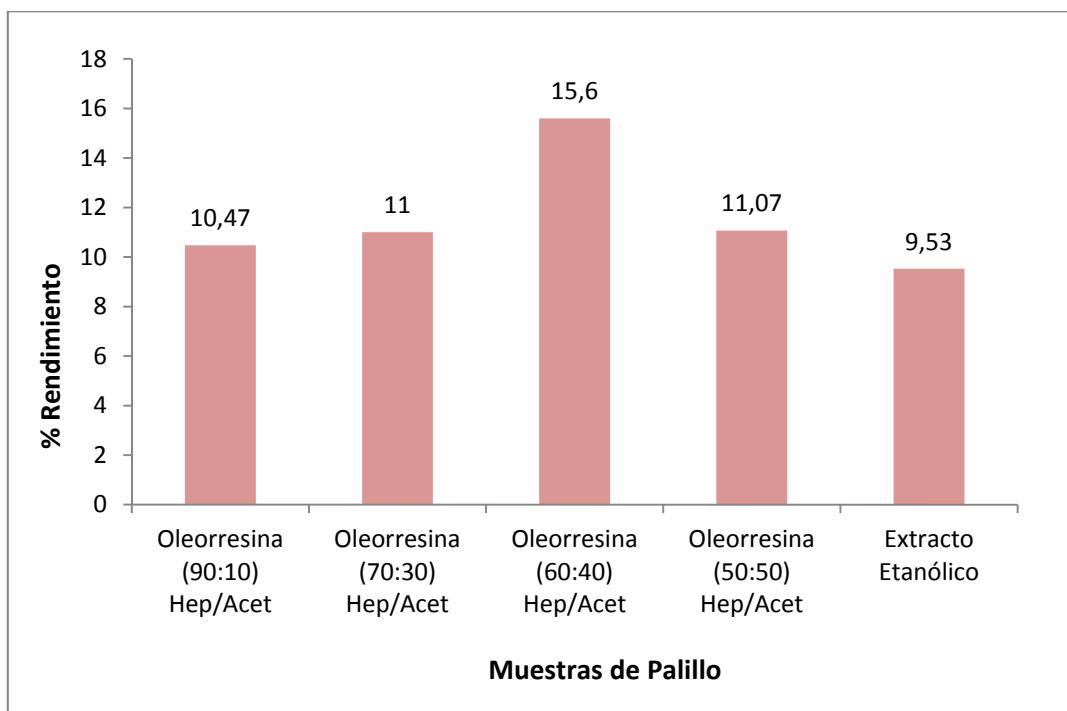
---

Extracto Etanólico	8.94%
--------------------	-------

---

Después de haber obtenido las oleorresinas y extractos etanólicos, se obtuvieron los porcentajes de rendimiento para las muestras obtenidas de palillo, mediante el modelo matemático por gravimetría; el promedio de porcentaje de rendimiento para las muestras obtenidas de palillo fue de 11.53%; en la Figura N°3.1 puede observarse que la mezcla de solventes heptano/acetona en proporción (60:40), utilizada para obtener la oleorresina de palillo, presentó un mayor rendimiento (15.6%) y el extracto etanólico seco es el que presentó el menor rendimiento del grupo (9.53%). En el caso del mayor rendimiento los componentes de la especia tuvieron mayor afinidad por la mezcla (60:40), por este motivo el rendimiento fue mayor, este rendimiento más alto no solo podría deberse a la extracción de principios activos con capacidad antioxidante de la planta o especia, sino también a la presencia de lípidos, grasas y ceras que podrían estar presentes en la oleorresina, dando como resultado un mayor porcentaje de rendimiento. El menor porcentaje de rendimiento se obtuvo con el uso de un solvente de tipo polar,

como el etanol, de tal modo que los componentes del palillo tuvieron menor afinidad por este tipo de solvente, por ello presentaron un menor rendimiento.



*Figura N° 3.1. Porcentaje de rendimientos obtenidos de las oleorresinas y extracto etanólico de palillo.*

Después de haber calculado los porcentajes de rendimiento para cada una de las muestras obtenidas de romero, el promedio de porcentaje de rendimiento obtenido para las muestras obtenidas de romeros fue de 13.29%; se puede observar en la en la figura N° 3.2, que la mezcla de solventes heptano/acetona en proporción (50:50), ofrece un mayor rendimiento de oleorresina de romero (17.5%), al igual que para las muestras obtenidas de palillo, los componentes presentes en el romero requieren de una proporción media entre solventes no polares y polares (heptano/acetona), ya que estos tendrían una mayor afinidad por la mezcla de solventes, por lo que dicha proporción ofreció el mayor rendimiento; el menor rendimiento del grupo (8.94%), lo presentó el extracto etanólico seco, ya que en este caso el extracto se obtuvo con un solvente completamente polar, por lo que no se habrían extraído aquellos componentes del romero de tipo no polar. La proporción que presentó el mayor rendimiento, no necesariamente presentará mayor capacidad antioxidante, ya que además de extraer componentes con capacidad antioxidante, podrían estar extrayendo lípidos, grasas y ceras, presentes en la especia, que ayudan a obtener un mayor rendimiento, sin presentar mayor capacidad antioxidante.

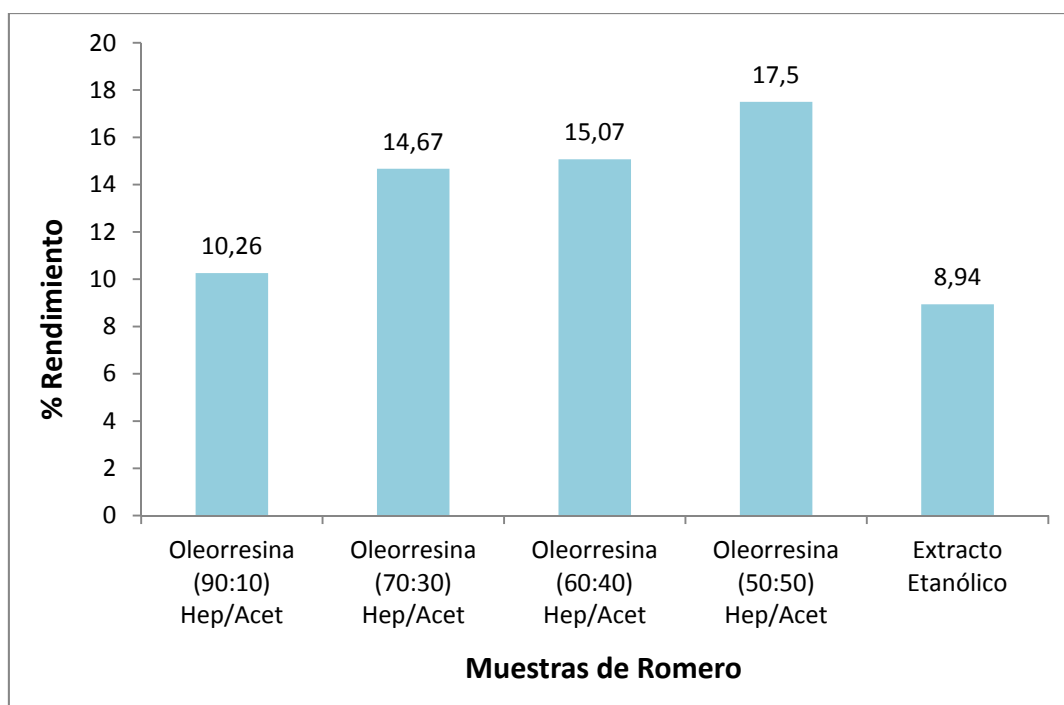


Figura N° 3.2. Porcentaje de Rendimientos obtenidos de las oleorresinas y extracto etanólico de palillo.

### 3.3. PREPARACIÓN DE LA GRÁFICA ESTÁNDAR DE TROLOX

Se prepararon soluciones de trabajo a diferentes concentraciones, a partir de una solución madre de Trolox (10mM), cada una de estas reaccionó con el reactivo ABTS, para dar distintos valores de absorbancia, los que pueden observarse en la Tabla N° 3.3.

En la Figura 3.3 se observa el gráfico resultante de los datos mencionados en la Tabla 3.3, restando la absorbancia menos el blanco, según la metodología señalada en 2.3.3.2. Se obtuvo un valor de  $R^2=0.9991$ , valor muy cercano a la unidad, por lo tanto la ecuación obtenida es adecuada para servir de referencia al realizar los cálculos respectivos para determinar la actividad antioxidante de las diferentes muestras.

Tabla N° 3.3. Preparación de la curva de calibración, utilizando como estándar soluciones de Trolox a diferentes concentraciones

Concentración Solución Trolox	Blanco	Absorbancia	Diferencia B - A
79.9 $\mu$ M	1.008	0.854	0.154
159.8 $\mu$ M	1.008	0.725	0.283

239.7 $\mu$ M	1.008	0.576	0.432
319.6 $\mu$ M	1.008	0.469	0.539
399.5 $\mu$ M	1.008	0.328	0.680
479.4 $\mu$ M	1.008	0.200	0.808
559.3 $\mu$ M	1.008	0.055	0.953

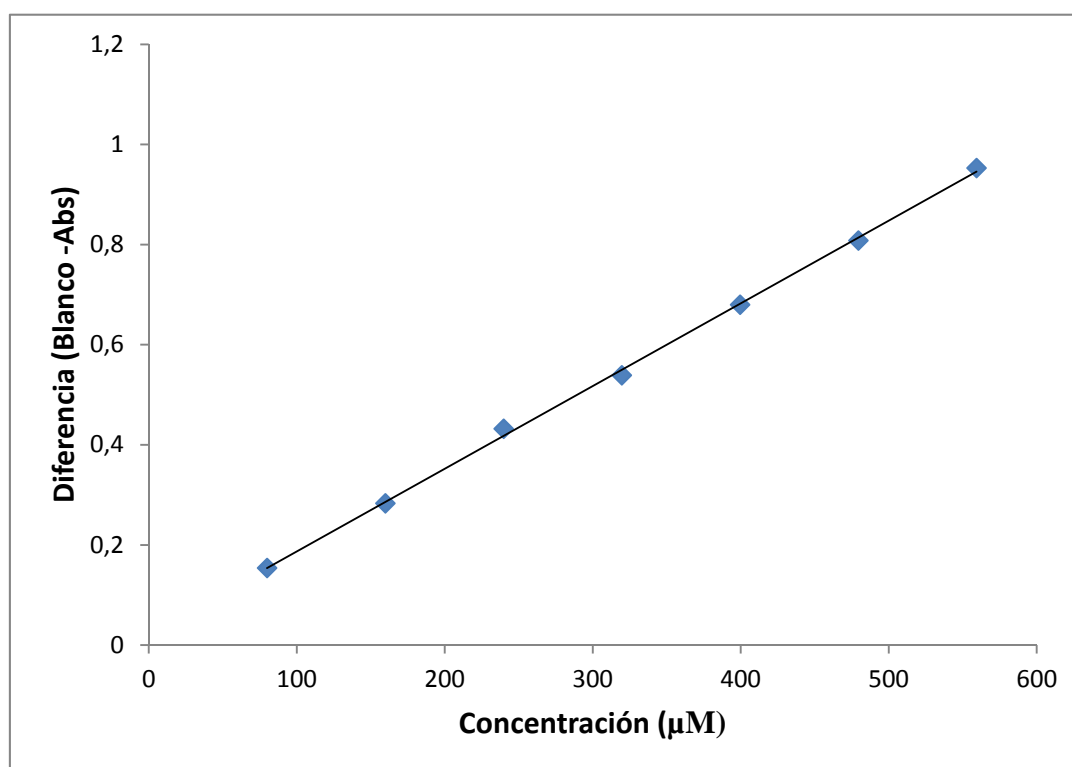


Figura N° 3.3. Gráfico de Calibración usando como estándar Trolox

- Ecuación:

$$y = 0.0017x + 0.022$$

$$R^2 = 0.9991$$

Ecuación 3.2.

Donde:

**y** = Absorbancia

**x** = Concentración

**a** = Intercepto

**b** = Pendiente

### 3.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE OLEORRESINAS Y EXTRACTOS ETANÓLICOS

#### A. Tiempo de Reacción para Oleorresinas y Extractos Etanólicos

Se determinó el tiempo de reacción para cada una de las muestras y se concluye lo siguiente:

- Oleorresinas y Extracto Etanólico de Palillo: Presentaron un tiempo de reacción promedio de 95 minutos.
- Oleorresinas y Extracto Etanólico de Romero: Presentaron un tiempo de reacción promedio de 90 minutos.

#### B. Determinación del Porcentaje de Inhibición del radical ABTS

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Abs Blanco} - \text{Abs Muestra}}{\text{Abs Blanco}} \times 100$$

*Ecuación 3.3.*

*Donde:*

**Abs Blanco** = Absorbancia a tiempo cero del blanco

**Abs Muestra** = Absorbancia de la muestra después del tiempo transcurrido

Como se describe en la metodología de Kuskoski et al., se calculó el porcentaje de inhibición, para las oleorresinas y extracto etanólico de palillo y romero, mediante la ecuación 3.3, los porcentajes obtenidos para cada una de las muestras, pueden observarse a continuación en la Tabla N° 3.4 y Tabla N° 3.5.

*Tabla N° 3.4. Porcentaje de Inhibición del radical ABTS de las oleorresinas y extracto etanólico de Palillo*

% de Inhibición del Radical ABTS	
Oleorresina de Palillo Hep/Acet(90:10) 500ppm	58.05%
Oleorresina de Palillo Hep/Acet(70:30) 500ppm	88.14%

Oleorresina de Palillo Hep/Acet(60:40) 500ppm	89.70%
Oleorresina de Palillo Hep/Acet(50:50) 500ppm	85.98%
Extracto Etanólico de Palillo 500ppm	86.94%

*Tabla N° 3.5. Porcentaje de Inhibición del radical ABTS de las oleorresinas y extracto etanólico de Romero*

<b>% de Inhibición del Radical ABTS</b>	
Oleorresina de Romero Hep/Acet(90:10) 300ppm	39.14%
Oleorresina de Romero Hep/Acet(70:30) 300ppm	46.55%
Oleorresina de Romero Hep/Acet(60:40) 300ppm	46.94%
Oleorresina de Romero Hep/Acet(50:50) 300ppm	43.13%
Extracto Etanólico de Romero 300ppm	40.35%

Este porcentaje de inhibición determina la capacidad que tiene el antioxidante para inhibir al radical; en este caso el ABTS, que presenta una coloración azul fuerte al inicio y después al agregar el antioxidante, se produce una decoloración que aumenta en proporción con el tiempo. Se toma como referencia la absorbancia a tiempo cero (sin el antioxidante) y la absorbancia de la muestra (antioxidante); para expresarlo en porcentaje, como se observa en la ecuación 3.3.

En la Figura N° 3.4, puede observarse que la muestra que presenta un mayor porcentaje de inhibición del radical (89.70%) es la que se obtuvo con la proporción de solventes heptano/acetona (60:40). La oleorresina de palillo obtenida con una proporción (90:10),

es la que presenta un menor porcentaje de inhibición del radical (58.05%). Esto se debe a que los componentes con capacidad antioxidante presentes en la oleorresina de palillo tienen un carácter ligeramente no polar, ya que a esta proporción presentan una capacidad antioxidante más alta, pero cuando se aumenta la proporción del solvente de tipo no polar, la capacidad antioxidante es menor; siendo del mismo modo con el solvente completamente polar como el etanol, que presentó una capacidad antioxidante menor a la oleorresina obtenida con proporción (60:40).

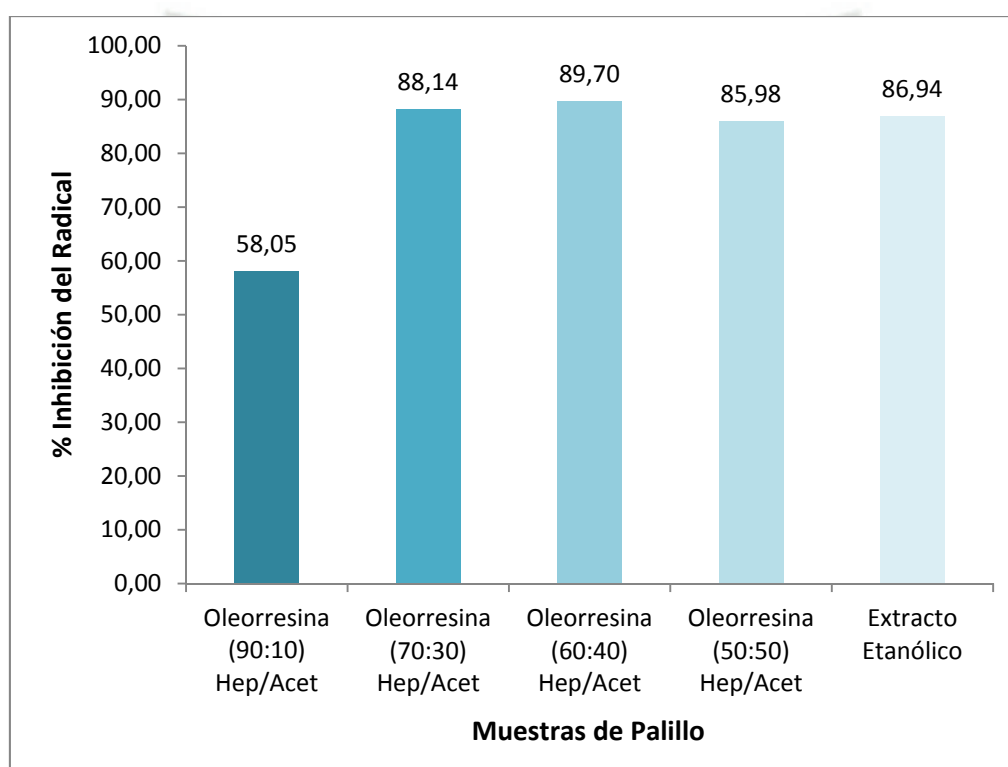


Figura N° 3.4. Porcentaje de Inhibición del Radical ABTS, de cada una de las muestras obtenidas de Palillo

En la Figura N° 3.5, se observa que la oleorresina obtenida con proporción (60:40) de heptano/acetona, presenta el mayor porcentaje de inhibición del radical (46.49%) y el menor porcentaje de inhibición de radical (39.14%), se obtuvo con la proporción (90:10). También puede observarse que entre la oleorresina obtenida con proporción (70:30) y (60:40), existe una mínima diferencia.

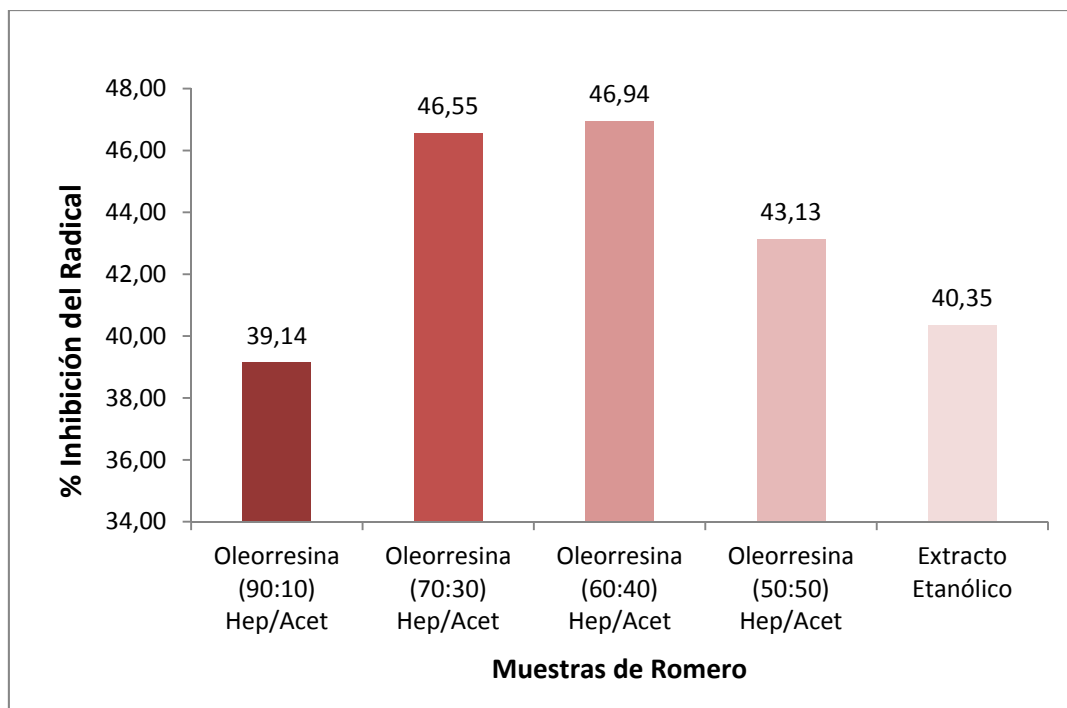


Figura N° 3.5. Porcentaje de Inhibición del Radical ABTS de las muestras obtenidas de Romero.

### C. Determinación de la Capacidad Antioxidante

$$y = 0.0017x + 0.022$$

$$R^2 = 0.9991$$

Ecuación 3.2.

$$\text{Capacidad Antioxidante} = \frac{C \times Fd \times V}{P}$$

Ecuación 3.4.

Donde:

**C** = Concentración de la muestra obtenida con la ecuación anterior

**Fd** = Factor de dilución

**P** = Peso de la muestra

**V** = Volumen

### 3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el uso del programa IBM SPSS Statistics 19. Primero se realizó una prueba ANOVA, para determinar si existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos para cada muestra. Al determinar que el valor de  $p < 0.05$ , se determina que si existe diferencia significativa y para ambas muestras, se realiza un test de Tukey para agrupar a las muestras, según sus diferencias.

Después de utilizar la metodología mencionada en 2.3.3.2, para medir la actividad antioxidante de las oleorresinas y extracto etanólico de palillo, se realizan los cálculos pertinentes con la ecuación 3.2 obtenida del gráfico de calibración de Trolox y la ecuación 3.4 para expresar la capacidad antioxidante ( $\mu\text{mol Trolox/g muestra}$ ). Se calcularon los promedios de capacidad antioxidante y la desviación estándar para cada una de las muestras como puede observarse en la Tabla N° 3.6.

Se observa que con una mayor proporción de solvente lipofílico (heptano), disminuye la capacidad antioxidante, y cuando la proporción del solvente hidrofílico, la capacidad de las muestras obtenidas de palillo es mayor; esto se debe a que con el solvente hidrofílico (acetona) se extraen componentes como la curcumina y derivados, a los que se les atribuye la capacidad antioxidante por la presencia de varios grupos  $-\text{OH}$  en su estructura química, lo que del mismo modo, permite que estos sean captados por el solvente hidrofílico en mayor cantidad. Por lo tanto la presencia de un medio ligeramente no polar como la proporción de solventes (60:40), favorece a que la capacidad antioxidante de las muestras sea mayor, de este modo se extrajeron los componentes presentes en el palillo, que tienen más afinidad con la polaridad de los solventes y que aumentan la capacidad antioxidante.

*Tabla N° 3.6. Capacidad Antioxidante de las diferentes muestras obtenidas de Palillo  $\pm$  la desviación estándar de cada una de ellas. ( $n=3$ )*

---

#### **Capacidad Antioxidante de las Muestras de Palillo ( $\mu\text{Mol Trolox/g muestra}$ )**

---

	Promedio	Desviación Estándar
Oleoresina Hep/Acet (90:10)	682.35	±5.39
Oleoresina Hep/Acet (70:30)	1041.18	±6.23
Oleoresina Hep/Acet (60:40)	1060.00	±5.39
Oleoresina Hep/Acet (50:50)	1020.39	±4.46
Extracto Etanólico	1023.92	±3.78

Después de haber obtenido los resultados por triplicado para cada una de las muestras se aplica la prueba estadística ANOVA, para determinar si existe diferencia significativa entre los datos obtenidos de capacidad antioxidante para el palillo. Como se observa en la Tabla N° 3.7, el valor de significancia es  $p < 0.05$ , por lo tanto se determina que si existe diferencia significativa entre los datos obtenidos.

Tabla N° 3.7. ANOVA de la Capacidad Antioxidante de Muestras de Palillo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. (P)
Inter-grupos	303758.699	4	75939.675	2895.752	.000
Intra-grupos	262.245	10	26.225		
Total	304020.944	14			

Al determinar que sí existe diferencia significativa, se realiza el Test de Tukey, para agrupar las muestras, según su diferencia, como se muestra en la Tabla N° 3.8.

Tabla N° 3.8. HSD de Tukey<sup>a</sup> de las muestras de Palillo

Muestras	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
1.00 (90:10)	3	682.3567			

4.00 (50:50)	3		1020.3900		
5.00 (Et)	3		1023.9233		
2.00 (70:30)	3			1041.1767	
3.00 (60:40)	3				1059.9967
Sig.		1.000	.910	1.000	1.000

*Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.*

*a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.*

Los resultados pueden observarse en la Tabla N° 3.9, las letras al lado de los valores promedio de la capacidad antioxidante, representan grupos distintos.

Se observa que la oleorresina de palillo obtenida con proporción (50:50) de heptano/acetona y el extracto etanólico, pertenecen al mismo grupo; por lo tanto, se determina que entre dichas muestras no existe diferencia significativa, siendo diferente para el caso de las otras tres oleorresinas que sí presentan diferencia significativa, con respecto a estas.

*Tabla N° 3.9. Resultados de la capacidad antioxidante de las muestras de Palillo*

**Capacidad Antioxidante de las Muestras de Palillo ( $\mu\text{Mol Trolox/g}$  muestra)**

	Promedio
Oleorresina Hep/Acet (90:10)	682.35 <sup>A</sup>
Oleorresina Hep/Acet (70:30)	1041.18 <sup>C</sup>
Oleorresina Hep/Acet (60:40)	1060.00 <sup>D</sup>
Oleorresina Hep/Acet (50:50)	1020.39 <sup>B</sup>
Extracto Etanólico	1023.92 <sup>B</sup>

\*Las letras a lado de los valores presentados en la tabla indican la división de grupos, según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos de capacidad antioxidante para cada una de las muestras obtenidas de palillo, fueron representados gráficamente, mediante un diagrama de caja – bigote (Box and Whisker ó Box Plot), que muestra la diferencia entre la capacidad antioxidante diferente para cada una de las muestras obtenidas de palillo y la diferencia que existe entre las tres repeticiones realizadas para cada muestra, como se muestra en

la Figura N° 3.6, en este caso se observa que no existe mucha dispersión de los datos en las repeticiones, ya que los valores no se alejan mucho del promedio.

Se observa que la oleorresina de palillo obtenida con una proporción de solventes (60:40), es la que presenta mayor capacidad antioxidante, con respecto a las otras cuatro muestras y que entre la oleorresina obtenida con proporción (50:50) y el extracto etanólico, no existe diferencia significativa, como se evidenció con el test de Tukey.

### CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS DE PALILLO

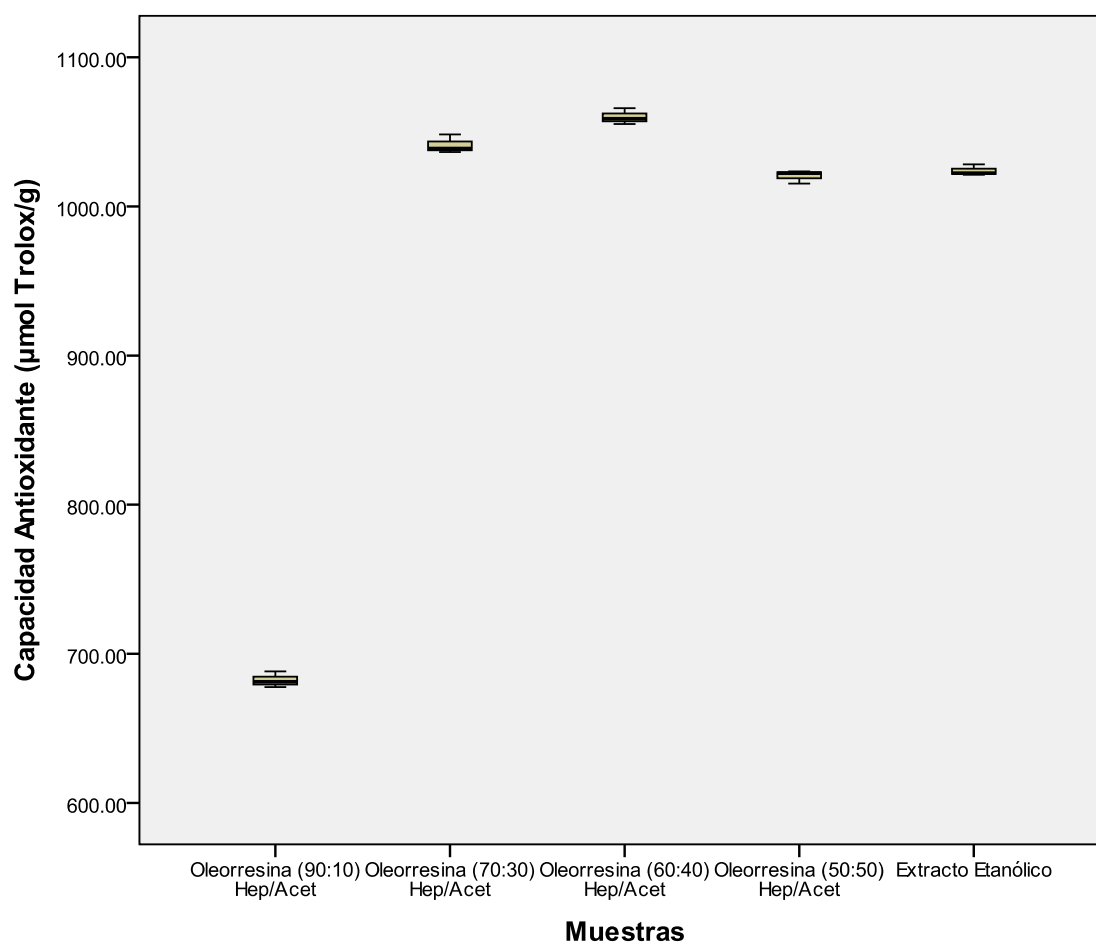


Figura N° 3.6. Diagrama de caja-bigote de la capacidad antioxidante de muestras de palillo

Después de realizar los cálculos pertinentes para obtener los valores de capacidad antioxidante para las oleorresinas y extracto etanólico de romero, mediante las ecuaciones 3.2 y 3.4, se calcularon los promedios y la desviación estándar para cada una de ellas como se observa en la Tabla N° 3.10.

Al igual que para las muestras del palillo se observa, que en el caso de las muestras de romero, cuando se aumenta mucho la cantidad de solvente no polar (heptano), la capacidad antioxidante disminuye; cuando se aumenta la proporción de acetona, la capacidad antioxidante es mayor. Del mismo modo, esto podría deberse a una mayor captación de componentes de carácter hidrofílico, por parte del solvente polar que atribuyen a las muestras de romero una mayor capacidad antioxidante. Así cuando se aumenta la proporción de solvente no polar (heptano), se estarían extrayendo componentes lipofílicos que no poseen capacidad antioxidante significativa.

*Tabla N° 3.10. Capacidad Antioxidante de las diferentes muestras obtenidas de Romero, Promedios  $\pm$  la desviación estándar. (n=3)*

<b>Capacidad Antioxidante de las Muestras de Romero (<math>\mu</math>Mol Trolox/g muestra)</b>		
	<b>Promedio</b>	<b>Desviación Estándar</b>
Oleorresina Hep/Acet (90:10)	744.44	$\pm 2.26$
Oleorresina Hep/Acet (70:30)	895.42	$\pm 8.84$
Oleorresina Hep/Acet (60:40)	903.92	$\pm 10.92$
Oleorresina Hep/Acet (50:50)	831.37	$\pm 5.19$
Extracto Etanólico	769.28	$\pm 10.80$

Cada una de las muestras se trabajó por triplicado, con los valores resultantes se realizó la prueba estadística ANOVA, para determinar si es que existe diferencia significativa entre los datos obtenidos, como se observa en la Tabla N° 3.11.

El valor de significancia obtenido fue  $p < 0.05$ , valor que determina, que existe diferencia significativa entre los valores de capacidad antioxidante de las oleorresinas y extracto etanólico de romero. Por ello se procede a realizar el test de Tukey, para agrupar a las muestras según sus diferencias.

Tabla N°3.11. ANOVA de la Capacidad Antioxidante de Romero

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.(P)
Inter-grupos	62240.594	4	15560.148	224.807	.000
Intra-grupos	692.155	10	69.215		
Total	62932.748	14			

La Tabla N° 3.12, muestra la agrupación de los valores de capacidad antioxidante obtenidos para las muestras de romero, mediante el test de Tukey.

Tabla N° 3.12. HSD de Tukey<sup>a</sup> de las muestras de Romero

Muestras	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		A	B	C	D
1.00 (90:10)	3	744.4467			
5.00 (Et)	3		769.2800		
4.00 ( 50:50)	3			831.3700	
2.00 (70:30)	3				895.4233
3.00 (60:40)	3				903.9233
Sig.		1.000	1.000	1.000	.724

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Mediante el test de Tukey, se pudieron agrupar las oleorresinas y extracto etanólico de romero. En la Tabla N°3.13 se observa que aquellas que tienen la misma letra forman parte del mismo grupo, es decir, entre ellas no hay diferencia significativa. En este caso se concluye que la oleorresina de romero obtenida con proporción de solventes (60:40) y la oleorresina de romero obtenida con proporción de solventes (70:30), se encuentran en el mismo grupo, por lo tanto, entre ellas no existe diferencia significativa, a diferencia de las demás, que se encuentran en diferentes grupos.

*Tabla N°3.13. Resultados de la capacidad antioxidante de las muestras de Romero*

<b>Capacidad Antioxidante de las Muestras de Romero (<math>\mu\text{Mol Trolox/g}</math> muestra)</b>	
	<b>Promedio</b>
Oleorresina Hep/Acet (90:10)	744.44 <sup>A</sup>
Oleorresina Hep/Acet (70:30)	895.42 <sup>B</sup>
Oleorresina Hep/Acet (60:40)	903.92 <sup>B</sup>
Oleorresina Hep/Acet (50:50)	831.37 <sup>C</sup>
Extracto Etanólico	769.28 <sup>D</sup>

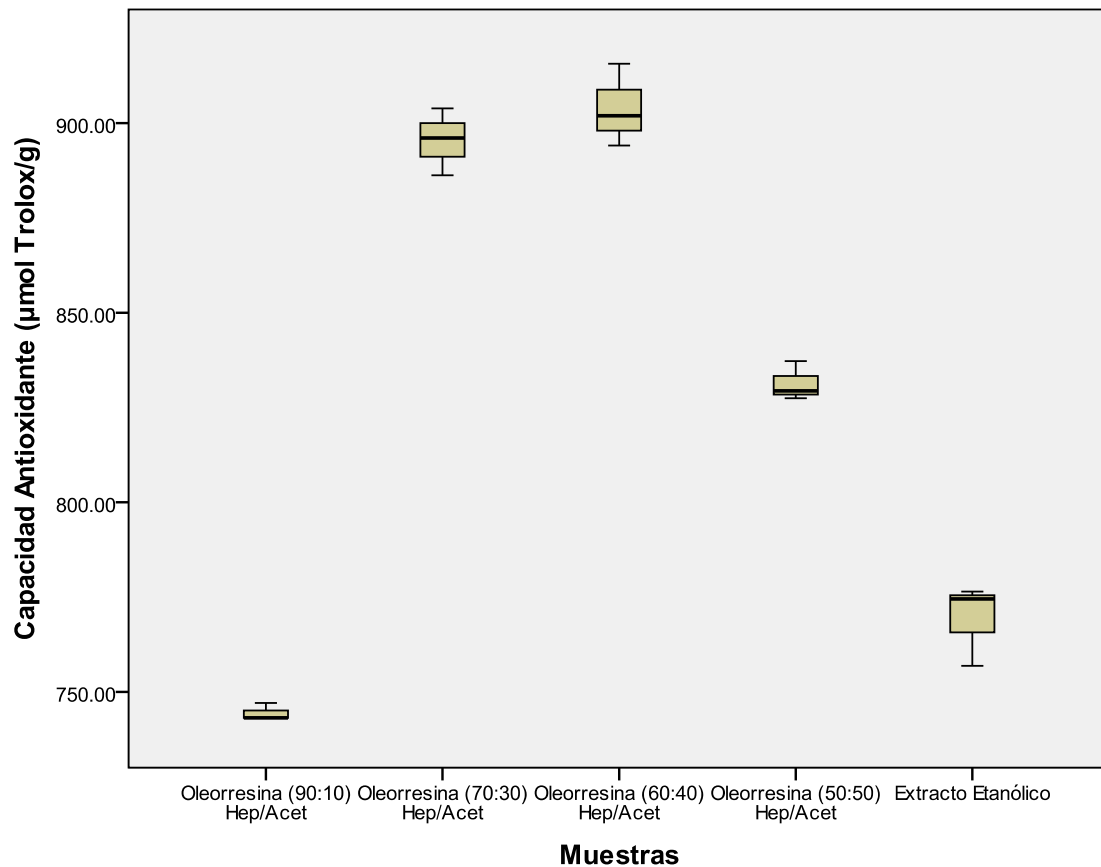
\* Las letras a lado de los valores presentados en la tabla indican la división de grupos, según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Para poder observar gráficamente los resultados de la capacidad antioxidante de las oleorresinas y extracto etanólico de romero, estos valores fueron representados mediante un diagrama de caja –bigote (Box and Whisker ó Box Plot), como se muestra en la Figura N° 3.7.

Se observa que a diferencia del diagrama caja – bigote para las muestras obtenidas de palillo, aquí existe una mayor dispersión de los datos con respecto al promedio de cada una de las muestras, esto también se evidencia en que las muestras obtenidas de romero presentan una mayor desviación estándar que las muestras obtenidas de palillo.

En este caso también se observa que la oleorresina de romero obtenida con una proporción de solventes (60:40), es la que presenta mayor capacidad antioxidante, con respecto a las otras cuatro muestras; pero en este caso se observa que el valor de capacidad antioxidante para la oleorresina obtenida con proporción (70:30), es muy cercano a la de proporción (60:40), en la Figura N° 3.7 se evidencia gráficamente que entre ambas muestras no existe diferencia significativa, como se determinó mediante el test de Tukey.

### CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS DE ROMERO



*Figura N°3.7. Diagrama de Caja-Bigote de la Capacidad Antioxidante de las muestras obtenidas de Romero*

Después de haber realizado los cálculos respectivos, para las muestras obtenidas a partir de romero y palillo, se seleccionaron aquellas muestras que presentaron el valor más alto de capacidad antioxidante de cada grupo, siendo estas la oleorresina de palillo (60:40) y la oleorresina de romero (60:40), como puede observarse en la Figura N° 3.7 y en la Figura N°3.6.

Se realizó una prueba estadística ANOVA, para determinar si entre ambos valores existe diferencia significativa. De este modo en la Tabla N° 3.14 se observa que el valor  $p < 0.05$ , por lo tanto se determina que entre ambas muestras existe diferencia significativa; siendo el valor de capacidad antioxidante de oleorresina de palillo (60:40) expresado en  $\mu\text{mol Trolox/g}$  de muestra, mayor que el valor de la oleorresina de romero (60:40).

*Tabla N° 3.14. ANOVA de la Comparación entre muestras de Palillo y Romero*

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.(p)
Inter-grupos	36538.328	1	36538.328	492.820	.000
Intra-grupos	296.565	4	74.141		
Total	36834.893	5			



## CONCLUSIONES

1. El mayor rendimiento para las oleorresinas y extracto etanólico de palillo, se obtuvo con la mezcla de solventes en proporción (60:40) y el menor rendimiento para el extracto etanólico.

El mayor rendimiento para las oleorresinas y extracto etanólico de romero, se obtuvo con la proporción de solventes (50:50) y al igual, que para las muestras obtenidas de palillo, el menor rendimiento se obtuvo para el extracto etanólico.

2. Los valores de capacidad antioxidante expresada en  $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de muestra, para las oleorresinas y extracto etanólico de palillo fueron de  $1060.00 \pm 5.39$ ,  $1041.18 \pm 6.23$ ,  $1020.39 \pm 4.46$ ,  $682.35 \pm 5.39$  y  $1023.92 \pm 3.78$ , respectivamente. El mayor valor de capacidad antioxidante lo presentó la oleorresina de palillo (60:40) heptano/acetona.

Los valores de actividad antioxidante expresada en  $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de muestra, para las oleorresinas y extracto etanólico de romero fueron de  $903.92 \pm 10.92$ ,  $895.42 \pm 8.84$ ,  $831.37 \pm 5.19$ ,  $744.44 \pm 2.26$  y  $769.28 \pm 10.80$ , respectivamente. El mayor valor de capacidad antioxidante lo presentó la oleorresina de romero (60:40) heptano/acetona.

3. Las oleorresinas y extractos etanólicos de ambas especias presentan capacidad antioxidante en referencia a los valores de la gráfica de calibración con Trolox, siendo la capacidad antioxidante del palillo mayor a la del romero.

## RECOMENDACIONES

- Realizar estudios para determinar la actividad antioxidante de oleorresinas y extractos etanólicos de palillo y romero, empleando otras técnicas, como por ejemplo aquellas que usen radicales libres de relevancia biológica, es decir, que se produzcan en nuestro organismo, como la técnica de ORAC; para que de este modo exista una mayor aproximación a los procesos fisiológicos con los resultados obtenidos.
- Incluir a especias como el palillo y romero, en la dieta diaria, ya que la incidencia de enfermedades de tipo degenerativo (enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, entre otras); ha aumentado considerablemente, por el incremento del estrés oxidativo y es importante el consumo de alimentos funcionales que presenten capacidad antioxidante para prevenir el desarrollo de las mismas. Del mismo modo, estas oleorresinas son de gran importancia para su uso en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria, por sus propiedades antioxidantes, para poder ser utilizadas como conservantes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KUKLINSKY, C., Farmacognosia Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural, Ediciones Omega S.A., Barcelona, 2000.
2. SHARAPIN, N. et al., Fundamentos de tecnología fitoterapéutica, Colombia, Editorial Roberto Pinzón, 2000.
3. DRUECKHAMMER, D.G. et al., Acetone-Heptane as a Solvent System for Combining Chromatography on Silica Gel with Solvent Recycling, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2012.
4. CO, M. et al., Extraction of Antioxidants from Spruce (*Picea abies*) Bark using Eco-friendly Solvents, *Phytochemical Analysis*, 2012, 23, 1-11.
5. BRUNETON, J., Farmacognosia Fitoquímica Plantas medicinales, Segunda edición, Zaragoza, Editorial Acribia S.A., 2001.
6. VISENTÍN et al., Supercritical CO<sub>2</sub> fractionation of rosemary ethanolic oleoresins as a method to improve carnosic acid recovery, *El Servier*, 2011, pp 142-145.
7. KOICHI, I. et al., Purification of Curcumin, Demethoxycurcumin, and Bisdemethoxycurcumin by High-Speed Countercurrent Chromatography, *J.Agric. Food Chem.*, 2008, 56 (20), pp 9328-9336.
8. RUÍZ TORRES, N. et al., Determinación de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante en granos de maíz, México, Revista Fitotecnia Mexicana, 2008, pp.29-44.
9. MARTÍNEZ-VALVERDE, I. et al., (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos en la dieta. *Arch Latinoam Nutr.* 50:5-18
10. DUTHIE, G. y CROZIER, A. (2000). Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr Opin Lipidol.* 11:43-47
11. HO, C., et al., Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health I, Washington, DC, ACS Symposium Series, 1992.
12. SHAHIDI, F., JANITHA, P.K. y WANASUNDARA, P.D. (1992). "Phenolic antioxidants". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* Filadelfia, v. 32, n. 1, p. 67-103.

13. HEIM, K.E., Tagliaferro AR, Bobilya DJ. “Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships” *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 (2002) 572-84
14. RICE-EVANS CA, MILLER NJ, PAGANGA G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2:152-159
15. CAO, G., Sofic E, Prior RL. (1997). Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids. Structure-activity relationships. *Free Rad Biol Med*.22:749-760.
16. VELIOGLU, Y.S. et al., Antioxidant Activity and Total Phenolics in selected Fruits, Vegetables, and Grain Products, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46, 4113-4117.
17. AVELLO, M. y SUWALSY, M., Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección, n494, Scielo, Concepción, 2006.
18. ANDREESCU, S. y HEPPEL, M., Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy, Washington, DC, ACS Symposium Series, 2011.
19. HALLIWELL, B. y WHITEMAN, M., Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *British Journal of Pharmacology*(2004) 142, 231-255.
20. VALKO, M. et al., Free Radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, 2006, *Chemical-biological Interactions* 160, 1-40.
21. RODRÍGUEZ PERÓN, J. et al., 2001, Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo, *Revista Cubana de Medicina Militar*, 30(1): 36-44.
22. CASTEL, M., Estudio de las propiedades funcionales, tecnológicas y fisiológicas de las proteínas de amaranto, Argentina, 2010, Presentada a la Universidad Nacional del Litoral, para obtener el título de Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos.
23. MARLETTA, M.A. (1988). “Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate”. *Biochemistry*. Washington. v. 27, n. 24, p. 8706-8711.
24. DÍAZ ACOSTA, A. y MEMBRILLO HERNÁNDEZ, J., 2006, Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos, *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* (México), vol.9, 34-44.

25. VICEDO TOMEY, A. y VICEDO ORTEGA, Y., 2000, Relaciones del estrés oxidativo con el catabolismo de proteínas, *Revista Cubana de Investigaciones Biológicas* (La Habana), vol.19.
26. GONZÁLES-TORRES, M. et al., Daño Oxidativo y Antioxidantes, *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe y Portugal*, Bioquímica vol. 25 N°98, 2000.
27. MARTÍNEZ-CAYUELA, M., Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno, 1998, *Ars Pharmaceutica* 39:1, 5-18.
28. NIKI, E. et al., Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, (2005), 668-676.
29. STRYER, L. et al., *Biochemistry*, 5ta Edición, New York, W.H. Freeman, 2002.
30. REITER, R.J., Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain, *FASEB J.*9, 526-533 (1995).
31. AMES, B.N. et al., Oxidants, Antioxidants, and degenerative diseases of aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993),7915-7921.
32. SIES, H., Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants, *Experimental Physiology* (1997), 82, 291-295.
33. MORELLO, M., et al., Free Radicals in Food, Chemistry, Nutrition, and health Effects, Washington, DC, ACS Symposium Series, 2002.
34. FANG, Y. et al., Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition, USA, *Nutrition* Volume 18, 10, 2002.
35. BECKAM, K.B. y AMES, B.N., The Free Radical Theory of Aging Matures, *Physiological Reviews*, Vol.78, N°2, USA,1998.
36. BOVERIS, A., La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina, España, *Ars Pharm* 2005; 46 (1): 85-95.
37. CISNEROS PREGO, E., La Glutathion reductasa y su importancia biomédica, *Revista Cubana de Investigación Biomédica* 14(1).
38. WARNER, D. et al., Oxidants, antioxidants and ischemic brain, 2004, *The Journal of Experimental Biology* 207, 3221-3231.
39. GVOZDJÁKOVA, A., Oxidants, Antioxidants and Oxidative Stress, Springer, 2008.
40. PHAM-HU, Lien ai et al., Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health, 2008, *International Journal of Biomedical Science* 4(2), 89-96.

41. PÉREZ JIMÉNEZ, J., Metodología para la Evaluación de Ingredientes Funcionales Antioxidantes, Madrid, Presentada a la Facultad de Ciencias en la Universidad Autónoma de Madrid, para obtener el título de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.
42. ARUOMA, O.I., Free radicals, antioxidants and international nutrition, *Asia and Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 8, 1 (1999) 53-63
43. EL-AGAMEY A. et al., “Carotenoid radical chemistry and antioxidant/prooxidant properties” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430 (2004) 37-48.
44. PRIOR, R.L., et al., Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and phenolics in Foods and Dietary Supplements, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 4290-4302.
45. HUANG, D. et al., The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, 2005, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
46. FERNÁNDEZ-PACHÓN, M., VILLAÑO, D. y GARCÍA-PARRILLA, M., 2006, Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo, Sevilla, *Revista ALAN, Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, vol.56,2.
47. YANG, J. et al., In vitro antioxidant properties of rutin, China, *LWT* 41 (2008), 1060-1066.
48. RE, R. et al., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, 1999.
49. Benzie, I. F. F. & Strain J J. “The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay”. *Analytical Biochemistry*, 239 (1996) 70–76.
50. ALVIS, A., Evaluación de la Actividad y el Potencial Antioxidante de Extractos Hidro – Alcohólicos de Cúrcuma (*Curcuma longa*), 2011, *Información Tecnológica* Vol.23 N°2.
51. GALEANO, P., et al., Síntesis y actividad antioxidante de dos derivados de isoespintanol, *Revista Colombiana de Química*, vol.39, Bogotá, 2010.
52. KUSKOSKI, M. et al., Actividad Antioxidante de Pigmentos Antociánicos, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 24(4): 691-693, out.-dez. 2004.



Tabla N° 3.15. Procesamiento de muestras obtenidas de palillo por triplicado

Muestra	Blanco	Absorbancia	Absorbancia Corregida	Peso (g)	Factor de dilución	Volumen Final (L)	$\mu\text{mol Trolox/ml}$	$\mu\text{mol Trolox / g muestra}$
Oleorresina Palillo (90:10)	1.037	0.439	0.598	0.5	1	1	338.82	677.65
		0.430	0.607	0.5	1	1	344.12	688.24
		0.436	0.601	0.5	1	1	340.59	681.18
Oleorresina Palillo (70:30)	1.029	0.124	0.905	0.5	1	1	519.41	1038.82
		0.126	0.903	0.5	1	1	518.24	1036.47
		0.116	0.913	0.5	1	1	524.12	1048.24
Oleorresina Palillo (60:40)	1.029	0.110	0.919	0.5	1	1	527.65	1055.29
		0.101	0.928	0.5	1	1	532.94	1065.88
		0.107	0.922	0.5	1	1	529.41	1058.82
Oleorresina Palillo (50:50)	1.034	0.142	0.892	0.5	1	1	511.76	1023.53
		0.143	0.891	0.5	1	1	511.18	1022.35
		0.149	0.885	0.5	1	1	507.65	1015.29
Extracto Etanólico de Palillo	1.026	0.136	0.890	0.5	1	1	510.59	1021.18
		0.135	0.891	0.5	1	1	511.18	1022.35
		0.130	0.896	0.5	1	1	514.12	1028.24

Tabla N° 3.16. Procesamiento de muestras obtenidas de romero por triplicado

Muestra	Blanco	Absorbancia	Absorbancia Corregida	Peso (g)	Factor de dilución	Volumen Final (L)	$\mu\text{mol Trolox/ml}$	$\mu\text{mol Trolox/g muestra}$
Oleoresina Romero (90:10)	1.037	0.624	0.403	0.3	1	1	224.12	747.06
		0.626	0.401	0.3	1	1	222.94	743.14
		0.626	0.401	0.3	1	1	222.94	743.14
Oleoresina Romero (70:30)	1.029	0.550	0.479	0.3	1	1	268.82	896.08
		0.555	0.474	0.3	1	1	265.88	886.27
		0.546	0.483	0.3	1	1	271.18	903.92
Oleoresina Romero (60:40)	1.029	0.547	0.482	0.3	1	1	270.59	901.96
		0.540	0.489	0.3	1	1	274.71	915.69
		0.551	0.478	0.3	1	1	268.24	894.12
Oleoresina Romero (50:50)	1.034	0.589	0.445	0.3	1	1	248.82	829.41
		0.585	0.449	0.3	1	1	251.18	837.25
		0.590	0.444	0.3	1	1	248.24	827.45
Extracto Etanólico de Romero	1.026	0.618	0.408	0.3	1	1	227.06	756.86
		0.608	0.418	0.3	1	1	232.94	776.47
		0.609	0.417	0.3	1	1	232.35	774.51