



Universidad del Azuay

Facultad de Ciencia y Tecnología

Escuela de Ingeniería en Alimentos

Cuantificación de la actividad antioxidante de productos
naturales por método enzimático

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de
Ingeniería en Alimentos

Autor: Aída Natalie Arias Bravo

Director: Dr. Piercosimo Tripaldi

Cuenca-Ecuador
2008

DEDICATORIA

Dedicado a todos esos seres especiales que ocupan u ocuparon un lugar en este mundo, y que gracias a la magia de la vida han cruzado mi camino...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Dios por permitirme ser parte de este mundo para luchar por cumplir mis metas y sueños. Además agradezco de todo corazón a mis Padres Miguel y Aida por su apoyo incondicional en este largo camino. A mi Abuelito, por impulsarme siempre hacia adelante, así como a mis hermanas, sobrinos y cuñado, por creer siempre en mí.

Dirijo un agradecimiento especial a la Dra. María Elena Cazar Ramírez, por ser la persona que me impulsó y guió durante todo el desarrollo de este trabajo.

Y por último agradezco de todo corazón a todos los profesores, compañeros, amigos y amigas que ayudaron directamente e indirectamente a la culminación de este trabajo de graduación.

RESUMEN

El presente estudio propuso cuantificar la actividad antioxidante de cinco especies vegetales: romero, Albahaca, laurel, hierba buena y hierba luisa.

Se obtuvieron los extractos y aceites esenciales de cada una de estas plantas, con el fin de estudiar su perfil cromatográfico y actividad antioxidante.

Los extractos fueron separados mediante cromatografía en capa fina, Previamente se optimizó la mezcla ideal de solventes utilizando técnicas de diseño experimental. Los aceites esenciales fueron evaluados por su potencial de captura del radical libre estable DPPH. Los resultados obtenidos permiten establecer una aproximación al potencial de estas especies como antioxidantes, y su posible uso en industrias alimenticias.

ABSTRACT

The aim of the present project was to quantify the antioxidant activity of five different plants species: rosemary, basil, laurel, mint and lemongrass.

Extracts and essential oils prepared from plant material were submitted to studies on their chromatographic profile and Antioxidant Activity.

The extracts were separated by means of Thin Layer Chromatography (TLC).

The ideal mixture of solvents was previously optimized using experimental design techniques. The essential oils were evaluated by their ability to scavenge the stable free radical DPPH. The results presented allowed to establish an approximation to the capacity of these plants as antioxidants and their further uses in food processes.

Índice de Contenidos

Dedicatoria	II
Agradecimientos.....	III
Resumen.....	IV
Abstract.....	V
Índice de Contenidos.....	VI
Índice de Anexos.....	IX

Introducción	10
--------------------	----

Capítulo 1: Marco Teórico

Introducción.....	12
1.1 Mecanismos de Oxidación en Sistemas Biológicos.....	12
1.2 Mecanismos de Acción de los Antioxidantes.....	13
1.3 Antioxidantes Naturales.....	14
1.3.1 Fuentes.....	14
1.4 Métodos Cromatográficos de Separación de Mezclas.....	16
1.4.1 Cromatografía de Capa Fina (TLC).....	16
1.5 Ensayos para Determinar la Actividad Antioxidante "In Vitro"	18
1.5.1 Ensayo DPPH: Fundamento.....	18
1.6 Conclusiones.....	19

Capítulo 2: Selección de Especies Vegetales

Introducción.....	20
2.1 Características de las Especies.....	20
2.1.1 Romero.....	20
2.1.2 Albahaca.....	21

2.1.3 Hierba Luisa.....	22
2.1.4 Laurel.....	23
2.1.5 Hierba Buena.....	24
2.2 Conclusiones.....	25

Capítulo 3: Obtención de Extractos y Aceites Esenciales de Origen Natural

Introducción.....	26
3.1 Obtención de Extractos de Aceites Esenciales.....	26
3.1.1 Preparación de Extractos.....	26
3.1.2 Preparación de Aceites Esenciales.....	26
3.2 Métodos Empleados.....	26
3.2.1 Método de Soxhlet para Obtención de Extractos.....	26
3.2.2 Materiales y Reactivos.....	27
3.2.3 Procedimiento.....	27
3.3 Método para obtención de Aceites Esenciales.....	28
3.3.1 Materiales y Reactivos.....	28
3.3.2 Procedimiento.....	28
3.4 Extracción Líquido-Líquido de un Aceite Esencial.....	29
3.4.1 Materiales y reactivos.....	29
3.4.2 Procedimiento.....	29
3.5 Rendimiento.....	30
3.5.1 Rendimiento de los Extractos.....	30
3.5.2 Rendimiento de los Aceites Esenciales.....	31
3.6 Conclusiones.....	31

Capítulo 4: Cuantificación de la Actividad Antioxidante por ensayo DPPH

Introducción.....	32
4.1 Descripción.....	32
4.2 Resultados	33
4.2.1 Extractos Vegetales y Aceites Esenciales.....	33

4.2.2 Estudios de la Actividad Antioxidante de las Fracciones de Extractos Vegetales.....	33
4.3 Conclusiones.....	36

Capítulo 5: Estudio del Perfil Cromatográfico de los Extractos Vegetales

Introducción.....	37
5.1 Selección de Fase Móvil para Cromatografía Preparativa.....	37
5.1.1 Diseño de Mezclas.....	37
5.1.2 Características de los Solventes.....	40
5.2 cálculos y Resultados.....	41
5.3 Separación de los Extractos Vegetales.....	46
5.3.1 Descripción.....	46
5.4 Resultados de Máximos en UV y Señales de Características IR de los Extractos y Fracciones.....	49
5.5 Conclusiones.....	50
Conclusiones.....	51
Bibliografía.....	53

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Espectro IR del extracto de romero puro	55
Anexo 2: Espectro IR del extracto de laurel puro	56
Anexo 3: Espectro IR de la fracción más activa de laurel(N 6).....	57
Anexo 4: Espectro IR del extracto de hierba luisa puro.....	58
Anexo 5: Espectro IR del extracto de hierba Buena puro.....	59
Anexo 6: Espectro IR del extracto de albahaca puro.....	60
Anexo 7: Espectro IR de la fracción más activa de albahaca(N 5).....	61

Arias Bravo, Aída Natalie
Trabajo de Graduación
Tripaldi Capelleti, Piercósimo
Junio, 2008

CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PRODUCTOS NATURALES POR MÉTODO ENZIMÁTICO

INTRODUCCIÓN

A lo largo de los años la necesidad del hombre por conservar los alimentos ha sido inminente, se han buscado varias formas de detener las reacciones químicas que se llevan a cabo durante la descomposición de los alimentos. Uno de los problemas más comunes que se presentan, es la oxidación, por esta razón la ciencia ha volcado sus esfuerzos a la búsqueda de aditivos que detengan o retarden este fenómeno.

Los antioxidantes más utilizados a nivel mundial son el BHA, BHT, Galato de Propilo y TBHQ, pero su utilización constituye un riesgo para la salud de los consumidores, ya que ha sido científicamente comprobado su efecto cancerígeno.

Para ofrecer una alternativa al uso de antioxidantes sintéticos, nuestro propósito fue obtener extractos y aceites esenciales de plantas de Romero, Laurel, Hierba buena, Albahaca y Hierba Luisa; que son plantas que se encuentran con facilidad en nuestra zona, además que son utilizados como condimentos en algunas comidas, mejorando sus características organolépticas.

El rendimiento en extractos y aceites de estas 5 especies fue cuantificado, así como su actividad antioxidante, mediante la captura del radical libre estable DPPH.

Los extractos vegetales fueron analizados en su perfil cromatográfico. Un seguimiento de la bioactividad de los extractos fue desarrollado, evaluando la actividad antioxidante de cada fracción aislada. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una aproximación inicial al tipo de compuestos responsables de la actividad exhibida por los extractos vegetales.

Este trabajo de tesis se desarrolló en el marco del Proyecto UDA-CONESUP 21 "Selección de especies vegetales con actividad antioxidante "in vitro". Aplicaciones en preservación de alimentos". Los resultados obtenidos en este trabajo complementaron las investigaciones realizadas en este proyecto.

CAPITULO 1

MARCO TEÓRICO

Introducción

En este capítulo constarán todos los conceptos referentes a mecanismos de oxidación, mecanismos de acción de los antioxidantes, antioxidantes naturales, fuentes de estos compuestos y los métodos que se utilizaron en la ejecución de este trabajo, como son el ensayo DPPH y cromatografía de capa fina.

1.1 Mecanismos de Oxidación en sistemas biológicos

La oxidación, consiste en la pérdida de electrones de un átomo, en el caso de los compuestos, uno de sus átomos es el que, al perder electrones total o predominantemente, determina la oxidación del mismo. El mecanismo de la oxidación se puede dividir en tres etapas principales:

- **La Iniciación:** Debido a la inestabilidad de algunas moléculas orgánicas y a la actividad de uno o más factores catalizadores, ocurre la formación del primer radical libre. El radical libre se forma, por ejemplo, con un átomo de hidrógeno retirado de una molécula de grasa. Los factores que más influyen en la formación de radicales libres y catalizan el proceso de oxidación son: presencia de iones metálicos en el producto (en la sal o en condimentos), de calor o luz, de enzimas, medio alcalino, moléculas con insaturaciones, disponibilidad de oxígeno para reaccionar, entre otros.

- **La Propagación:** El radical libre que se forma en la etapa de iniciación es atacado por una molécula de oxígeno, formando un peróxido, que todavía continúa siendo radical libre.

Este peróxido ataca a una nueva molécula de grasa, que también pierde un átomo de hidrógeno, formando un hidroperóxido y además un nuevo radical libre, iniciando el proceso en cadena. Si el oxígeno disponible fuera suficiente y ningún antioxidante estuviera presente en el producto, esta etapa continuará degradando el producto.

- **La Terminación:** En esta etapa los peróxidos se combinan, formando moléculas más estables y los hidroperóxidos forman otras diversas moléculas con funcionalidades ácidas, aldehídicas, alcohólicas, cetónicas, etc. En esta etapa, todo el material es degradado irreversiblemente, llevando a la descomposición total del producto, generando olor rancio y cambio de color, demostrando la oxidación. El desagradable olor rancio es el resultado de la formación de varias moléculas volátiles, algunas de las cuales poseen sabor desagradable y potencial tóxico (Vieira, A. 2005)

1.2 Mecanismos de acción de los antioxidantes:

Los antioxidantes pueden actuar por medio de diferentes mecanismos; al detener la reacción en cadena de oxidación se provoca que esta etapa finalice artificialmente, adicionando un antioxidante al sistema. El antioxidante le suministra oxígeno al sistema, que reacciona con los radicales libres y peróxidos formados, evitando que éstos ataquen a otras moléculas aún "saludables", impidiendo la formación de nuevos radicales libres. La molécula del antioxidante que suministra el hidrógeno queda

inutilizada, debido a este hecho, el tipo y la cantidad de antioxidante a utilizarse, debe decidirse de forma muy analizada, optimizando su utilización y maximizando su eficiencia.

Además de los antioxidantes, existen los llamados agentes quelantes o sinérgicos de antioxidantes, que ayudan de otras formas a evitar la oxidación, por ejemplo:

- Eliminando el oxígeno atrapado o disuelto en el producto, o el presente en el espacio que queda sin llenar en los envases, el denominado espacio de cabeza, o eliminando las trazas de ciertos metales
- Eliminando las trazas de ciertos metales, como cobre y hierro, que actúan como catalizadores de la reacción de oxidación. (Miguel Calvo Rebollar, 1991)

1.3 Antioxidantes Naturales

Se puede definir como antioxidante natural a todas aquellas sustancias o compuestos que están presentes o que pueden ser extraídas de tejidos de especies vegetales o animales, o bien a aquellos compuestos que se forman durante el cocinado o procesado de alimentos de origen vegetal o animal, que tengan una capacidad antioxidante.

1.3.1 Fuentes

Las especies vegetales superiores sintetizan una amplia gama de compuestos fenólicos. En este grupo se incluyen los flavonoides, constituidos por un esqueleto difenilpropano ($C_6-C_3-C_6$). La familia de los flavonoides está constituida por flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanos, flavanoles, leucoantocianidinas, antocianidinas, auronas, charconas e isoflavonas. La diferencia estructural en cada flavonoide resulta de la variación y el número

de grupos hidroxilo y el grado de glicosilación de estos grupos (Buchanan, 2000).

Más de 4000 variedades de flavonoides han sido identificadas hasta la fecha, siendo muchos de ellos responsables del color atractivo de flores, frutos y hojas. Varios estudios epidemiológicos sugieren un rol protector de los flavonoides y su consumo se relaciona con la disminución del riesgo de sufrir enfermedades coronarias. La actividad antioxidante de estos compuestos se da por mecanismos de captura de radicales libres, donación de protones, y capacidad quelante de metales. Estas propiedades se atribuyen a los grupos hidroxilo fenólicos unidos a los anillos de su estructura.

La capacidad de los flavonoides como antioxidantes depende de la estructura molecular. La posición de los grupos hidroxilo y otras características presentes en la estructura química de flavonoides son importantes para sus antioxidantes, rescatando la actividad de los radicales libres. La quercetina, el flavonoide más abundante en la dieta, es un potente antioxidante porque tiene todas las características estructurales correctas para rescatar la actividad de los radicales libres.

Los aceites esenciales, constituidos por mezclas de terpenoides, hidrocarburos, alcaloides y aldehídos, presentan actividades biológicas diversas. En los últimos años se reporta su actividad antimicrobiana ante bacterias y hongos y como antioxidantes. La ventaja de los aceites esenciales es su bioactividad en fase de vapor, lo cual los hace atractivos como posibles fumigantes de frutos almacenados. Además, su potencial actividad antioxidante podría presentarlos como candidatos para sustituir aditivos empleados para inhibir el enranciamiento oxidativo en alimentos (Käñkönen *et al.*, 1999; Nijveldt *et al.*, 2001) .

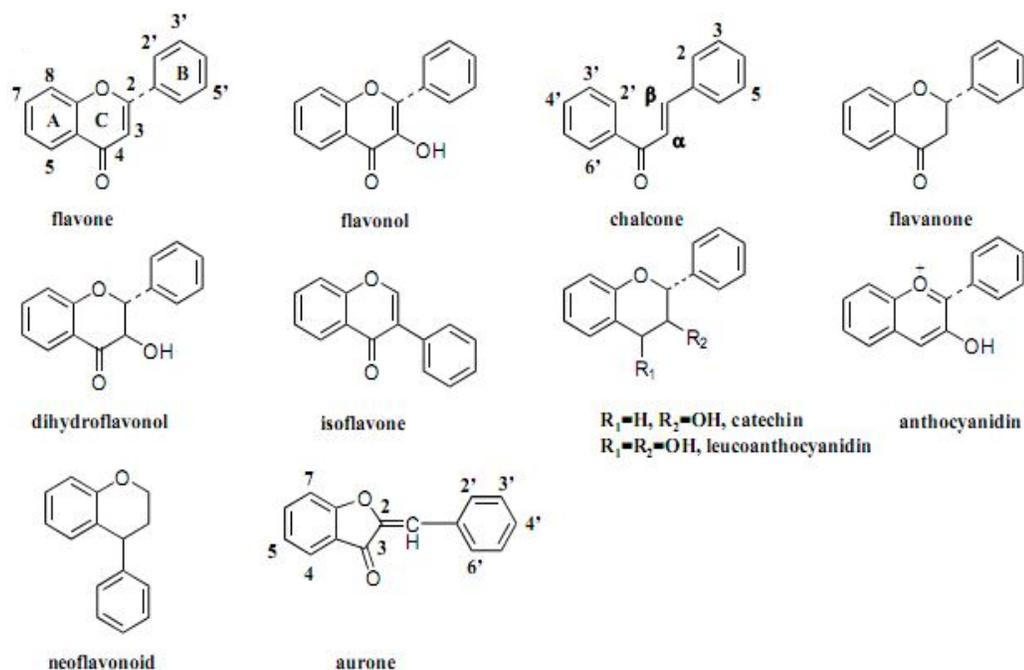


Fig 1: Estructuras químicas diversas de flavonoides.

1.4 Métodos Cromatográficos de separación de mezclas

1.4.1 Cromatografía de capa fina (TLC)

Por definición, la cromatografía es un método de separación de una muestra con diversos componentes; la cual está basada en la diferenciación de las migraciones de los componentes de la mezcla en el medio de separación o soporte cromatográfico. Como una característica esencial de las separaciones cromatográficas, los componentes de la mezcla son transportados por el soporte cromatográfico. En el caso de la cromatografía de capa fina este soporte consiste en una capa de sílica gel, adherida a un soporte físico que puede ser vidrio, aluminio o plástico (Markowsky, 2004).

Para obtener el perfil de separación de un extracto se utilizan métodos de TLC analíticos, en los cuales se emplea una dilución del extracto con el fin de obtener un perfil que nos muestre la complejidad de la mezcla y las alternativas a aplicar para su separación.

La separación de los componentes de una mezcla se logra por métodos de TLC preparativos, en los cuales tanto la superficie de la placa cromatográfica como la cantidad de muestra a aplicar son mayores. La cromatografía de capa fina preparativa (PTLC) es uno de los métodos de separación que requiere la menor inversión y el equipamiento más básico.

La selección de la mezcla de solventes que constituirán la fase móvil a utilizar en una separación por PTLC es uno de los puntos críticos en la planificación de una separación cromatográfica. Rutinariamente, este paso es desarrollado mediante la prueba de varias mezclas en cromatogramas analíticos. Ya que el tamaño de partícula de los adsorbentes es aproximadamente el mismo, es posible que la fase móvil más eficiente en la TLC analítica pueda ser usada exitosamente en una separación por PTLC (Hostettmann *et al.*, 1998).

Este método nos permite diferenciar los compuestos químicos, ya que mediante el estudio de cromatogramas analíticos y preparativos es posible separar una mezcla de compuestos originada de una matriz vegetal. La separación, unida a la valoración de la actividad antioxidante de las fracciones separadas, puede darnos claves sobre el/los compuestos responsables de la actividad biológica mostrada por el extracto vegetal.

1.5 Ensayos para determinar la actividad antioxidante "in Vitro"

1.5.1 Ensayo DPPH: Fundamento

La molécula de 1,1-difenil-2-picril hidrazil; DPPH, es un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre toda la molécula; por consiguiente la molécula no se dimeriza. La deslocalización de este electrón provee a la molécula de un color violeta intenso, caracterizado por una banda de absorción en etanol centrada aproximadamente a 520 nm.

Cuando una solución de DPPH se mezcla con una sustancia capaz de donar un átomo de hidrógeno, entonces la molécula pasa a su forma reducida, con la pérdida de su color violeta (aunque en la solución persiste un color amarillo residual debido al grupo picril aún presente). Representando al radical DPPH por, Z^{\bullet} y la molécula donante por AH, la reacción primaria es:



Donde ZH es la forma reducida de DPPH, y A^{\bullet} es el radical libre producido en este primer paso de reacción. El último radical que continúa las reacciones posteriores controla la estequiometría de la reacción, es decir, el número de moléculas de DPPH reducidas por una molécula del reductor (Molyneux, 2004).

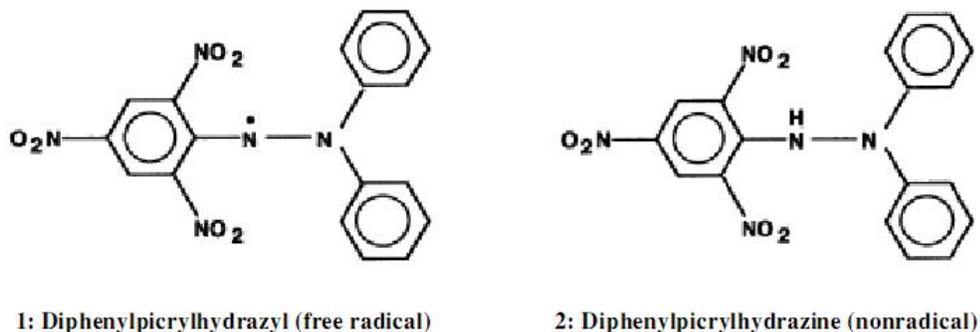


Fig 2: Estructura de un radical libre y de un radical estable

En resumen, el DPPH es un radical libre estable, que inicialmente posee un color violeta, un agente antioxidante será capaz de reducir a este radical libre (cediendo un átomo de hidrógeno), que toma así un color naranja pálido. Este método se utiliza en trabajos científicos relacionados a la búsqueda de extractos y compuestos antioxidantes, ya que la metodología desarrollada permite una buena aproximación a la capacidad de una sustancia de inhibir el mecanismo de generación de radicales libres.

Conclusiones

En el presente capítulo se presenta una visión general del ámbito de la presente tesis, el cual abarca desde la selección de especies vegetales hasta los métodos de separación cromatográfica y determinación de actividad antioxidante de los extractos obtenidos. Este fundamento permite comprender el alcance del trabajo desarrollado.

CAPÍTULO 2

SELECCIÓN DE ESPECIES VEGETALES

Introducción

Para la correcta selección de las especies vegetales, fue necesario tomar en cuenta sus características principales, la factibilidad para conseguirlas, y el uso que se les pueda dar en la elaboración de alimentos, ya que no queremos aportar sabores y aromas desagradables a los mismos.

2.1 Características de las especies

2.1.1 Romero



Fig 3: Planta de Romero

Familia: Labiadas

Nombre científico: *Rosmarinus officinalis*

Altura: 1.5m

Longevidad: Perenne

Hábitat y lugar de origen: Terrenos secos, rocosos. Se encuentra naturalizado en zonas templadas de todo el mundo.

Descripción: Arbusto denso y aromático de aspecto espigado que conserva todo el año las hojas y el color verde. Tallos leñosos y ramificados, hojas estrechas y agudas, con margen recurvado y envés blanquecino, en ángulo muy cerrado con el tallo. Las flores forman grupos y pueden ser blancas, lilas, azules e incluso rosadas, ligeramente moteadas, con cáliz bilabiado y dos medios estambres.

Componentes activos: Aceite esencial (cuanta mayor luz recibe la planta, mayor es la concentración de aceite), ácido rosmarínico, glucósidos flavónicos, principios amargos y alcaloides (rosmaricina).

2.1.2 Albahaca



Fig 4: Planta de Albahaca

Familia: Labiadas

Nombre científico: *Ocimum basilicum*

Altura: 50cm

Longevidad: anual

Hábitat: es originaria de la india y se le encuentra en el sur de europa y en climas templados.

Descripción: Hierba de hojas finamente dentadas, aunque hay variedades de jardín sin dentar, de color verde, lanceoladas y muy aromáticas. Flores agrupadas en espigas, blancas o rosadas.

Componentes activos: Esencia (cineol, metilcahvicol y linalol), estragol, eugenol y timol.

2.1.3 Hierba Luisa



Fig 5: Planta de Hierba Luisa

Familia: Verbenaceae

Nombre científico: *Lippia triphylla*

Altura: 2.5m

Hábitat: originaria de sudamérica

Descripción: Arbusto aromático caducifolio de la familia de las verbenáceas. Tallos erectos de consistencia leñosa por la parte superior, hojas lanceoladas de hasta 10cm, reunidas en ventículos de 3, pecioladas. Flores agrupadas en racimos, acampanadas, exteriormente de color violáceo, más blanquecinas por dentro.

Componentes activos: Furocumarinas, verbenona, falvonoides y aceite esencial rico en: citral, linalol, canfeno (antioxidante), cineol, terpineol, cariofileno y limoleno.

2.1.4 Laurel



Fig 6: Planta de Laurel

Familia: Lauráceas

Nombre científico: *Laurus nobilis*

Altura: Normalmente, 2 m. Alcanza hasta los 25, en climas cálidos.

Hábitat: Rocas y bosques de la región mediterránea. Cultivada en todo el mundo

Descripción: Pequeño árbol, muy ornamental. Hojas perennes, alternas, coriáceas, ahusadas, divididas claramente por un nervio central, son de color verde oscuro y brillante por el haz y más claro por el envés. Las flores son blancas o amarillentas y se agrupan en las axilas foliares (donde las hojas se unen al tallo). El fruto parece una aceituna pequeña y es de color negro. Al romper las hojas, despiden un fragante y característico aroma, muy agradable.

Componentes activos: Flavonoides, principios amargos, aceite esencial (cineol). Ácido palmítico, linoleico y oleico.

2.1.5 Hierba Buena



Fig 7: Planta de Hierba Buena

Familia: Labiadas

Nombre científico: *Mentha sativa* L.

Altura: no sobrepasan los 30cm.

Hábitat: Son especies arbustivas o herbáceas ampliamente distribuidas por la región mediterránea.

Descripción: Planta herbácea, rastrera, perenne, que no rebasa los 30 cm de altura, con estolones y ramas angulosas, ligeramente pubescentes o lampiñas, de color violáceo. Hojas opuestas, oblongas, cortamente pecioladas, de superficie rugosa y margen aserrado, de coloración verde intenso por el haz y algo más clara por el envés, nervios rojizos. Flores blancas, pequeñas y agrupadas en espigas terminales.

Componentes activos: El más importante y conocido es el mentol (alcohol) que ocupa el 80 % de la composición total. También contiene hidrocarburos aromáticos (mentona, felandreno, limoneno), taninos, principios amargos, subproductos del metabolismo secundario (piperitona, pulegeona), minerales, flavonoides, ácidos (caféico, ursólico).

Conclusiones

Conocer los componentes activos de cada especie elegida, afianzó nuestra búsqueda hacia su actividad antioxidante, basándonos en la presencia de compuestos como los flavonoides, los mismos que han sido estudiados y relacionados por científicos a nivel mundial como compuestos con actividad antioxidante.

CAPÍTULO 3

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES DE ORIGEN NATURAL

Introducción

Una vez recolectadas las especies vegetales elegidas, se obtuvieron los extractos y aceites esenciales de las mismas. Para la obtención de extractos, las hojas fueron secadas y pulverizadas, luego se trabajó con el método de Soxhlet para la extracción de los compuestos activos.

Para la obtención de los aceites esenciales, trabajamos con las hojas de las plantas en su estado fresco, trabajamos por el método de arrastre de vapor.

3.1 Obtención de extractos de aceites esenciales

Preparación de extractos: Se seleccionaron 200g de hojas y ramas frescas de cada especie, las cuales fueron secadas al ambiente durante 2 o 3 días. Una vez secas, las hojas fueron pulverizadas en una licuadora. Ahora podemos trabajar con los métodos que describiremos a continuación.

Preparación de aceites esenciales: Para obtener aceites esenciales se seleccionaron como mínimo 1kg de hojas frescas. La extracción se efectuó con el método que se describe en 3.2.2

3.2 Métodos empleados

3.2.1 Método de Soxhlet para obtención de extractos: Consiste en extraer los compuestos de la planta, utilizando un solvente, en este caso metanol, para obtener el extracto en su estado puro debemos eliminar el solvente anteriormente utilizado, en el rotavapor. Una vez obtenidos los extractos, estos se deben mantener en refrigeración, para conservar sus características químicas.

Materiales y Reactivos

- Aparato de Soxhlet
- 1 probeta de 250ml
- Cilindros de papel filtro de 8x10cm.
- Hojas secas y pulverizadas de cada especie
- Metanol comercial
- Rotavapor
- 5 frascos de vidrio color ámbar
- 5 pipetas paster y gomas para succión
- Estufa

Procedimiento

- En cada cilindro se pesaron aproximadamente de 30g de la muestra
- Colocamos dentro de los tubos de aparato de soxhlet
- Se midieron 250ml de metanol en una probeta , se colocaron dentro de los balones del aparato de soxhlet; y se encendió el equipo.
- El tiempo de extracción fue aproximadamente de unos 30 minutos.
- Posteriormente se eliminó el solvente en el rotavapor.
- Lugo se trasladaron los extractos a los frascos de vidrio color ámbar, previamente pesados.
- Como los extractos estaban muy densos, se diluyeron con un poco de metanol, para facilitar el traslado a los frascos.
- Se colocaron los frascos con los extractos en la estufa a 50 C por 12 horas aproximadamente, para evaporar el metanol por completo.
- Cuando los extractos estuvieron libres de solvente se sellaron los frascos con papel aluminio y se refrigeraron a 4 C.



Fig 8: Rotavapor

3.2.2 Método para obtención de Aceites esenciales: Este método consiste en separar los aceites esenciales de las hojas, por arrastre de vapor. Una vez obtenidos los aceites, deben ser almacenados en frascos de color ámbar en un lugar oscuro, para evitar reacciones químicas de degradación.

Materiales y Reactivos

- Aparato para obtención de aceites
- 5 frascos de vidrio color ámbar
- 1kg de hojas frescas de la especie elegida
- Una cocineta

Procedimiento

- En la olla de acero inoxidable, se coloca agua, hasta donde indica la señal.
- Se colocan las hojas frescas de la especie vegetal a extraer.
- Realizamos todas las conexiones necesarias y encendemos la cocineta.
- Cuando la temperatura dentro de la olla alcanzó alrededor de 80 C, la primera gota cae en la bureta que esta conectada con la olla.
- El tiempo de extracción dura 40 minutos.
- Transcurrido este tiempo se coloca en un frasco de vidrio el aceite esencial.
- Se sellan bien los frascos y se almacenan en un lugar oscuro.

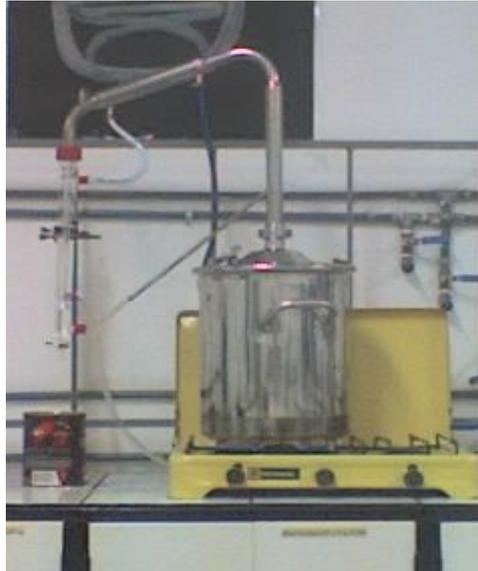


Fig 9: Aparato para obtención de aceites esenciales por arrastre de vapor.

3.2.3 Extracción líquido – líquido de un aceite esencial

En algunas especies, cuyo aceite esencial es muy soluble en agua y no se logra una buena separación, debemos aplicar este método, para separar el aceite del agua. En nuestro caso la Albahaca, es la especie con la que tuvimos que aplicar este método.

Materiales y Reactivos

- Matraces de 250ml y 500ml
- 1 Balón de separación
- 1 balón de aforo de 500ml
- 1 embudo y soporte
- Papel filtro
- 3 puntas de espátula de NaCl
- 200ml de Diclorometano
- 3 puntas de espátula de Sulfato de Magnesio (Mg_2SO_4)
- Rotavapor
- Frasco de vidrio color ámbar

Procedimiento

- En un matraz se colocan 200ml de muestra (agua +aceite obtenida del primer método)
- Se adicionan 3 puntas de espátula de NaCl
- Enseguida se coloca la mezcla en un balón de separación
- Se adicionan 200ml de diclorometano
- Se homogeniza bien y se elimina el aire.
- Se observa cuando el líquido se divide en dos fases, se separa la parte superior y se coloca en el matraz de 500ml
- A este líquido se adiciona el desecante (Mg_2SO_4)
- Se deja reposar durante 4 horas
- Transcurrido este tiempo, se filtra la mezcla en el balón de fondo redondo.
- Se evapora el diclorometano en el rotavapor y se extrae el aceite esencial.
- Se mide y se coloca en aceite en un frasco de vidrio y se almacena en un lugar oscuro.

3.3 Rendimiento

3.3.1 Rendimiento de los Extractos: Para obtener el rendimiento de cada uno de los extractos , utilizaremos la siguiente fórmula:

$$\% R = \frac{P2 - P1}{Pm} \times 100$$

Especie	Pm (g)	P1 (g)	P2 (g)	%Rendimiento
Romero	30g	20.6580	22.425	5.89
Hierba Buena	25g	20.3374	22.878	10.164
Hierba luisa	30g	20.6238	23.812	12.75
Albahaca	30g	20.999	22.034	4.14
Laurel	30g	9.5028	13.092	14.35

Tabla 1: Rendimiento de los extractos Vegetales

3.3.2 Rendimiento de los aceites esenciales

Especie	Peso de hojas frescas (kg)	Volumen de aceite (ml)	% Rendimiento
Romero	3.63	24	6.61
Hierba Luisa	1.95	6	3.08
Hierba Buena	1.53	2	1.30
Laurel	2.86	5	1.75
Albahaca	1.15	1	0.86

Tabla 2: Rendimiento de los Aceites Esenciales

Conclusiones

Los métodos que utilizamos para obtención de extractos y aceites esenciales, son los más adecuados, nos permiten obtener un rendimiento aceptable. En el caso de los aceites esenciales, la Albahaca, es una especie cuyo aceite esencial es muy soluble en agua, por lo tanto fue necesario someterlo a un método de extracción líquido - líquido, el cuál nos permite separar el aceite del agua, con mayor facilidad que el método de arrastre de vapor.

CAPÍTULO 4

CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR ENSAYO DPPH

Introducción

Como se describe en el capítulo 1, el DPPH es un método que permite cuantificar la actividad antioxidante, para lo cual se prepararon soluciones de diferentes concentraciones con los extractos, aceites y fracciones en estudio, las mismas que después de reaccionar con el DPPH, fueron leídas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517nm, los datos de absorbancia obtenidos de este estudio permitieron el cálculo de los porcentajes de decoloración de cada muestra, lo que permitió determinar los extractos, aceites esenciales y fracciones con mejores características antioxidantes.

4.1 Descripción

El ensayo que evaluó la capacidad de los aceites esenciales, extractos y fracciones, para capturar el radical libre estable DPPH fue desarrollado para cuantificar el efecto antioxidante de las sustancias en estudio.

Para el efecto se preparó un gradiente de concentración de soluciones (250, 100, 50 y 25 $\mu\text{g/ml}$), a partir de una solución madre del extracto o aceite esencial (1000 $\mu\text{g/ml}$).

Para el desarrollo de la reacción de captura de radicales libres, 1 mL de cada solución preparada en gradiente de concentración fue mezclado con 2 mL del reactivo DPPH en solución metanólica (20 mg/L). La mezcla de reacción fue mantenida en oscuridad por 30 minutos para permitir el desarrollo de la reacción. Al mismo tiempo fue incubado un tubo con DPPH (control de reacción) y como blanco se utilizó metanol.

Transcurrido este período se registró la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro Perkin Elmer doble haz ($\lambda = 517 \text{ nm}$). El porcentaje de decoloración fue estimado estableciendo una comparación con el control de reacción, y expresando el resultado como porcentaje de decoloración

(Parejo et al. 2003).

4.2 Resultados

Extracto	Concentración	Abs	% D	Aceite esencial	Abs	%D
Romero	100	0.002	99.66	Romero	0.987	0.00
Albahaca	150	0.010	98.30	Albahaca	0.019	96.77
Hierba Luisa	50	0.002	99.66	Hierba Luisa	0.504	14.29
Hierba Buena	150	0.001	99.83	Hierba Buena	0.562	55.44
Laurel	25	0.027	99.54	Laurel	0.068	88.44

4.2.1 Extractos vegetales y aceites esenciales

$$\% D = 1 - \frac{\text{Abs Muestra}}{\text{Abs Control}} \times 100$$

Tabla 3: Porcentaje de decoloración del DPPH para los extractos vegetales y aceites esenciales en estudio.

En donde: %D= porcentaje de decoloración
 Abs muestra = Absorbancia de la muestra
 Abs control = Absorbancia del control (BHT)

La actividad antioxidante de los extractos y aceites esenciales estudiados se comparó con el antioxidante de referencia BHT (butil hidroxil tolueno, Abs = 0.588, $\lambda = 517 \text{ nm}$)

4.2.2 Estudio de actividad antioxidante en las fracciones de extractos vegetales

Las fracciones obtenidas a partir de la separación cromatográfica de los extractos vegetales en estudio (ver Capítulo 4) fueron estudiadas para identificar aquellas que conservaban la actividad antioxidante del extracto.

Esta metodología es el fundamento del aislamiento bioguiado de compuestos antioxidantes. En la presente investigación se realizó este trabajo con el fin de aproximarnos a las fracciones bioactivas de los extractos vegetales de interés.

A continuación se presentan los resultados obtenidos, expresados como porcentaje de decoloración del radical libre DPPH. La numeración de las fracciones corresponde al recorrido cromatográfico. Las primeras fracciones migraron con el frente del solvente, siendo éstas las menos polares. Las fracciones más polares son las más cercanas al origen o punto de siembra.

Especie	Fracción	% D
Romero	1	0.00
	2	83.00
	3	84.00
	4	76.36
	5	92.00
	6	92.18
	7	93.18
	8	93.24
	9	88.44
Albahaca	1	89.12
	2	6.63
	3	2.38
	4	87.07
	5	94.39
	6	93.37
	7	87.76
	8	87.24
Hierba Luisa	1	81.80
	2	80.10
	3	82.48
	4	81.20
	5	72.96
	6	91.33
	7	77.72
	8	82.31
Hierba Buena	1	74.32
	2	82.14
	3	79.08
	4	82.14
	5	83.50
	6	94.56
	7	94.14
Laurel	1	64.46
	2	78.91
	3	79.42
	4	80.78
	5	82.48
	6	95.19

Tabla 4: Porcentaje de decoloración de los extractos puros y fracciones.

Conclusiones

El estudio con la técnica del DPPH, nos permitió cuantificar la actividad antioxidante de los extractos vegetales y aceites esenciales en estudio, la misma que esta indicada por el porcentaje de decoloración, siendo muy baja la variación en el caso de los extractos puros, lo que nos indica que todas la especies tienen un buen potencial antioxidante, en cambio en el caso de los aceites esenciales el mejor resultado dio la albahaca. En cuanto a las fracciones las más activas resultaron ser la fracción 5 de Albahaca y la fracción 6 de laurel. Tomando estos datos como referencia se trabajó en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO 5

ESTUDIO DEL PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

Introducción

Para establecer las condiciones ideales de una separación preparativa, se realizó un diseño de mezclas de solventes, con el cual se estableció la fase móvil que permitía una mejor separación de los componentes del extracto a fraccionar. Una vez determinada la mezcla ideal de solventes se hicieron placas de cromatografía preparativa para la evaluación de la actividad antioxidante de cada fracción encontrada dentro de un mismo extracto.

5.1 Selección de Fase Móvil para Cromatografía Preparativa.

5.1.1 Diseños de Mezclas

Los Diseños de Mezclas permiten la resolución de problemas en donde hay Mezclas Físicas de componentes, es decir, en donde no existe total independencia entre las variables.

En un experimento con mezclas, las proporciones x_i de cada uno de los q componentes deben cumplir las siguientes restricciones:

$$x_i \geq 0 (i=1,2,3\dots q), \sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1$$

En donde: q = número efectivo de variables

x_i = Componentes de la mezcla física

Estas restricciones definen la geometría de la región experimental como un simplex de dimensión $(q-1)$. Por ejemplo, para $q=3$ componentes el espacio simplex es un triángulo equilátero como se puede observar en la figura 10, en donde las proporciones son denotadas por x_1, x_2 y x_3 .

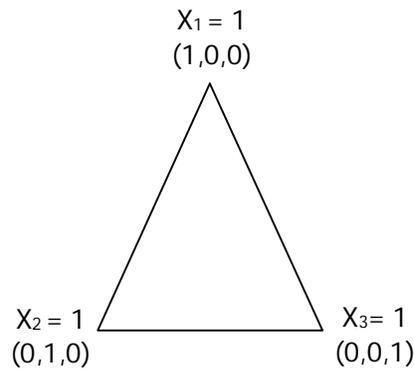


Fig 10. Región simplex para tres componentes x_1, x_2 y x_3 .

El objetivo de un modelo de mezclas es encontrar un modelo que permita pronosticar el valor de la variable dependiente en función de sus componentes; esto se puede realizar ajustando los modelos de experimentos con mezclas propuestos por Scheffé en 1958. Los modelos son:

Modelo lineal

$$y_u = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i$$

Modelo Cuadrático

$$y_u = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum_{i < j}^q \beta_{ij} x_i x_j$$

Modelo Cúbico Especial:

$$y_u = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum_{i < j}^q \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i < j < k}^q \beta_{ijk} x_i x_j x_k$$

En donde:

y_u = Respuesta

β_i = Efecto del componente puro

β_{ij} = Efecto de la interacción entre los componentes i y j

β_{ijk} = Efecto de la interacción triple entre los componentes i, j y k

Los diseños experimentales asociados a estos modelos, pueden ser de tres tipos: Látice Simplex, Centroide Simplex y Axiales.

Diseño Látice Simplex: Los puntos en un diseño Látice Simplex están distribuidos uniformemente sobre toda la región simplex. Un látice Simplex esta asociado a un modelo polinomial de grado m , el cual se denota como un diseño látice simplex (q, m) . Las proporciones para cada un de los q componentes son los $(m+1)$ valores igualmente espaciados de 0 a 1, definidos como:

$$x_i = \frac{1, 2, \dots, q}{m+1}$$

Todas las posibles combinaciones de las proporciones que sumen la unidad, definen las mezclas o los puntos utilizados en el diseño, como se observa en la figura 11.

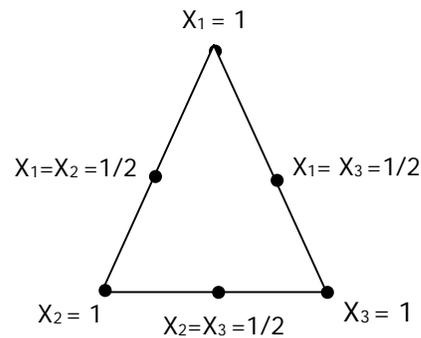


Fig 11. Diseño Látice Simplex

Diseño Centroide Simplex: Este diseño a diferencia del Látice Simplex, incluye observaciones de mezclas en donde los componentes aparecen en iguales proporción. El diseño centroide Simplex consta de $2^q - 1$ puntos. Estos puntos corresponden a q permutaciones de $(1,0,\dots,0)$ o mezclas de los q componentes puros, las $(q/2)$ permutaciones de $(1/2,1/2,0,\dots,0)$ o todas las mezclas binarias, las $(q/3)$ permutaciones de $(1/3,1/3,1/3,0,\dots,0)$ a todas las mezclas terciarias y así sucesivamente hasta el punto centroide general $(1/q,1/q,\dots,1/q)$. en la figura 12 se observa el Diseño Centroide Simplex para tres componentes. (Gozálvez & García-Díaz, 2006).

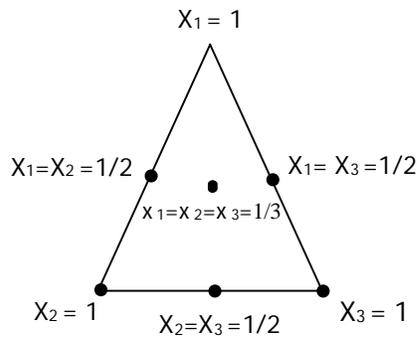


Fig 12. Diseño Centroide Simplex

5.1.2 Características de los solventes

Para este estudio se buscó la mezcla óptima para separación de componentes en los extractos en estudio, para lo cual se eligió trabajar con tres solventes, cuyas principales características físico-químicas se presentan a continuación:

Solvente	Fórmula	Peso fórmula	Densidad	Punto fusión	Punto ebullición
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂	84.93	1.3255	-96.7	40.5
Acetato de Etilo	CH ₃ CO-OC ₂ H ₅	88.11	0.9006	-84	77.1
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	46.07	0.7894	-114	78.3

Tabla 5: Características físico químicas de los solventes orgánicos empleados en la preparación de fases móviles (Dean, 1989))

5.2 Calculos y Resultados

La resolución cromatográfica se calculó según la siguiente ecuación:

$$R_s = \frac{2\Delta z}{b_1 + b_2}$$

En donde : R_s = resolución

Δz = distancia del punto medio (mm)

b_1 y b_2 = ancho de los puntos vecinos (mm)

(Turina, 1986)

Para elegir el mejor sistema de solventes, se prepararon placas de cromatografía analítica, y se trabajó siguiendo el modelo Centroide Simplex, ya que este da más opciones de mezclas que Látice Simplex y es suficiente para cumplir con nuestro objetivo.

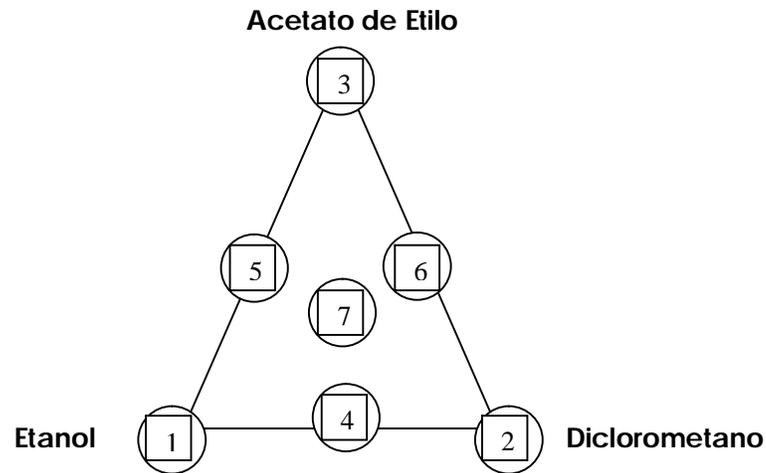


Fig 11: Representación de los experimentos desarrollados para probar las diferentes mezclas de solventes. 1, 2 y 3: componentes puros; 4, 5 y 6: mezclas binarias y 7: mezcla terciaria (Brereton, 2003)

A continuación se muestra la tabla de resultados de dichos experimentos:

Mezcla	Etanol (X1)	Diclorometano (X2)	Acetato de Etilo (X3)	N manchas	Rs
1	1	0	0	2	4.96
2	0	1	0	4	5.54
3	0	0	1	2	10.12
4	0.5	0.5	0	3	1.84
5	0	0.5	0.5	5	3.04
6	0.5	0	0.5	3	2.59
7	0.33	0.33	0.33	3	2.12

Tabla 8: Resultados de Resolución del modelo Centroide Simplex.

Estos datos fueron analizados en un software, que nos permitió obtener las tres ecuaciones requeridas; lineal, cuadrática y especial cúbica, con sus respectivos gráficos, que se muestran a continuación:

1. Lineal: $y = 2.565x_1 + 3.209x_2 + 7.173x_3$

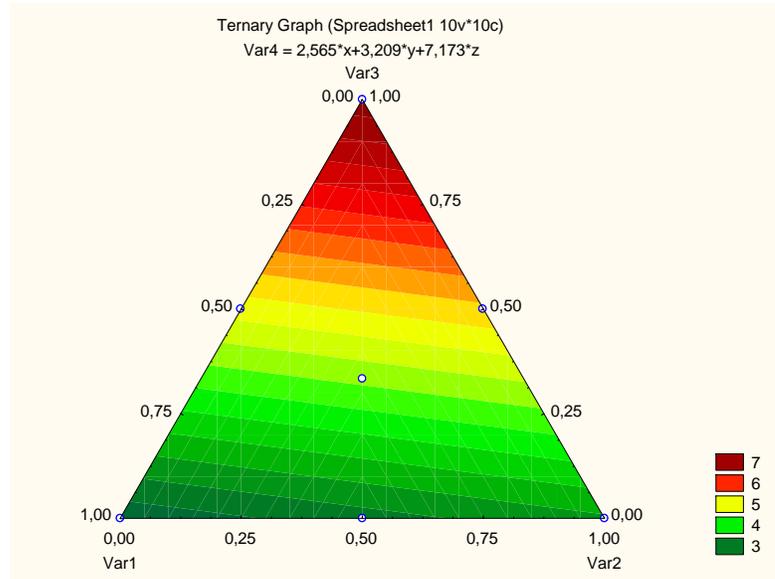


Fig12. Gráfica correspondiente a la ecuación lineal

2. Cuadrática: $y = 4.8856x_1 + 5.4656x_2 + 10.0456x_3 - 12.1521x_1x_2 - 18.3121x_1x_3 - 17.6721x_2x_3$

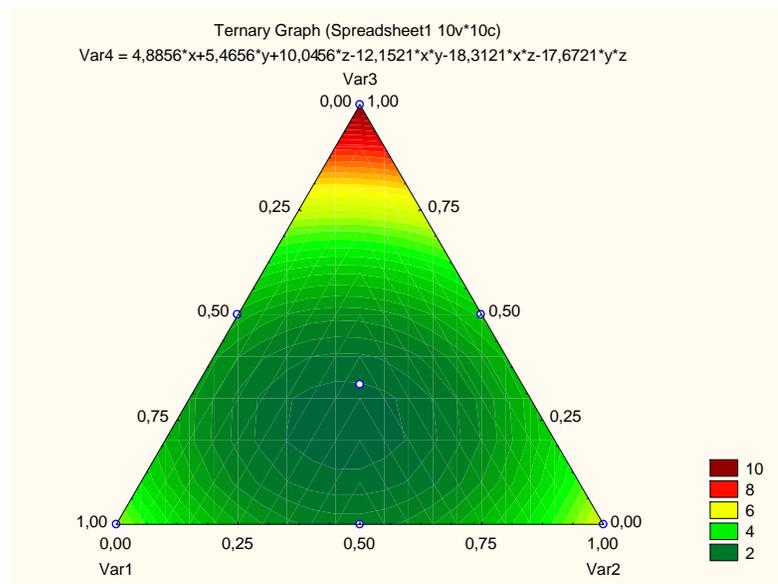


Fig13. Gráfica correspondiente a la ecuación cuadrática

3. Especial Cúbica: $y = 4.96x_1 + 5.54x_2 + 10.12x_3 - 13.64x_1x_2 - 19.8x_1x_3 - 19.16x_2x_3 + 29.46x_1x_2x_3$

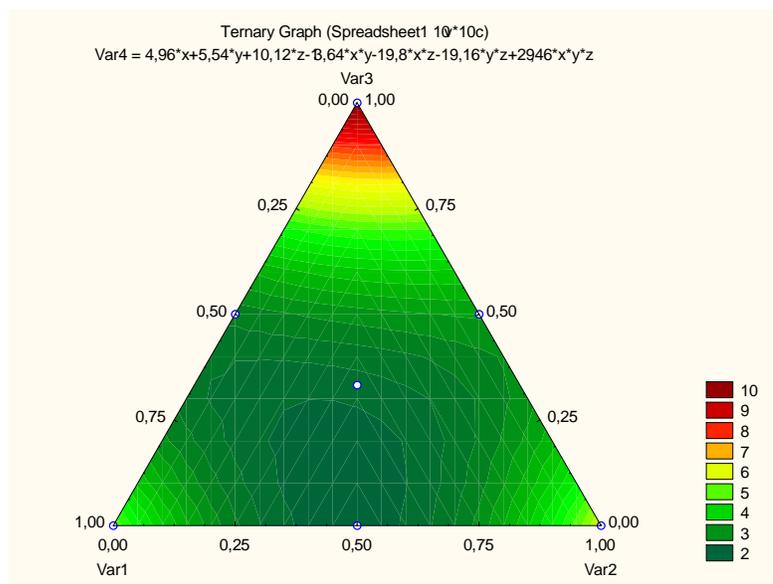


Fig14. Gráfica correspondiente a la ecuación especial cúbica

Las ecuaciones cuadrática y especial cúbica dieron valores negativos lo que indica que al combinar los solventes en porcentajes de 50-50 se produce un antagonismo, es decir el efecto contrario al que queremos obtener para un mejor resolución de las placas cromatográficas.

Como se puede observar en las tres gráficas la zona óptima se encuentra desde un 80% de Acetato de Etilo y 20% de Diclorometano, siendo esta la mezcla de solventes catalogada como ideal.

Posteriormente se prepararon placas de cromatografía analítica con dicha mezcla, y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Acetato de Etilo	Diclorometano	N manchas	Rs
0.8	0.2	7	8.36

Tabla 9: Resultados de resolución y revelado de manchas de la mezcla ideal.

Por lo tanto este es mejor sistema de solventes, y el que se utilizó más adelante para la preparación de placas de Cromatografía Preparativa.



Fig 12: Cromatografía TLC Analítica

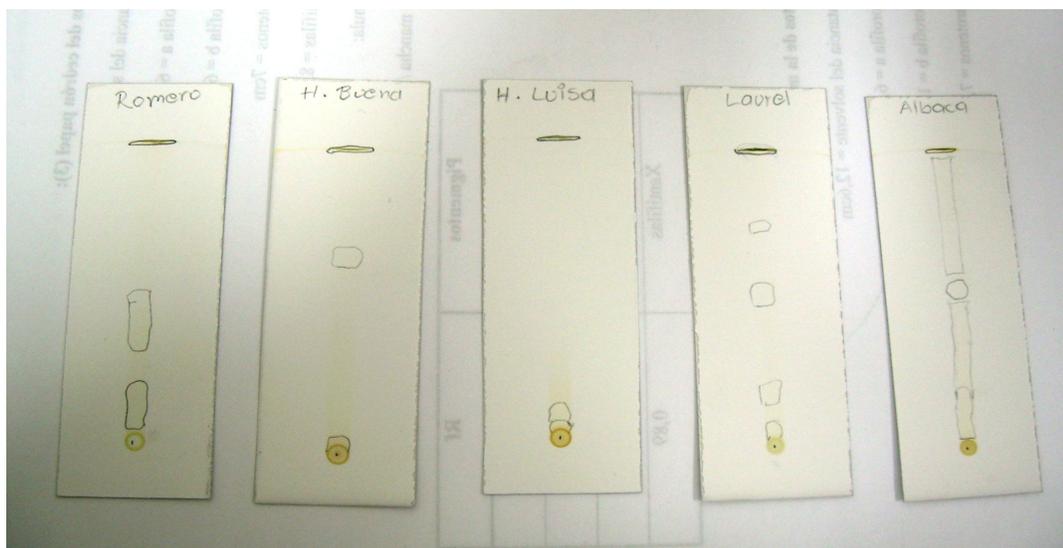


Fig13: Optimización de fases móviles. Resultado correspondiente a la mezcla más eficiente en la separación de los componentes del extracto.

5.3 Separación de los extractos vegetales

Con el fin de desarrollar las cromatografías preparativas para separar los componentes de los extractos en estudio, se prepararon placas cromatográficas, y se aplicaron los extractos vegetales. El desarrollo cromatográfico y separación de componentes de la mezcla se realizó según el protocolo que se describe a continuación:

5.3 Descripción

- Se prepararon placas de sílica gel de 10 x 3cm, se activaron en la estufa a 110 C x mínimo 2 horas.
- Se pesaron aproximadamente 80mg de extracto y se preparó una dilución con 500µl de metanol
- Se sembró la muestra con una pipeta paster y algodón.
- Se realizó el corrido de la placa, para lo cuál se utilizó la mezcla ideal de solventes.
- Con la ayuda de una espátula se raspó cada mancha y se colocó el polvo en un erlenmeyer de 125ml y se adicionaron 25ml de Acetato de Etilo.
- Se sumergió la mezcla en el aparato de ultrasonido x 15minutos, para extraer toda la fracción del gel de sílica.
- Se filtró cada fracción y se colocaron en balones de aforo de 50ml, previamente etiquetados.
- Se evaporó el solvente de cada fracción obtenida, en el rotavapor.



Fig14: Placas de Cromatografía Preparativa



Fig. 15 Extracción de fracciones

Del trabajo de separación cromatográfica se obtuvieron diversas fracciones, las cuales fueron caracterizadas en función de sus parámetros espectroscópicos. Para este efecto se realizó el barrido espectral en UV-visible (rango λ : 200 – 400 nm).

A continuación se reportan los resultados correspondientes a las fracciones obtenidas en cada extracto, sus máximos en UV y las señales más características registradas en sus espectros infrarrojo IR, para lo cuál se trabajó únicamente con los extractos puros y con las dos fracciones que mejor % de decoloración nos dieron con el estudio del DPPH (ver capítulo 4). Las fracciones señaladas como 1 son aquellas que migran con el frente de solvente (menos polares) y las señaladas como 6, 7, 8 son las que se quedan en el punto de siembra (más polares).

Extracto	Fracción	Máximo UV λ_{max}	Señales características IR del extracto IR ($\nu_{max,cm^{-1}}$)
Romero			3400(OH),3050,2950(-CH ₃ ,sh),2910,2880(-CH ₃ ,sh), 2850,2000,1690(C=O),1620,1450,1400,1350(sh),1250(sh), 1150(sh),1020(sh),920(sh),850,790,720(sh),690(sh),600.
	1	228	
	2	227	
	3	226	
	4	228	
	5	228	
	6	225	
	7	225	
	8	227-238	
	9	227	
Laurel			3400(OH),2990,2960,2910,2880(-CH ₃),2860(-CH ₃), 1780,1690(C=O,sh),1610(C=O),1480,1400,1250,1200,110 0,1050,920,800,720,550.
	1	225	
	2	228	
	3	228	
	4	228	
	5	225	
	6	226	3400(OH),2990,2960,2910,2880(-CH ₃),2860(-CH ₃), 1780,1480,1400,1250,1200,1100,1050,920,800,720,550.
Hierba Luisa			3400(OH),3000(sh),2910,2850(-CH ₃),2840(sh), 2390,1620(C=O),1590(sh),1520(sh),1400,1200,1050(sh), 900,800,600.
	1	243-227	
	2	245-225	
	3	247-228	
	4	247-228	
	5	245-226	
	6	247-227	
	7	247-227	
	8	245-227	
Hierba Buena			3350(OH),2910,2890,2860(-CH ₃),2000,1610(C=O), 1550,1490,1390,1310,1280(sh),1200,1150,980,900,800(sh) ,750,600.
	1	228	
	2	228	
	3	245	
	4	218	
	5	245	
	6	245-215	
	7	215	
Albahaca			3400(OH),2970(-CH ₃),2920,2890,2860(-CH ₃) ,1690(C=O),1665(C=O)1480,1400,1260,1020, 930(sh),800,720,700.
	1	226	
	2	245	
	3	245-227	
	4	244-225	
	5	225-244	3400(OH),2970(-CH ₃),2920,2890,2860(-CH ₃), 1480,1400,1260,1020,930(sh),800,720,700
	6	225-245	
	7	244-228	

Tabla 10: Máximos en UV y señales características IR de los extractos y fracciones en estudio (Coates 2000)

Los máximos de absorción, medidos en espectroscopia UV-visible, se encuentran en el rango de 218 a 247 nm. Harborne (1998), reporta las características espectrales de los grupos principales de flavonoides. Los isoflavonoides tienen máximos de absorción de 255 – 265 nm. Nuestros resultados sugieren que los componentes mayoritarios de los extractos en estudio pertenecen a esta clase de flavonoides.

El análisis de las señales características de los espectros IR permite identificar grupos funcionales de las moléculas. Mayoritariamente encontramos grupos OH, metilo y metileno. Las señales conocidas como “huellas digitales” de anillos bencénicos también se encuentran presentes, sugiriendo estructuras con porciones de anillos aromáticos. Esto concuerda con las características de las estructuras básicas de flavonoides.

Conclusiones:

El trabajo de optimización de condiciones para llevar a cabo una separación cromatográfica permite establecer la fase móvil óptima que permitirá la separación de los componentes del extracto en estudio.

La caracterización de las fracciones por métodos espectroscópicos nos permite aproximarnos a la naturaleza química de los componentes de los extractos bioactivos. No obstante, el hecho de trabajar con métodos de separación primaria limita la información que se puede obtener para aproximarnos a la estructura química de los compuestos bioactivos.

CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo fue cuantificar la actividad antioxidante en extractos y aceites esenciales de 5 especies vegetales, que fueron seleccionadas tanto por los estudios previos que determinaban la presencia de flavonoides (compuestos relacionados con la actividad antioxidante) como por la factibilidad para conseguirlas en nuestro medio. Los métodos utilizados fueron adaptados a las condiciones experimentales, para lo cual se optimizó el procedimiento de obtención de los extractos y aceites esenciales en su mayor rendimiento.

El trabajo desarrollado para optimizar la separación de los extractos vegetales por métodos cromatográficos requirió gran dedicación en tiempo, no solo en trabajo de laboratorio sino en revisión de literatura. De esta actividad se logró desarrollar separaciones preparativas, las cuales permitieron fraccionar a los extractos y determinar la actividad antioxidante de las fracciones obtenidas. Además los estudios espectroscópicos realizados nos aproximan a la naturaleza química de los componentes de la mezcla.

La actividad antioxidante presenta variaciones en los extractos y aceites esenciales de las mismas especies, en el caso de los extractos el porcentaje de actividad antioxidante es elevado en los 5 extractos, no así en los aceites esenciales, en los cuales solo encontramos 2 especies que tienen un buen porcentaje de actividad antioxidante (Romero y Laurel).

Para la conservación de alimentos, la bioactividad determinada es muy promisoría, ya que en estudios futuros se podrán probar los extractos y los aceites que dieron mejores resultados. En dependencia del tipo de alimento y del proceso tecnológico que se deba seguir para su obtención, se decidirá el uso de aceites o extractos, tratando de que se adapte de la mejor manera a las características físico-químicas del alimento y sin alterar negativamente las características organolépticas del mismo.

Estos extractos y aceites pueden llegar a remplazar el uso de los antioxidantes de origen químico, cuyo uso es polémico, sobre todo en Europa y USA, por lo tanto este trabajo dará una pauta para que futuras investigaciones cumplan con este objetivo.

BIBLIOGRAFÍA

BRERETON, R. (2003). Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. John Wiley and Sons, Ltd., pp. 84 – 85

COATES, J. (2000). Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach, en: Encyclopedia of Analytical Chemistry. R.A. Meyers. Ed. Editorial John Wiley & Sons, pag. 7-15.

DEAN, J. (1989). Lange Manual de Química. Tomo III. 3ra Edición. Mc Graw Hill Books., pp.

GOZÁLVEZ, J., & García-Díaz, J. (2006). Mixture Design Experiments Applied to the Formulation of Colorant Solutions. *Journal of Chemical Education*, 647 - 650.

LABCENCIA con noticias técnicas del laboratorio (2008) en: Técnicas Farmacéuticas, pag12.

MARKOWSKY, W. (2004). Efficiency of a Thin Layer Chromatography Plate, en : Encyclopedia of Chromatography. Jack Cazes. Ed. Editorial Marcel Dekker, pag. 79

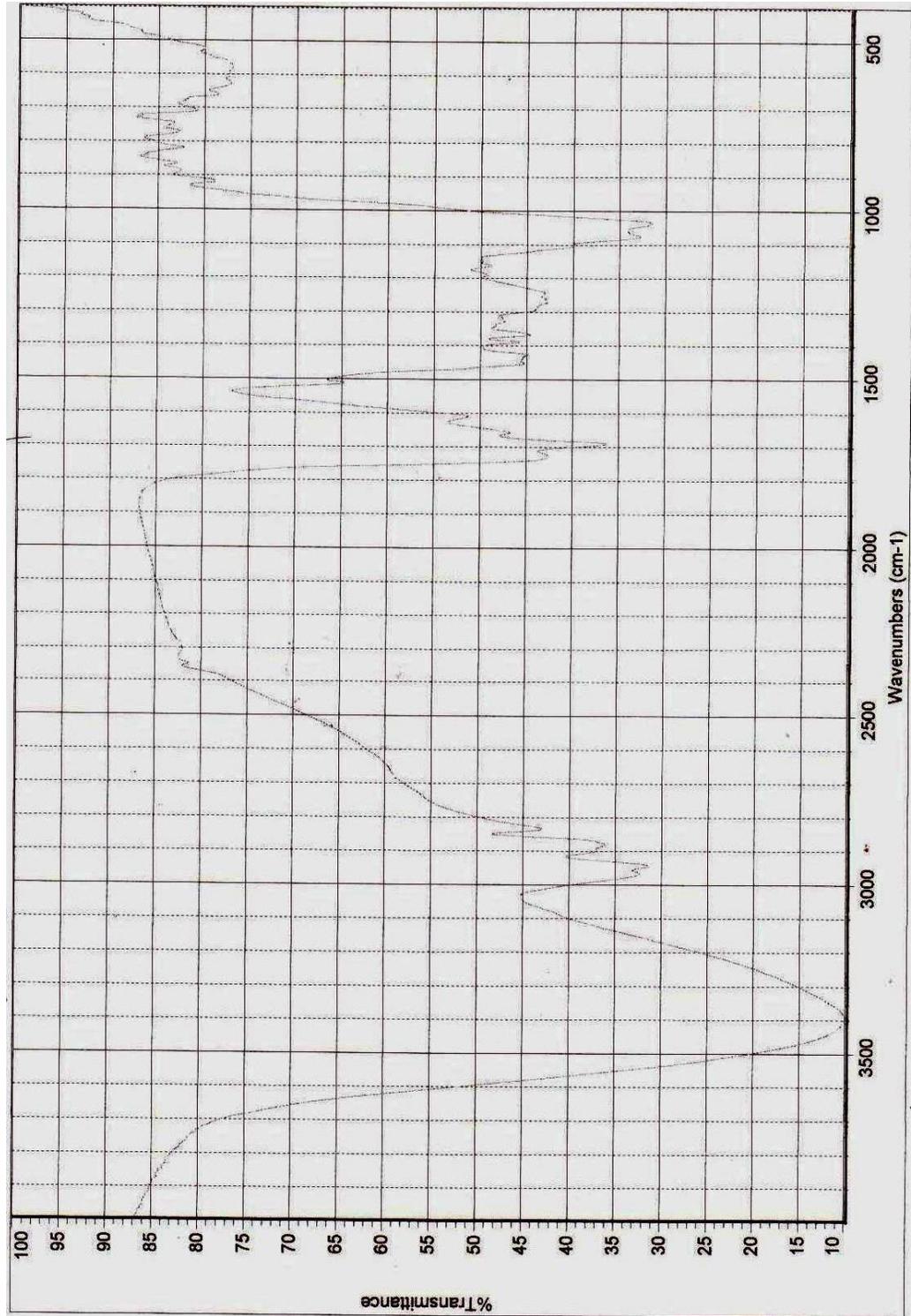
HOSTETTMANN, K., Marson, A., Hostettmann. M. (1998). Preparative Chromatography Techniques. Applications in Natural Products isolation. Editorial Springer, pag. 15 -17

KÄHNKÖNEN, M., Hopia, A., Vuorela, H., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T., Heinonen, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food. Chem.* 47, pp. 3954 – 3962, (1999)

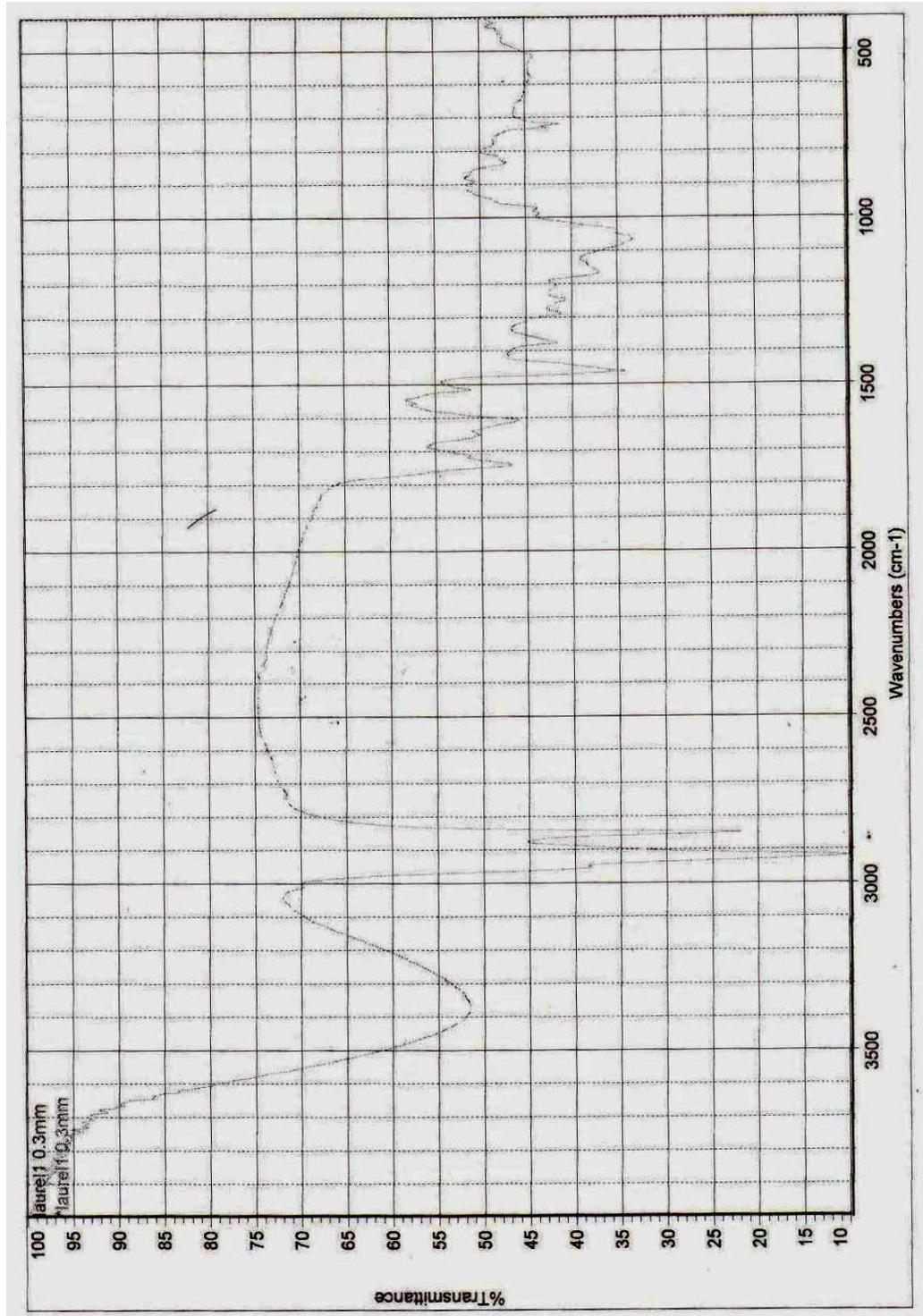
NIJVELDT, R., Van Nood, E., Van Hoorn, D., Boelens, P., Van Norren, K., Van Leewen, P. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, pp. 418 – 425. (2001)

MOLYNEUX, P. (2004). The use of the stable free radical diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211 -219

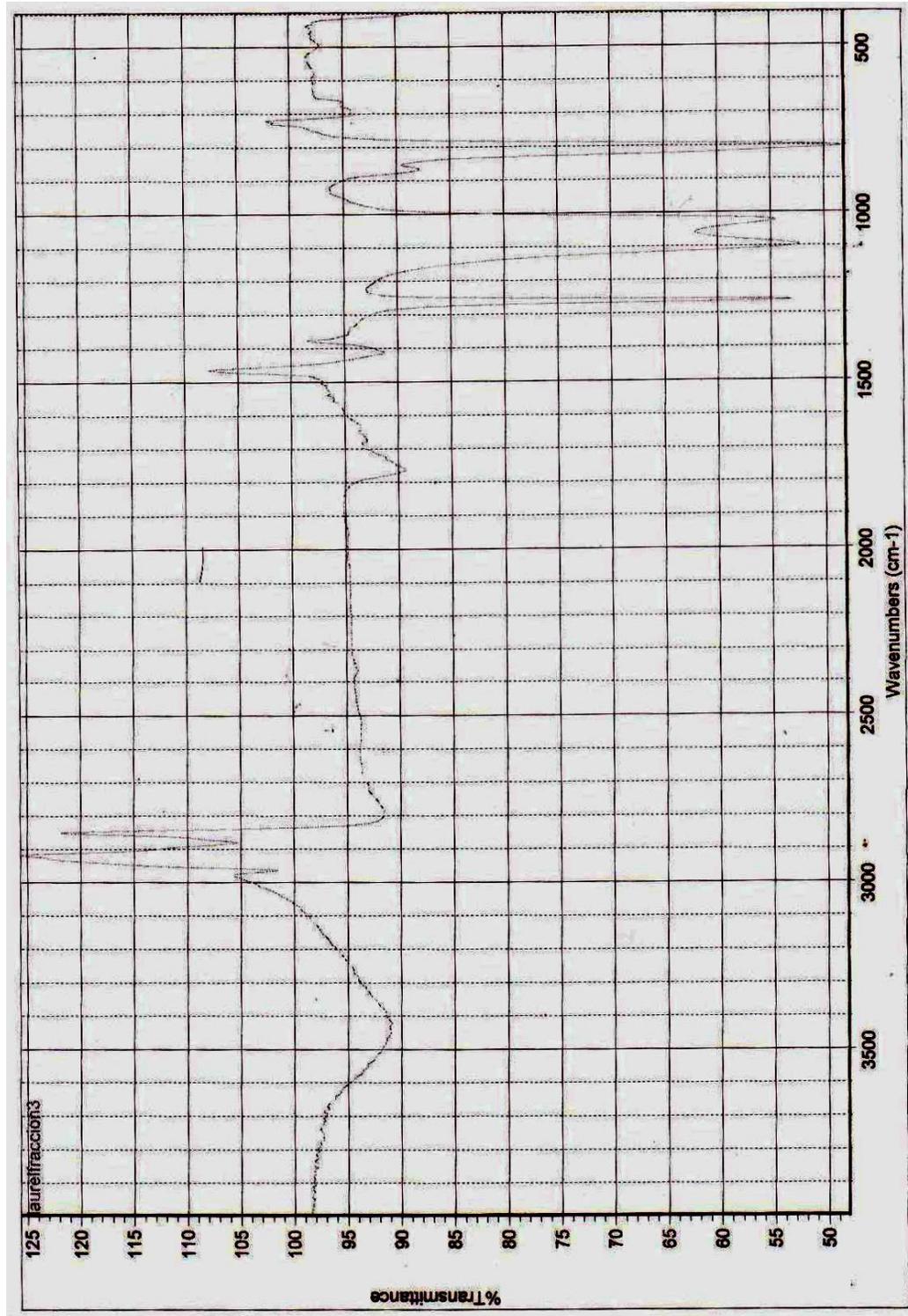
TURINA, S. (1986). Optimization in Chromatographic Analysis; en: *Planar Chromatography*. Volume 1. Kaiser, R., Editor. Dr. Alfred Huethig Verlag GmbH Heidelberg, Alemania., pp. 18 - 19



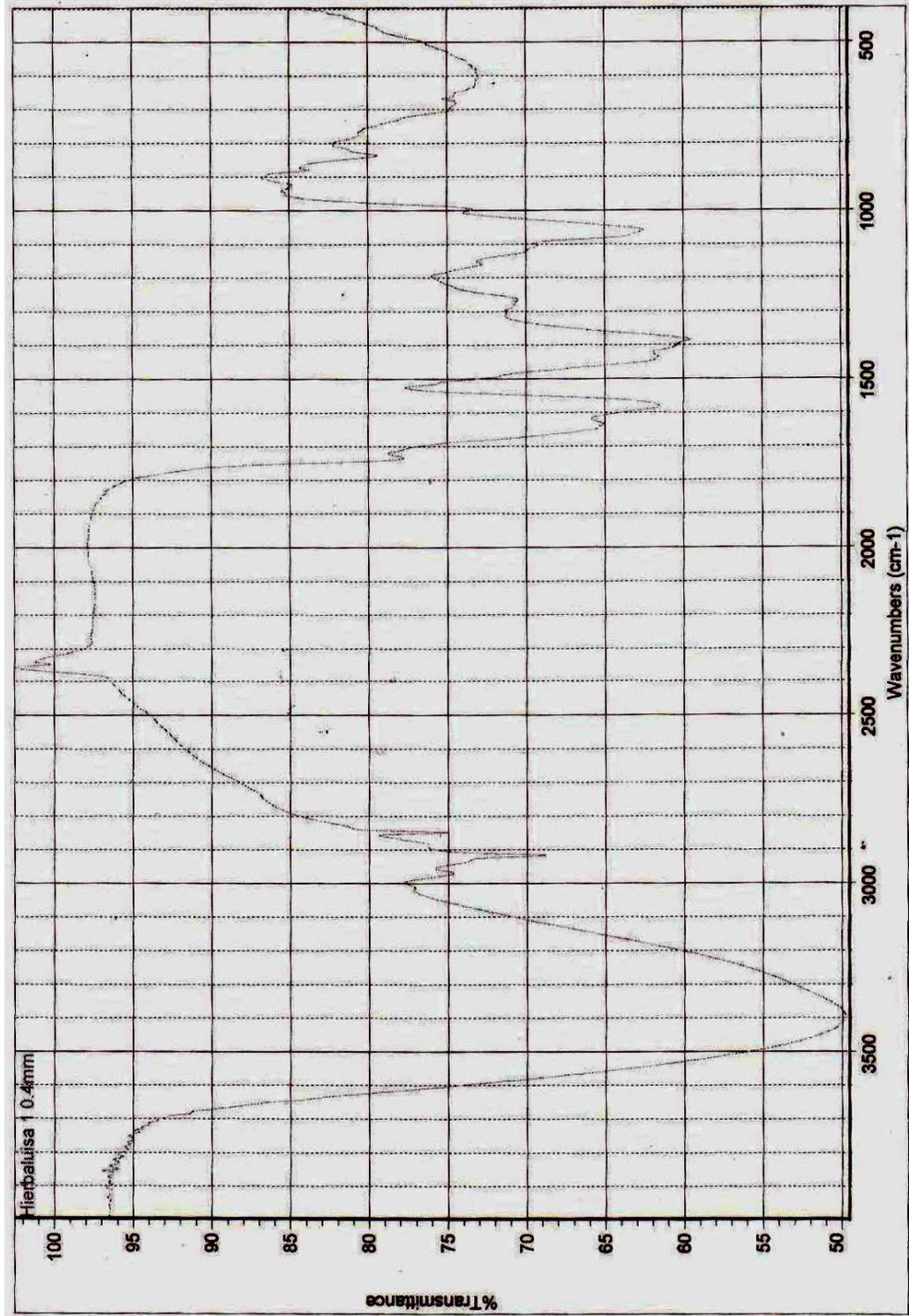
Anexo 1: Espectro IR del extracto de romero puro



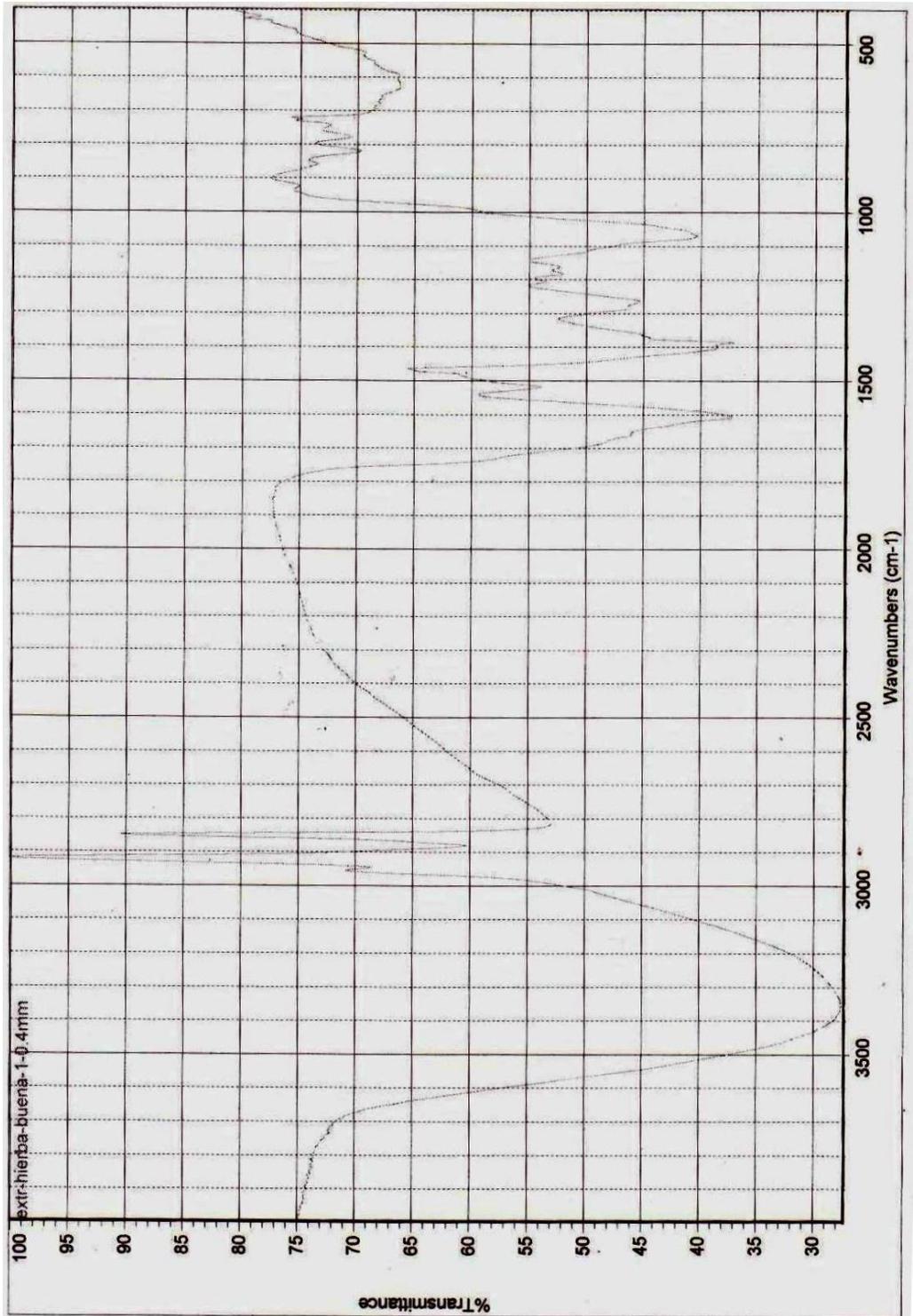
Anexo 2: Espectro IR del extracto de laurel puro



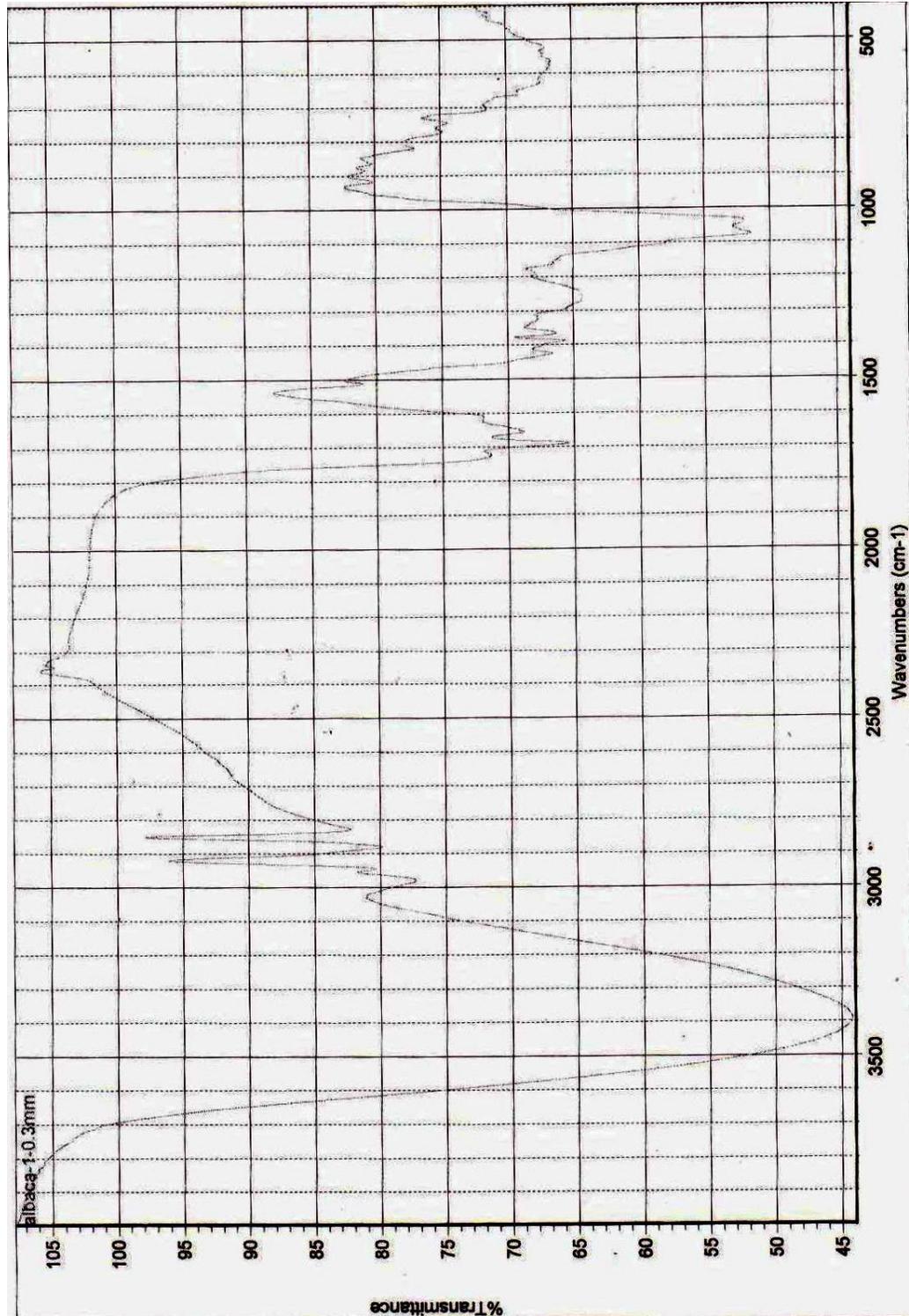
Anexo 3: Espectro IR de la fracción más activa de laurel(N 6) (ver cuadro 4 en capítulo 4)



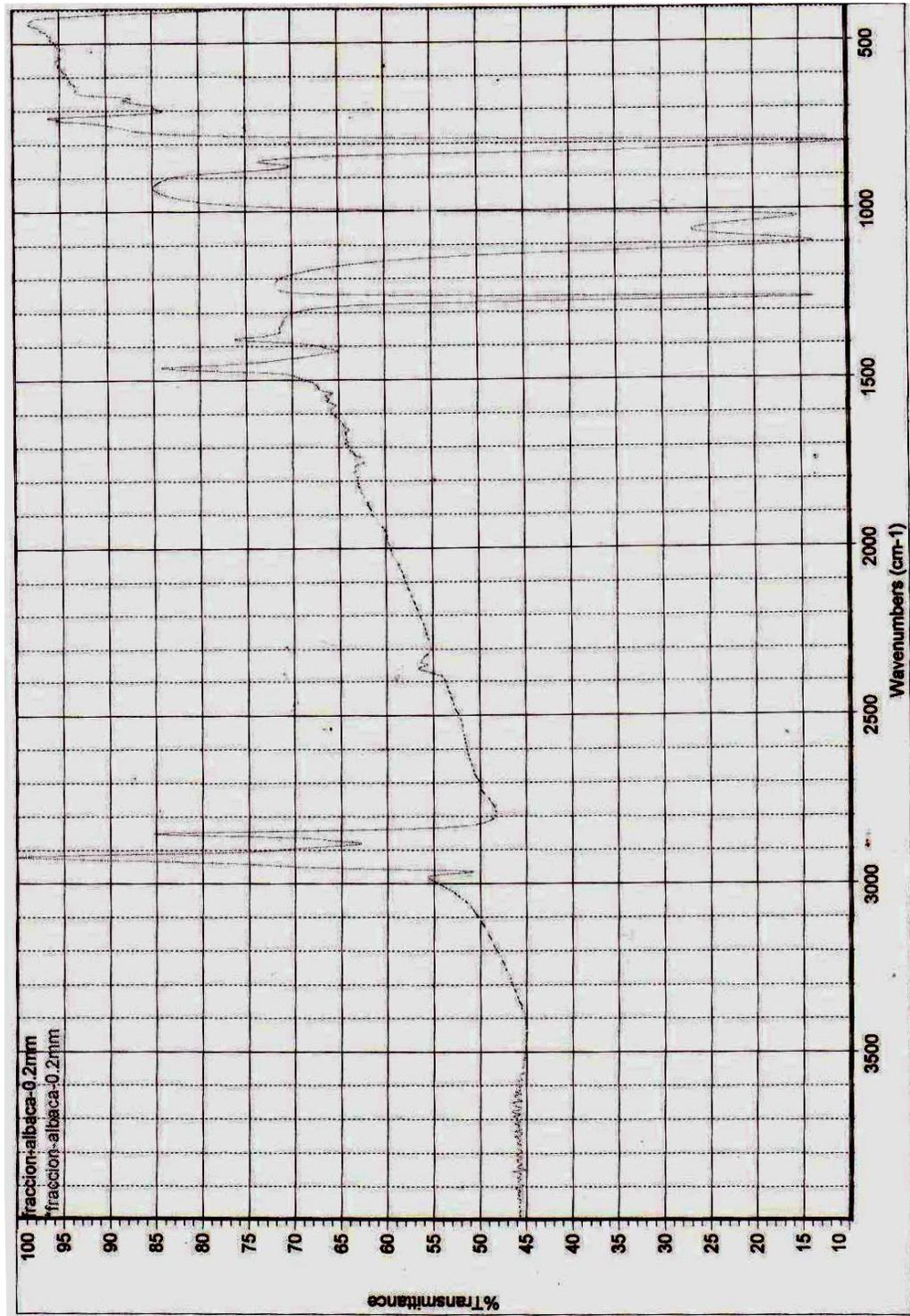
Anexo 4: Espectro IR del extracto de hierba luisa puro



Anexo 5: Espectro IR del extracto de hierba Buena puro



Anexo 6: Espectro IR del extracto de albahaca puro



Anexo 7: Espectro IR de la fracción más activa de albahaca(N 5) (ver cuadro 4 en capítulo 4)