

ÍNDICE MEMORIA

Índice memoria	1
Resum	3
Resumen	5
Abstract	7
Agradecimientos	9
Capítulo 1: Objetivos	11
1.1. Planificación	11
Capítulo 2: Introducción	13
2.1. Las flores como alimento	13
2.2. El color de los pétalos	16
2.3. Pétalos a estudiar	16
2.3.1. Rosa	16
2.3.2. Clavel	17
2.3.3. Pensamientos	18
2.4. Antioxidantes	19
2.4.1. Características generales	19
2.4.2. Evaluación de los antioxidantes en los alimentos	20
2.5. Estudios con algunos radicales libres	22
2.5.1. Realización de pruebas con anión de superóxido $O_2^{\cdot -}$	22
2.5.2. Radical de hidróxilo (HO^*)	23
2.5.3. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	23
2.5.4. Ácido Hipocloroso ($HOCl$)	23
2.5.5. Peroxinitrito ($ONOO^-$)	23
2.5.6. Radical Peroxilo (ROO^*)	24
2.6. Ensayos más habituales para determinar la actividad antioxidante	24
2.6.1. Ensayo TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter)	24
2.6.2. Ensayo ORAC (Oxygen Radical-Absorbance Capacity)	24
2.6.3. Ensayo TEAC (Capacidad Antioxidante equivalente de Trolox)	25
2.6.4. Método del ácido tiobarbitúrico (TBAR'S)	25
2.7. Determinación de los polifenoles totales	26
2.7.1. Ensayo FOLIN-CIOCALTEU	26

Capítulo 3: Material y métodos	29
3.1. Obtención y secado de los pétalos	29
3.1.1. Reactivos químicos	29
3.2. Extracción	29
3.2.1. Método 1: Agitación, ultrasonidos y centrifugación	32
3.2.2. Método 2: Polytron y centrifugación	32
3.3. Cuantificación de los polifenoles totales y/o capacidad antioxidante ..	33
3.3.1. Método Folin – Ciocalteau	33
3.3.2. Método TEAC	36
3.3.3. Método ORAC	38
Capítulo 4: Resultados y discusión	45
4.1. Optimización método extracción	45
4.2. Método experimental.....	49
4.3. Resultados Folin – TEAC – ORAC	51
4.4. Estadística correlativa entre los ensayos	56
Capítulo 5: Conclusiones	62
Capítulo 6: Bibliografía	65
6.1. Referencias bibliográficas.....	65
6.2. Bibliografía de consulta.....	65
6.3. Páginas web consultadas	66

RESUM

Des dels anys vuitanta hi ha un gran interès per les flors en aplicacions alimentàries, especialment en les societats que busquen experiències culinàries innovadores.

Les flors es poden utilitzar en amanides, en guarnicions de sopes i entrants, com ingredients de molts plats a trossos sobre postres, a daus i en begudes. Aporten una gran gama de colors, gustos i formes. A més moltes de les flors comestibles tenen components saludables. Per exemple contenen compostos actius antioxidants.

L'objectiu d'aquest treball és avaluar la capacitat antioxidant de pètals de flors mitjançant diferent mètodes, així com optimitzar l'extracció dels compostos antioxidants que contenen.

Els principals compostos antioxidants de les flors son polifenols. Per realitzar la seva extracció s'han usat dissolvents orgànics i les seves mescles amb aigua. A més s'han tractat els pètals amb agitació o trituració. El millor procediment d'extracció ha estat amb etanol al 40% i agitació vigorosa durant 80 minuts.

La quantitat de polifenols s'ha avaluat mitjançant tres mètodes: Folin (que avalua la concentració de polifenols com a àcid gàl·lic), TEAC i ORAC (que ambdós determinen la capacitat antioxidant en equivalents de Trólox)

Tots el pètals de les flors aporten activitat antioxidant i presència de polifenols. Les que més, les roses.

Existeix una correlació entre el resultats dels tres assaigs quan s'estudien les flors de forma independent. Resultat que no es dona quan s'avaluen totes juntes o per colors. Una explicació a aquest fe és que els antioxidants naturals son una diversitat de substàncies (polifenols, flavonoids,...) i algun mètode usat en aquest estudi només assaja la concentració o capacitat antioxidants dels polifenols.

RESUMEN

A partir de los años ochenta se ha mostrado un gran interés por las flores en aplicaciones de alimentación, especialmente en las sociedades que buscan experiencias culinarias novedosas.

Las flores se pueden utilizar: en ensaladas, en guarniciones de sopas y entrantes, como ingredientes de muchos platos, troceadas sobre los postres, en cubitos y en bebidas. Éstas aportan una amplia gama de colores, gustos y formas interesantes. Además muchas de las flores comestibles tienen componentes saludables. Por ejemplo, contienen compuestos activos antioxidantes.

El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad antioxidante de pétalos de flores mediante distintos métodos, así como optimizar la extracción de los compuestos antioxidantes que contienen.

Los principales compuestos antioxidantes de las flores son polifenoles. Para efectuar su extracción se han empleado disolventes orgánicos y sus mezclas con agua. Además se han tratado los pétalos con agitación o trituración. El mejor procedimiento encontrado ha sido con etanol al 40 % y con agitación vigorosa durante 80 minutos.

Los polifenoles se han evaluado por tres métodos: Folin (que evalúa la concentración de polifenoles como ácido gálico), TEAC y ORAC (que ambos determinan la capacidad antioxidante equivalente de Trolox).

Todos los pétalos de flores aportan actividad antioxidante y presencia de polifenoles. Las que más, las rosas.

Existe correlación entre los resultados de los tres ensayos cuando se estudian las flores de forma independiente, resultado que no se da cuando se evalúan todas juntas o por colores. Una explicación a este hecho es que los antioxidantes naturales son una diversidad de sustancias (polifenoles, flavonoides,...) y algún método empleado en este estudio solo ensaya la concentración o capacidad antioxidante de polifenoles.

ABSTRACT

Since the eighties has shown a great interest in flowers in food applications, especially in cultures that seek new culinary experiences.

The flowers can be used in salads, soups and side dishes in inbound, as ingredients in many dishes, desserts on chopped, diced and beverages. They provide a wide range of colors, tastes and interesting forms. In addition many of the flowers are edible components healthy. One must bear in mind that the flowers of many plants possess antioxidant activity.

The objective was to evaluate the antioxidant capacity of flower petals through various methods, as well as optimizing the extraction of the compounds that contain antioxidants.

The main antioxidant compounds of the flowers are polyphenols. For their extraction have been used organic solvents and water mixtures. Petals also have been tried with agitation or grinding. The best procedure has been found with 40% ethanol and 80 minutes during vigorous agitation.

Polyphenols have been evaluated by three methods: Folin (which assesses the concentration of polyphenols as Gallic acid), TEAC and ORAC (that determine both the antioxidant capacity of Trolox equivalent).

All flower petals show the presence of polyphenols and antioxidant activity. The most roses.

Correlation has been found between the results of three tests when the flowers are studied independently, a result that is not all together when evaluating or colors. One explanation is that natural antioxidants are a variety of substances (polyphenols, flavonoids,...) and someone method only tests the concentration of polyphenols and antioxidant capacity

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer la ayuda a todas las personas que me han facilitado el desarrollo de mi estudio:

En primer lugar, quiero agradecer a la directora del proyecto, María Pilar Almajano por haberme dado la oportunidad de poder realizar el proyecto y de poder poner mi granito de arena en esta gran investigación.

Al codirector del proyecto Jordi Bou, por su comprensión y apoyo cuando más lo necesitaba; por ayudarme a superar los diferentes obstáculos con los que me he encontrado en este tiempo; sin él el proyecto no sería tal y como ha sido.

A Marga y Laura, mis compañeras de laboratorio por su ayuda en la realización de los análisis y por hacer la vida del laboratorio más alegre y amena.

Para finalizar a todas aquellas personas que indirectamente han colaborado con sus consejos, apoyo y ayuda.

Capítulo 1:

OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto es evaluar las posibilidades como sustancias antioxidantes naturales de pétalos de flores con potenciales aplicaciones en alimentación.

Desde un punto de vista más particular el estudio se centra en:

1. Optimizar el método de extracción. Estudiar, comparar y determinar el mejor método, el mejor disolvente y la mejor concentración.
2. Calcular los polifenoles totales de los diferentes pétalos, una vez optimizado el método de extracción mediante el ensayo Folin-Ciocalteu.
3. Determinar la capacidad antioxidante frente a radicales libres por varios métodos: TEAC y ORAC.
4. Estudiar la interrelación entre los diferentes estudios de capacidad antioxidante realizados; así como la influencia del tipo de flor y del color.

1.1. Planificación

La planificación de las tareas de este proyecto son:

- Serán necesarias unas tres semanas para optimizar el método idóneo de extracción, sobre la base de anteriores experimentos realizados por otros investigadores.
- Se realizará en un periodo de 15 días el análisis del resto de pétalos y el cálculo de sus polifenoles totales (método Folin-Ciocalteu).
- Aproximadamente durante 3 semanas se determinará la actividad antioxidante con los diferentes métodos (TEAC y ORAC).

Las tareas a realizar y los períodos de tiempo, traducido en horas, para cada una de ellas se detallan a continuación:

Taula 1. Actividades y tareas previas para la realización del Proyecto
Final de Carrera

Actividades/Tareas	Dedicación
Puesta a punto de métodos y realización de calibrados (optimizar el método idóneo de extracción).	60 horas
Realización de los métodos descritos en el proyecto (Cálculo polifenoles totales (Folin, TEAC y ORAC)	85 horas
Análisis de resultados	30 horas
Búsqueda bibliográfica	20 horas
Redacción del PFC-1	100 horas
Redacción del PFC-2	150 horas
	445 horas

Capítulo 2:

INTRODUCCIÓN

Los alimentos son una fuente importante de vitaminas, nutrientes y otras sustancias esenciales para los organismos. Pero sobretodo las frutas y las verduras son una fuente muy importante de antioxidantes, unos compuestos que retardan o inhiben la oxidación producida por los radicales libres.

Existe una gran variedad de antioxidantes, desde vitaminas hasta compuestos fenólicos. Este ácido fenólico tiene un poder antioxidante y antimicrobiano y podría interaccionar con las proteínas formando un complejo nombrado "adducto" que tiene un poder antioxidante superior al de sus componentes.

A continuación se explica el inicio del uso como alimento de los pétalos, las características principales de los pétalos con los que se trabajarán, los métodos generales que existen para calcular la capacidad antioxidante.

2.1. Las flores como alimento

El oxígeno es esencial para la vida humana, pero paradójicamente el oxígeno interviene en el organismo y en los alimentos con reacciones que producen sustancias tóxicas: los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno. Estas sustancias son muy oxidantes e inestables, y en los alimentos pueden producir ranciedad, olor y gusto desagradable (López et al, 2004).

A partir de los años ochenta se ha mostrado un gran interés por las flores comestibles, especialmente en las sociedades que buscan experiencias culinarias únicas (Kelley et al.,2001;2002).

Las flores se pueden utilizar: en ensaladas, en guarniciones de sopas y entrantes, como ingredientes de muchos platos, troceadas sobre los postres, en cubitos y en bebidas (Barash, 1998). Estas aportan una amplia gama de colores, gustos y formas interesantes. Además muchas de las flores comestibles tienen componentes saludables (Friedmman et al., 2005). Se ha de tener en cuenta que las flores de algunas plantas poseen un activo antioxidante muy fuerte, como por ejemplo las flores de rosa, especialmente cuando se hacen infusiones (Vandejagt et al., 2002).

Hemos de hablar entonces de la florifagia, el acto de comer flores, se ha de comentar que no es un invento actual, ni de la cocina de fusión, ni de los cocineros mediáticos. Es una costumbre tan antigua como el mundo, los primeros hombres recolectores ya se alimentaban de ellas.

Sus propiedades medicinales y sus cualidades saludables las ha mantenido cerca de la cocina durante miles de años en los cinco continentes. A muchas de ellas se les han atribuido diferentes poderes, otras han inspirado mitos como los "lotófagos", los comedores de lotos que perdían la memoria, tal como relata Homero en "La odisea". Las raíces confitadas de esta planta se usaba para asar aves, uno de los platos predilectos de la corte del Imperio Celeste, como explica Néstor Luján en su libro "Carnet de ruta". En Asia, son importantes en la farmacopea tradicional. No es de estañar entonces, el uso en Japón y en China de crisantemos y dalias en sus platos.

También los indígenas de América las apreciaban y consumían mucho antes que los españoles llegaran a América. Fray Bernadino Sahagún recoge en su obra "Historia general de las cosas de la nueva España" los impronunciabiles nombres de flores que los aztecas usaban en sus platos y bebidas. Las flores de la calabaza, la del maguey, se siguen consumiendo son el patrimonio de la gastronomía popular. El romano Apicio incluye en su recetario "De re coquinaria" un pastel de rosas que se servía adornado con pétalos. Y los árabes tampoco se quedan atrás en este capo; Ambrosio Huici Miranda, en "La cocina Hispano-Magrebí" reproduce diferentes recetas con jarabes de flores (rosas, violetas...), pastas diferentes para condimentos y algún palto como la "hechura de malva". La costumbre de usar flores en la cocina se ha mantenido en la actualidad en todos los países árabes del mediterráneo, donde el uso de la rosa o el fonoll es natural. Las malvas fueron la pasión de Carlomagno que se las comía en tortilla o ensalada, en cambio los reyes medievales preferían el nardo, su sabor se parece al jengibre y se sigue utilizando en India y en Indonesia. También son flores la alcachofa y la coliflor, pero como son tan cotidianas no llaman la atención.

Esta larga tradición de la florifagia la están retomando cocineros de todo el mundo que defienden la comida sana, ligera y apuestan por productos biológicos. En Tailandia han aparecido nuevos platos elaborados con especies que antiguamente solo se usaban con fin ornamental, como las orquídeas. En Europa famosos cocineros utilizan sus jardines como huertas: pétalos, pistilos, gemas, hojas... aportan una belleza inusual, una delicadeza extrema que se traduce en diferentes matices de sabores: amargos, picantes...

Como mejor se pueden aplica los matices gustativos de las flores es comiéndolas en crudo. Lucen mucho en ensaladas, pero donde mejor se pueden apreciar sus cualidades químicas y biológicas es en compotas y en infusiones. De la gran mayoría solo se comen los pétalos.

Los pétalos de rosa se usan para perfumar asados de cordero o de aves. La flor de menta combina muy bien con el pescado. Las capuchinas, que tienen un ligero sabor picante, aportan gracia a sopas y ensaladas. Las violetas se suelen mezclar con las tortillas, pero también confitadas y en escarcha (pintadas con clara de huevo, espolvoreadas con azúcar glas y al horno a baja temperatura hasta que forma una costra cristalina.) Las flores de las plantas aromáticas se secan y se trituran hasta reducirlas a polvo para después mezclarlas con sal antes de aliñar platos de carne y pescado.

Veamos algunas de estas flores:

- Yucca filamentosa, es una planta que crece silvestres en los estados Unidos, sus flores son blancas y se pueden usar en la guarnición de platos.
- Platycodon grandiflorus (Campanilla o Campana China), bonita flor perenne que se puede usar en ensaladas o para combinar con la mantequilla, tiene un sabor muy dulce.
- Monarda didyma (Bergamota silvestre, Monarda), flor perenne aromática, ideal para ensaladas, té o para añadir en zumos. De sabor dulce. También son comestibles sus hojas.
- Begonia gr. Semperflorens (Flor de azúcar), los pétalos de esta variedad se pueden consumir con macedonia de frutas o confitadas, también como guarnición de platos. Se usan indistintamente los pétalos o la flor en su conjunto.
- Patiens walleriana (Alegría de la casa), flores de color rojo o blanco que se usa como guarnición de platos.
- Dianthus caryophyllus (Clavel), los populares claveles mediterráneos pueden ir en ensaladas, mantequillas o como guarnición.
- Dianthus plumarius (Clavelina), ídem anterior.
- Dianthus barbatus (Clavel del poeta), ídem anterior.
- Chrysanthemum x morifolium (Crisantem), estas flores que acompañan al día de todos los santos en los cementerios, se usa en otros países ensaladas, sopas y salsas. Tienen un sabor amargo. Se han de escaldar los pétalos antes de usarlos. Sus hojas también son comestibles.
- Taraxacum officinale (Achicoria amarga), para ensaladas, sus hojas jóvenes y brotes son comestibles. Se han de recolectar en floración.
- Helianthus annuus (Gira-sol pequeño). Sus flores se pueden usar para ensaladas y sopas. Sus semillas son las populares pipas.
- Achillea millefolium (Milenrama, Milhojas, Milefolio...), flores para hacer té de hierbas o zumos.
- Gladiolus cv. (Gladiol), flores de sabor dulce que se usan para ensaladas, como guarnición de platos...
- Papaver rhoeas (Rosella), se utilizan solamente los pétalos y se usan como guarnición o para hacer almíbar.
- Hemerocallis cv (Lirio de día), ensaladas, sopas, compotas... Sus brotes pueden usarse para cocinar o freír.
- Bellis perennis (Margarita de los prados), para ensaladas.

- Alcea rosea (Malva-rosa o Malva Real), para ensaladas, sus brotes también son comestibles.
- Antirrhinum majus (Boca de dragón, Dragonario, Boca de león, Dragoncitos, Gallitos), para ensaladas, por su fuerte olor es aconsejable usarla con moderación.
- Pelargonium spp. (Geranios) para ensaladas, aguas de flores, guarnición...
- Tropaeolum majus (Capuchina) para ensaladas, mantequillas, etc. Su sabor es parecido al del berro.
- Violet (Violeta), para ensaladas, vinagres, mantequillas, tés, almíbar, compotas.... Tiene una gran fragancia y sus hojas son comestibles.

2.2. El color de los pétalos

Las flores deben su color a dos tipos de pigmentos: pigmentos liposolubles contenidos en los cloroplastos y pigmentos hidrosolubles contenidos en los vacuolos de las células epidérmicas de los pétalos. Casi todos los tonos azules y púrpuras se deben a los pigmentos vacuolares nombrados antocianos. Estos cambian de color en función de su grado de acidez o alcalinidad y del tipo exacto de antocianina. Si la evolución vacuolar es básica, el color es azul; si es neutro, su color es púrpura o violeta; y si es ácido, su color se convierte en rojo. Estas variaciones explican porque una misma planta cambia de color depende donde este plantada. El rojo también es debido a la presencia de pigmentos cromoplásticos. El amarillo es por las flavonas o los carotenos. El color blanco de los pétalos se debe a la presencia de diminutas bolsas de aire entre las células que la forman. (Meléndez-Martínez et al.,2004)

Los pigmentos carotinoides son los responsables de la coloración de gran número de alimentos vegetales y animales, como las zanahorias, el zumo de naranja, los tomates, el salmón y la clara de huevo. No obstante, diferentes estudios han manifestado las propiedades antioxidantes de estos pigmentos. (Meléndez-Martínez et al.,2004)

Gran parte de las frutas y los vegetales deben su color a sus correspondientes pigmentos, que son sustancias con una función biológica muy importante en su tejido. Existe una gran cantidad de pigmentos relacionados con frutas y vegetales, entre ellos las clorofilas, los carotinoides, las antocianinas, las flavonas, los taninos y otros. (Jiménez et al.,2004).

2.3. Pétalos a estudiar

2.3.1. Rosa

Se dice que los orígenes de las rosas cultivadas se remontan a la jardinería en la antigua China Imperial. En la mitología hindú se la relacionaba con la diosa del

amor y la belleza, así como en la Grecia clásica. También fue muy venerada en el Egipto faraónico. Existe la creencia de que Cleopatra hacía rellenar sus almohadas con pétalos de esta flor.

Los rosales son un conocido género de arbustos espinosos y floridos representantes principales de la familia de las rosáceas. Hay alrededor de 100 especies de rosales silvestres, originarios de zonas templadas del Hemisferio Norte.

La mayoría de las especies de Rosa son cultivadas como ornamentales por su flor; también para la extracción de aceite esencial (perfumería y cosmética), usos medicinales (fitoterapia) y gastronómicos. (Plantas y Hogar)



Figura 1. Rosas

2.3.2. Clavel

El clavel es una planta herbácea perteneciente a la familia de las Caryophyllaceae (*Dianthus caryophyllus*), de 1 m de altura con hojas angostas, opuestas y envainadoras y flores vistosas. Hay más de 250 especies diferentes, entre las que destacan por su popularidad el *Dianthus barbatus*, el *caryophyllus*, el *chinensis* o el *deltoides*.

Puede presentar tres tipos de flores en función de su tamaño: la 'standard' o 'uniflora', más grande, y las 'mini' o 'spray', conocidas en España como 'clavelina' y 'micro'.

Los colores más comunes son el rosa, el blanco y el rojo. Nacen en grupos de una a cinco flores, con pétalos dentados y cáliz con dientes triangulares. (Plantas y Hogar)



Figura 2. *Claveles*

2.3.3. Pensamientos

El pensamiento es una planta semiperenne muy apreciada, ya que resiste muy bien las frías temperaturas del invierno, requiere unos cuidados extremadamente sencillos y su variedad de tonalidades la hacen favorita frente a otras especies que, si bien también disponen de una gran gama de colores, son menos resistentes a los climas adversos.

Es una flor de exteriores que necesita iluminación. De origen hortícola, de la familia de las violáceas, su amplia variedad es fruto de la experimentación de una especie europea que podríamos denominar la "madre de los pensamientos", esta especie se llama realmente *viola tricolor* o pensamiento trinitaria.

Algunas características de esta flor son, por ejemplo, su altura, de entre 15 y 30 cm, aunque la media está en torno a los 20. La etapa que corresponde a su floración es la que abarca los meses otoñales, pero continúa hasta bien entrada la primavera. Con la llegada de las temperaturas cálidas comienzan a marchitarse, así pues, con el verano, su aspecto será decaído y mustio. Lo mejor entonces es cortarlas por la parte del tallo más baja y podremos volver a disfrutar de la alegría de sus tonalidades el invierno siguiente. (Plantas y Hogar)



Figura 3. *Pensamientos*

2.4. Antioxidantes

2.4.1. Características generales

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones eliminando intermedios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos.

Se han desarrollado muchos métodos *in vitro* para medir la actividad antioxidante. Algunos de ellos no correlacionan con la capacidad de inhibir el deterioro oxidativo de los alimentos. Estos métodos *in vitro* a menudo no se correlacionan con la capacidad de los compuestos para inhibir el deterioro

oxidativo de los alimentos (Decker, et al. 2005). Esto se debe a que la actividad de los sistemas antioxidantes en los alimentos no depende sólo de la reactividad química de los antioxidantes, sino también de factores como la ubicación física, la interacción con otros componentes de los alimentos e incluso de las condiciones ambientales.

Uno de los principales factores que afectan a la actividad de los antioxidantes que capturan radicales libres está relacionado a su comportamiento frente al agua y a los lípidos. Por ejemplo, los antioxidantes hidrofílicos son a menudo menos eficaces en emulsiones de aceite-agua que los antioxidantes liposolubles, mientras que los antioxidantes liposolubles son menos eficaces en los sistemas cuyo componente principal es hidrofílico (Decker, et al. 2005). Las diferencias en la eficacia de los antioxidantes en aceites y emulsiones se debe a su ubicación física en los dos sistemas. Los antioxidantes polares son más eficaces en la mayor parte de aceites, ya que pueden acumularse en la interfase aire-aceite. En cambio, los antioxidantes no polares son más eficaces en las emulsiones, ya que se mantienen en las gotitas de aceite y pueden acumularse en la interfase aceite-agua. Los hidroperóxidos se producen en la superficie de interacción aceite/agua. Los agentes pro-oxidantes (como metales de transición) se producen en la fase acuosa (Decker, et al. 2005).

Además, en las emulsiones con antioxidantes polares se separaría la fase acuosa. Los antioxidantes liposolubles reaccionan mejor con alimentos con un alto contenido de agua; en cambio, los polares son más eficaces en los aceites.

Existen ensayos in vitro que miden la actividad de los radicales libres, como "Ferric Reducing Antioxidant Power" (FRAP), "Trolox Equivalent Antioxidant Activity" (TEAC), y "Oxygen Radical Absorbant Capacity" (ORAC) se llevan a cabo en ausencia de lípidos.

2.4.2. Evaluación de los antioxidantes en los alimentos

Se han de tener precauciones con los alimentos a tratar; sabemos que existen grandes diferencias en el comportamiento de los antioxidantes en diferentes tipos de alimentos, pero hay algunas consideraciones generales (Decker, et al. 2005) que deben tenerse en cuenta:

- Evitar la oxidación a alta temperatura ($> 60^{\circ}\text{C}$) de almacenamiento. Las altas temperaturas pueden causar una descomposición rápida de hidroperóxidos, descomposición o volatilidad de los antioxidantes y el agotamiento de oxígeno (la solubilidad del oxígeno disminuye al aumentar la temperatura).
- Asegurarse de que al inicio de lípidos no contiene altos niveles de productos de oxidación primaria. Sabemos que los productos de oxidación de los lípidos como el hexanal y 2,4-decadial actúan como pro-oxidantes. Los aceites con valor de peróxido alto no deben utilizarse en estudios de oxidación, porque el aceite probablemente ya está rancio.
- Analizar de manera efectiva la actividad de los antioxidantes para medir los productos de oxidación primaria (por ejemplo, peróxidos, dienos conjugados) y oxidación secundaria (carbonilos, aldehídos). En algunos casos, los antioxidantes pueden aumentar los productos de oxidación

primaria mediante el intercambio de hidrógeno a un radical del peróxido. éstos forman un hidroperóxido y a la vez disminuye la formación de compuestos volátiles de bajo peso molecular. Al producirse dicha formación se obtendría una oxidación secundaria. Otros compuestos pueden disminuir los hidroperóxidos (por ejemplo, agentes oxidantes como los metales de transición), mientras que aumentan los productos de oxidación secundaria, que son los responsables de la ranciedad.

- Los tipos de productos de la descomposición de ácidos grasos formados durante la oxidación están relacionados con la composición de ácidos grasos del aceite. Por ejemplo, el hexanal se deriva de la oxidación de ácidos omega-6, y el propanal se deriva de la oxidación de ácidos grasos omega-3, como el ácido linolénico. Para los aceites ricos en ácido oleico, se puede utilizar como marcador de la oxidación el nonanal. Por lo tanto, cuando se elige un método para medir los productos de oxidación secundaria es fundamental conocer la composición de ácidos grasos del aceite que se oxida. Además, es esencial utilizar métodos que sean lo suficientemente sensibles como para medir bajos niveles de oxidación. Si es posible, deben llevarse a cabo evaluaciones sensoriales para confirmar los resultados de los análisis químicos.
- Es conveniente analizar cada uno de los compuestos por separado para permitir una mejor evaluación. Si se espera que los compuestos fenólicos sean los principales antioxidantes en un extracto crudo, se debe saber con antelación el contenido de fenoles totales y es conveniente conocer los datos de composición del extracto para comparar las muestras.
- Utilizar un sistema modelo, que refleje un alimento lipídico, con o sin agentes pro-oxidantes. Los antioxidantes añadidos pueden interactuar con antioxidantes endógenos o con los pro-oxidantes y con ello alterar la cinética de oxidación. Debido a que las fuentes biológicas de las que proceden los alimentos pueden mostrar grandes diferencias en concentraciones antioxidantes y pro-oxidantes, lo mejor es utilizar una única fuente de material. En algunos casos, las variaciones en las concentraciones de antioxidantes pueden minimizarse mediante el aislamiento de los aceites purificados.
- El pH puede afectar a las reacciones oxidativas, puede alterar la capacidad de los antioxidantes y con ello la solubilidad y la capacidad de quelación. Por lo tanto el PH utilizado en los experimentos de la oxidación ha de ser similar a los modelos a los alimentos de interés.
- Estandarizar el tiempo y las condiciones para determinar si los antioxidantes son eficaces. Analizar como varía la capacidad antioxidante en diferentes situaciones, por ejemplo en diferentes fases del período. Estos cálculos deben realizarse sobre los datos obtenidos de las primeras etapas de la oxidación, porque las concentraciones de los productos de oxidación en las etapas posteriores puede dejar de aumentar o puede incluso disminuir. Se debe de plantear un diseño estadísticamente viable, que nos permita evaluar las diferencias entre los controles (sin adición de antioxidantes) y las muestras, en las que habremos introducido diferentes concentraciones de antioxidantes.

2.5. Estudios con algunos radicales libres

Los métodos utilizados para determinar la actividad antioxidantes en los alimentos han evolucionado. Por ejemplo con sistemas modelos de aceite en agua, con liposomas o con alimentos como carne y pescado.

Está claro que es necesario establecer un sistema de conservación de los alimentos para evitar la oxidación, la pérdida de valor nutricional y la pérdida de valor comercial. Con el fin de obtener un alto contenido de antioxidantes en los alimentos naturales es necesario un método rápido para determinar la capacidad antioxidante. Este método podría ser una herramienta útil para hacer una selección entre las diferentes especies, variedades, grado de maduración y condiciones de cultivo. Podemos decir que la capacidad antioxidante de un producto de origen vegetal, puede ser un parámetro para poder evaluar la calidad de los alimentos (Sánchez-Moreno, 2002).

La eficacia de un antioxidante se puede medir por la capacidad de inhibir la oxidación de un sustrato. Después de que el sustrato se oxida bajo condiciones estándar, se mide el grado de oxidación con métodos químicos o métodos sensoriales. Por lo tanto, las características esenciales para llevar a cabo un experimento de oxidación, son:

- Un sustrato adecuado
- Un iniciador de oxidación
- Una medida adecuada del punto final

La combinación de sustrato, iniciador y punto final que se han utilizado son numerosos, e incluso con las mismas técnicas analíticas.

2.5.1. Realización de pruebas con anión de superóxido $O_2^{\cdot-}$

Un radical libre contiene uno o más electrones desapareados y es capaz de existir de forma independiente, aunque de vida media extremadamente corta. Los radicales libres se producen metabólicamente en los organismos vivos. Además, en los alimentos y los sistemas biológicos también se pueden generar algunos no radicales derivados de moléculas de oxígeno (peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$)) (Sánchez-Moreno, 2002).

La xantina oxidasa es una de las principales fuentes enzimáticas de especies reactivas al oxígeno *in vivo*. Aunque la xantina oxidasa presenta en el tejido normal deshidrogenasa, es un enzima que transfiere los electrones a nicotinamidaadeninucleotido (NAD), ya que oxida la xantina a ácido úrico, en determinadas condiciones de estrés la deshidrogenasa es convertida a una enzima oxidasa (Sánchez-Moreno, 2002).

La medida se realiza por un método espectrofotómetro, haciendo que reaccione con algún compuesto que nos proporciona un sustrato que tenga una absorción o una longitud de onda determinada (Sánchez-Moreno, 2002).

2.5.2. Radical de hidróxilo (HO)*

El radical hidroxilo (HO*) puede ser calculado utilizando el ensayo desoxiribosa: una mezcla de cloruro Fe(III) (FeCl₃) y ácido tetraacéticoetilendiamina (EDTA) que en presencia de ascorbato reacciona a la forma de hierro (II)-EDTA y oxida el ascorbato; entonces el H₂O₂ reacciona con el hierro (II)-EDTA para generar hierro(III)-EDTA, HO* y la reacción de Fenton (Fe²⁺ + H₂O₂ → Fe³⁺ + OH⁻ + HO*). Estos radicales atacan el azúcar desoxiribosa y se degradan en fragmentos, todos o algunos reaccionan (con calor y pH bajo) con el ácido tiobarbitúrico, para dar un cromógeno rosa, medible, previa calibración por espectrofotometría visible (Sánchez-Moreno, 2002).

2.5.3. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se activa con los fagocitos y elimina varias cepas de bacterias y hongos. Además, el H₂O₂ se genera en vivo por varias enzimas oxidasas. Existen cada vez más pruebas de que el H₂O₂, ya sea directamente o indirectamente a través de la reducción de su producto OH⁻, actúa como una molécula de mensajero en la síntesis y activación de los mediadores de la inflamación. La detección del peróxido de hidrógeno y la actividad antioxidante se miden utilizando peroxidasa. (Adamson et al, 1999)

El ensayo de H₂O₂ en los zumos de frutas de mora, frambuesa, arándano y fresa se lleva a cabo con la medición de la reacción directa de H₂O₂ y titanio (IV). Precipita Ti-H₂O₂ y este se disuelve en ácido sulfúrico y se mide a 410 nm (Sánchez-Moreno, 2002).

2.5.4. Ácido Hipocloroso (HOCl)

Otra fuente de oxidantes en vivo de neutrófilos es mieloperoxidasa (MPO) . Éste cataliza la oxidación de los iones de cloruro de HOCl. El HOCl generado por MPO también puede inactivar otras enzimas proteolíticas y contribuir a daños en los tejidos humanos sanos. Muchos compuestos pueden actuar como HOCl y se prueban utilizando este ensayo, como el ácido ascórbico, la albúmina, ácido gálico y derivados y carotenoides (Sánchez-Moreno, 2002).

El HOCl buscado puede examinarse utilizando OPG / H₂O₂ /cloruro de sodio.

2.5.5. Peroxinitrito (ONOO⁻)

El peroxinitrito (ONOO⁻) está formado por la reacción del óxido nítrico y superóxido. Es un citotóxico que puede ser generado por células endoteliales, neutrófilos y macrófagos. Se mide a través de la reacción de oxidación de dihidrorodamina a rodamina fluorescente; se mide su potencial antioxidante con una microplaca fluorescente, en el espectrofotómetro con una longitud de onda de excitación y de emisión de 485 y 530 nm, respectivamente (Alzoreky N. and Nakahara K., 2001).

2.5.6. Radical Peroxilo (ROO^*)

El radical peroxilo es uno de los radicales libres que se encuentra en los sustratos biológicos utilizados en los ensayos de antioxidantes. Son algo menos reactivos que HO^* . Por ello tiene una vida media de segundo (en vez de nanosegundos) (Alzoreky N. and Nakahara K., 2001).

2.6. Ensayos más habituales para determinar la actividad antioxidante

2.6.1. Ensayo TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter)

El ensayo TRAP se suele usar para la determinación del estado antioxidante de plasma humano. Se le añade un indicador al plasma y se controla la oxidación de los materiales midiendo el oxígeno consumido durante la reacción. El período en el que se inhibe la oxidación de los antioxidantes en el plasma, se compara con la de Trólox ($C_{14}H_{18}O_4$), que es la referencia un antioxidante soluble en agua.

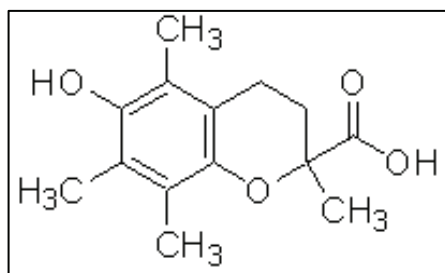


Figura 4. Trólox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromal-2-carboxílico)

2.6.2. Ensayo ORAC (Oxygen Radical-Absorbance Capacity)

Este método se aplica para evaluar la capacidad antioxidante en muestras biológicas i de alimentos. Se basa en la inhibición del radical peroxil oxidativo, inducido por descomposición térmica de compuestos azo como el AAPH ($[=NC(CH_3)_2C(=NH)NH_2]_2 \cdot 2HCl$). Este ensayo combina el tiempo y la disminución de la inhibición.

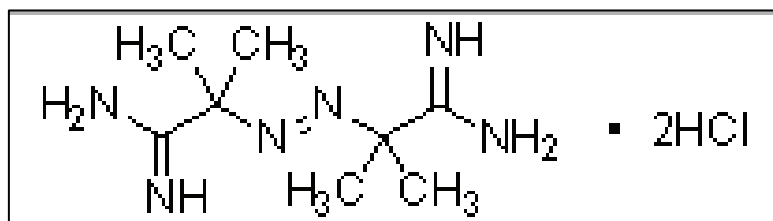


Figura 5. AAPH (2,2'-azo bis (2-amidinopropano) dihidrocloruro)

El mecanismo de la reacción se basa en la transferencia de un átomo de hidrogeno (HAT) (hydrogen atom transfer) del radical libre, AAPH, al antioxidante. Por ello se utiliza un radical iniciador, el AAPH, para generar el radical peroxil $\text{ROO}\cdot$ (Arnao M.B., Cano A. and Acosta M., 1999).

2.6.3. Ensayo TEAC (Capacidad Antioxidante equivalente de Trolox)

El ensayo TEAC o ensayo del ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolino-6-sulfónico) (ABTS) ($\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4$) está basado en la captación por los antioxidantes del radical catión $\text{ABTS}\cdot+$ generado en el medio de reacción. Como patrón se emplea el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E. El radical catión del ABTS posee una coloración verde-azulada con un máximo de absorción a 415 nm y una serie máximos secundarios de absorción a 645, 660, 734, 815 y 820 nm. Dependiendo de la variante del método TEAC utilizada se emplean distintas longitudes de onda, aunque las más frecuentes son 415 y 734 nm (Cao G., Alessio H.M. and Cutler R.G., 1993).

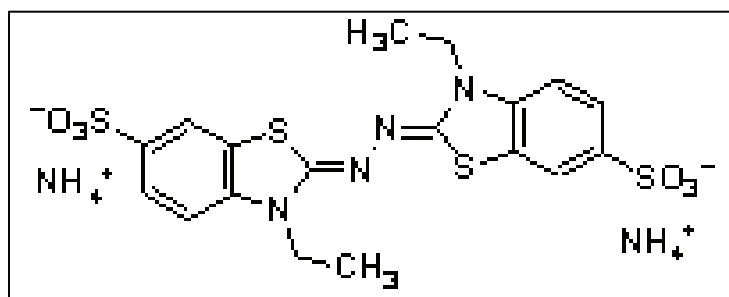


Figura 6. ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico))

Para el desarrollo del método se suelen emplear dos estrategias; inhibición y decoloración. En la primera los antioxidantes se añaden previamente a la generación del radical $\text{ABTS}\cdot+$ y lo que se determina es la inhibición de la formación del radical, que se traduce en un retraso en la aparición de la coloración verde-azulada. En la segunda estrategia, los antioxidantes se añaden una vez el $\text{ABTS}\cdot+$ se ha formado y se determina entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir la decoloración de este. El ensayo TEAC presenta además variaciones en el modo mediante el cual se genera el radical catión ABTS (Cao G., Alessio H.M. and Cutler R.G., 1993).

2.6.4. Método del ácido tiobarbitúrico (TBAR'S)

El método TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) es un sistema de medición rápido, sensible y económico para determinar el grado de peroxidación de lípidos en carne cruda y cocida, es por lo tanto recomendable para el control de calidad y el análisis de un gran número de muestras de carne.

En éste método, el ácido tiobarbitúrico (TBA) ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) reacciona con malondialdehído (MDA) ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$), un producto secundario de la peroxidación de

lípidos, para generar un color rojo el cual se puede detectar espectroscópicamente.

Sin embargo, la determinación del contenido de TBA en carne puede tener sus limitaciones. Ciertos protocolos pueden generar una sobreestimación ó una estimación inferior del contenido de TBARS, e incluso se pueden generar reacciones de interferencia.

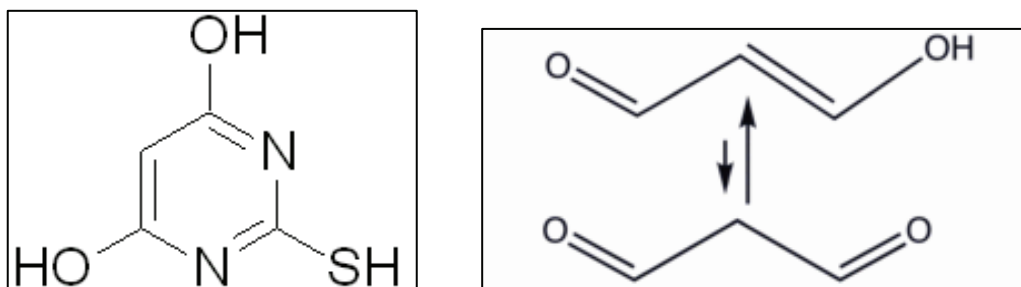


Figura 7. TBA (ácido tiobarbitúrico) y MDA (malondialdehído)

Estas reacciones de interferencia se pueden reducir de varias maneras, como incubar TBA y MDA a temperatura ambiente. Sin embargo, éste procedimiento alarga el tiempo de reacción, y lo hace inconveniente para un gran número de muestras. Además sólo se aplica a muestras de carne que tengan la concentración de sacarosa relativamente baja.

Debido a esto, se requiere un método simple y específico para muestras de carne que contengan una cantidad relativamente alta de azúcar, esto es >4% en la carne ó >0.4% en el extracto.

Wang et al., realizó un estudio en el que modificó el método de TBARS para aumentar su especificidad, lo realizó en muestras carne cocidas y almacenadas en frío con 10% de sacarosa. Los resultados mostraron que la adición de sacarosa no generaba interferencia en los colores (Fernández, et al. 1996).

2.7. Determinación de los polifenoles totales

2.7.1. Ensayo FOLIN-CIOCALTEU

El ensayo Folin-Ciocalteu ha sido utilizado durante muchos años como una medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos naturales. El mecanismo básico del método es una reacción redox por lo que puede considerarse como otro método de medida de la actividad antioxidante total. El método que se utiliza actualmente es una modificación efectuada por Singleton y Rossi (1965) de uno empleado para la determinación de tirosina, el cual se basaba en la oxidación de los fenoles por un reactivo de molibdeno y wolframio (tungsteno). La mejora introducida por Singleton y Rossi fue el uso de un heteropolianión fosfórico de molibdeno y wolframio que oxida los fenoles con mayor especificidad ($3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ y $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 14\text{WO}_3 \cdot 4\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). La oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la

aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 765 nm y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico (Ghiselli A., Nardini M., Baldi A. and Scaccini C., 1998)

Se trata de un método simple, preciso y sensible pero que sin embargo sufre numerosas variaciones cuando es aplicado por diferentes grupos de investigación, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes empleados de muestra, concentraciones de reactivos y tiempos y temperaturas de incubación.

Capítulo 3:

MATERIAL Y MÉTODOS

Los alimentos son una fuente importante de vitaminas, nutrientes y otras sustancias esenciales para los organismos. Pero sobretodo las frutas y las verduras son una fuente muy importante de antioxidantes, unos compuestos que retardan o inhiben la oxidación producida por los radicales libres.

3.1. Obtención y secado de los pétalos

Los pétalos que se usan en este proyecto han sido recogidos de varios jardines, de varias floristerías y del grupo de agroalimentaria de Castelldefels (ESAB).

Una vez obtenidos las flores se separan los pétalos del sépalo, se colocan en sobres correctamente identificados, se pesan y se colocan en la estufa (marca SELECTA, modelo CONTERM) a 25-30°C, se realizan pesadas periódicamente hasta obtener un peso constante.

3.1.1. Reactivos químicos

Los disolventes utilizados fueron puros, y a partir de ellos se realizaron en el laboratorio sus correspondientes disoluciones. El agua Milli-Q se obtuvo por el purificador que se encuentra en nuestro laboratorio.

Las casa suministradoras y sus marcas fueron: sigma-aldrich, alco, vidrafoc, entre otras.

3.2. Extracción

La extracción es un procedimiento de separación. Separando compuestos de la muestra a tratar con un disolvente idóneo. En este caso realizaremos dos tipos de extracción diferentes.

Material

- Trituradora domestica de la marca Moulinex
- Báscula



- Multiagitador con imanes (SBS. MULTIPOINT MAGNETIC STIRRER)



- Ultrasonidos (PROLABO-T-710 tn)



- Centrífuga (ORTO ALRESA)



- Polytron (IKA ULTRATURRAX T-18 Basic)
- Micropipetas y puntas
- Tubos de ensayo
- Criotubos

Disolventes

- Agua
- Acetonitrilo 100%
- Acetonitrilo 75% (en volumen)¹
- Metanol 100%
- Metanol 80% (en volumen)
- Metanol 60% (en volumen)
- Etanol 100%
- Etanol 80% (en volumen)
- Etanol 60% (en volumen)

¹ Poner la nomenclatura en % no es del todo exacto dado que la disolución se ha realizado en volumen (mL de Disolvente puro + mL agua Milli-Q)

3.2.1. Método 1: Agitación, ultrasonidos y centrifugación

1. Triturar los pétalos
2. Introducir una cantidad de pétalos en proporción 5% (m/v) para cada disolventes (0,15/3mL). En los tubos de ensayo.
3. Agitar los tubos de ensayo a 900 revoluciones por minuto (rpm) en un agitador magnético durante 30 minutos
4. Ultrasonicarlos 15 minutos
5. Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm
6. Extraer todo el sobrenadante posible y trasvasar el líquido en criotubos secos
7. Añadir 3 mL del disolvente usado en el sedimento
8. Repetir desde el punto 1 hasta el 4 dos veces más
9. Colocar cada fracción de extracto (1ª, 2ª y 3ª) en criotubos diferentes.

Obtendremos 9 grupos de criotubos (uno por cada disolvente) con tres tubos dentro de cada grupo (1ª, 2ª y 3ª extracción), así podremos cuantificar los polifenoles que se extraen en cada disolvente diferenciando las distintas extracciones.

3.2.2. Método 2: Polytron y centrifugación

1. Triturar los pétalos
2. Introducir una cantidad de pétalos en proporción 5% (m/v) para cada disolventes (0,15/3mL)
3. Poner el tubo en el polytron durante 30 segundos. Los tubos deberán estar dentro de un vaso con hielo para evitar un sobrecalentamiento. Ir subiendo la potencia del polytron regularmente hasta llegar al su máxima potencia.
4. Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm
5. Extraer todo el sobrenadante posible y ponerlo en un criotubos seco
6. Añadir 3 mL del disolvente usado en el sedimento
7. Repetir desde el punto 1 hasta el 4 dos veces más
8. Colocar cada extracción en criotubos diferente para poder

Obtendremos 9 grupos de criotubos (uno por cada disolvente) con tres tubos dentro de cada grupo (1ª, 2ª y 3ª extracción). Con ello podremos estudiar qué cantidad se extrae en cada una de ellas.

3.3. Cuantificación de los polifenoles totales y/o capacidad antioxidante

3.3.1. Método Folin – Ciocalteau

El método Folin-Ciocalteau se utiliza para cuantificar los polifenoles totales. Para su cálculo es necesario que la sustancia esté en disolución.

Se basa en la interacción de los polifenoles con el reactivo Folin activado con el carbonato de sodio. La reacción entre el reactivo Folin y los polifenoles se realiza en medio básico. Como resultado da un rango de colores; da una coloración azul, cuyo máximo de absorción es a una longitud de onda de 765 nm. Se lee a esta longitud. La intensidad del color es proporcional a la concentración de polifenoles. (ver capítulo 2.7.1)

Material

- Cubetas de plástico de 4 ml
- Micropipetas y puntas



- Espectrofotómetro UV-Visible (HP . 8453)

Reactivos

- Reactivo Folin
- Carbonato de sodio (20%)
- Agua Milli-Q

Procedimiento

1. Para que la respuesta del espectrofotómetro no se salga de rango (de 0,02 a 0,9 unidades de absorbancia), conviene diluir la muestra hasta concentraciones que permitan una medida aceptable.
2. Para ello se prepara 3 muestras conteniendo entre 5 y 50 μL de extracto de pétalos, se realiza en ensayo Folin y se escoge la cantidad que cae dentro del rango deseado. Si la cantidad de extracto más pequeña aún da una absorbancia excesiva, se diluye la extracción de pétalos con el mismo disolvente utilizado para su extracción entre 2 y 5 veces. Este dato es el factor de dilución.
3. En este paso determinamos la cantidad y la dilución que vamos a emplear en este método en todas las extracciones.
4. Preparar la caja con las cubetas necesarias. Cada muestra se hace por duplicado y cada disolvente ha de tener su blanco es decir, si la muestra se ha tratado con agua, el blanco se hará con agua, si se ha hecho con etanol de 60% su blanco también.
5. Añadir la muestra en la cubeta, (en los blancos se pondrá solo el reactivo).
6. Añadir 2 mL de agua Milli-Q
7. Añadir reactivo Folin hasta una proporción de 1:25 y carbonato de sodio al 20% hasta una proporción de 3:25
8. Dejar las muestras en la oscuridad durante una hora
9. Añadir agua Milli-Q hasta 4 ml
10. Determinar la absorbancia con una longitud de onda de 765 nm.

Tabla 2. Volúmenes utilizados en el método Folin en cada extracción.

	Cantidad (en microlitros)					Agua Milli-Q Final
	Muestra Reactivo	Agua Milli-Q Inicial	Reactivo Folin	Carbonato de Sodio 20%		
1ª Extracción	10	2000	160	480	1 h en la oscuridad	1350
2ª Extracción	25	2000	160	480		1335
3ª Extracción	45	2000	160	480		1315

Obtendremos unos valores de absorbancia, que se han de equiparar con equivalentes de ácido gálico para poder saber la cantidad de polifenoles totales que hay en la muestra, para ello disponemos de una recta de calibrado.

Cálculos

Se dispone de una recta de calibrado para este método. Ésta se realizó con ácido gálico con las concentraciones de 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 mg/L, luego se leyó su absorbancia a 765 nm.

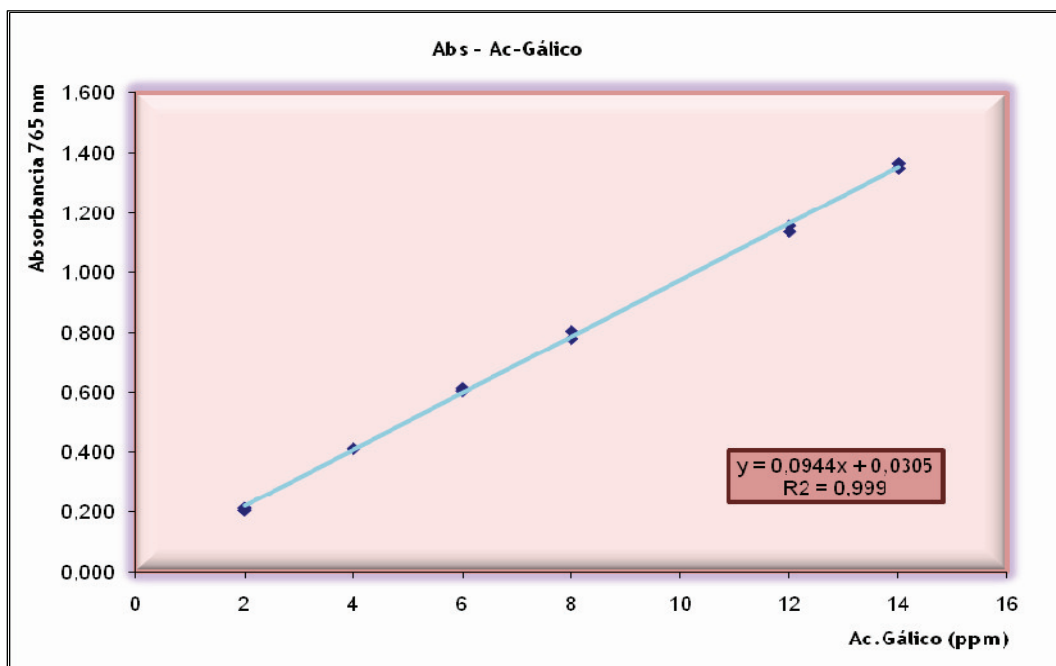


Figura 8. Recta de calibrado del método Folin – Ciocalteu

Con la recta de calibrado realizada, se busca la fórmula de la recta:

$$y = 0,0944x + 0,0305, R^2 = 0,990 \quad (1)$$

x = Valor de polifenoles totales expresado en equivalentes de Ác. Gálico (en mg/L).

y = valor de la absorbancia

Fórmula para la obtención de los equivalentes másicos en ácido gálico

$$x = \frac{y - 0,0305}{0,0944} \quad (2)$$

La X nos da la cantidad de polifenoles totales equivalentes másicos en ácido gálico en mg/L. Se ha de realizar diferentes factores de conversión, que son:

1. Calcular la concentración de ácido gálico con la ecuación 2 (la y es la absorbancia obtenida de cada muestra).
2. Corregir con el factor de dilución empleado.

3. Dividir este valor final por la masa introducida de la muestra en el momento de hacer la extracción

Este resultado es el de la cantidad de polifenoles totales en relación la masa de pétalos. Estos polifenoles están medidos como la cantidad equivalente de ácido gálico.

3.3.2. Método TEAC

Se utiliza el método espectrofotométrico TEAC para determinar la capacidad antioxidante de las muestras.

Este método se basa en la captación de los radicales ABTS⁺ por los antioxidantes. El ABTS⁺ tiene un color verde-azul, y a medida que disminuye la concentración de éste la solución pierde su color. La inhibición del color es proporcional a la capacidad antioxidante de la muestra.

Se mide el porcentaje de inhibición del color y, a partir de la recta de calibrado se calcula la capacidad antioxidantes en equivalentes de Trólox, un polifenol.

Material

- Baño de calor y termómetro
- Cubetas de plástico
- Micropipeta i puntas 10 a 100 µL
- Micropipeta i puntas de 1 a 5 mL.
- Espectrofotómetro UV-Visible (HP . 8453)
- Gradilla para las cubetas

Reactivos

- Solución radical 2,2'-azino-bis (ABTS) 7mM.
- Solución persulfato de potasio 2.45 mM a pH 7.4.

Procedimiento

1. Preparar disoluciones 1/50 con el disolvente utilizado para las extracciones de pétalos.
2. Preparar una gradilla con las cubetas necesarias. Debe hacerse por duplicado (para observar su reproducibilidad) y ha de haber la solución de trabajo al principio, en el medio y al final:

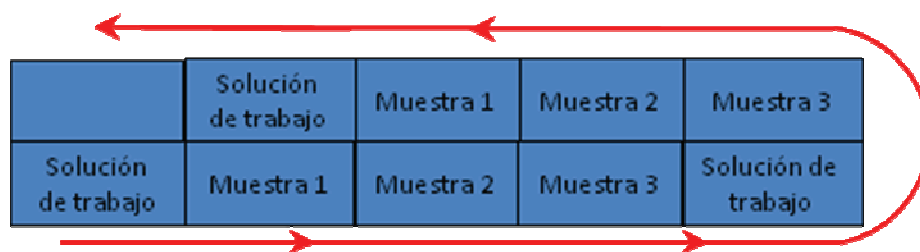


Figura 9. Ejemplo de la gradilla para realizar el método TEAC

3. Preparar la solución de trabajo, mezcla del radical ABTS con PBS. Leer esta solución con una longitud de onda de 734nm. Esta solución ha de tener una concentración tal que $Abs = 0,73 \pm 0,01$.
4. Termostatar a 30°C
5. Poner 2 mL de la solución de trabajo en todas las cubetas
6. Medir la absorbancia de todas las cubetas a tiempo cero (t_0) a 734nm.
7. Añadir 20 μ L de la disolución (punto 1) en su correspondiente cubeta.
8. Agitar y a los 5 minutos de la adición de la primera disolución (t_5) se mide la absorbancia.

Obtendremos unos valores de absorbancia, que se han de equiparar con equivalentes de Trólox para poder saber su capacidad antioxidante, para ellos disponemos de una recta de calibrado.

Cálculos

Se dispone de una recta de calibrado para esta método. Ésta se realizó con Trólox en diferentes concentraciones, luego se leyó su absorbancia a 734 nm.

Con la recta de calibrado realizada, se busca la fórmula de la recta:

$$y = 0,0507x + 0,1465, R^2 = 0,990 \quad (3)$$

x = Valor de la capacidad antioxidante expresado en equivalentes de Trólox.

y = valor de la absorbancia

Fórmula para la obtención de los equivalentes en Trólox

$$x = \frac{y + 0,1465}{0,0507} \quad (4)$$

La x nos da la capacidad antioxidante en equivalentes a Trólox. Se ha de realizar diferentes factores de conversión, que son:

1. Calcular el % de inhibición, que es el promedio de la absorbancia leída de cada disolución de la extracción.
2. El % de inhibición corresponde al valor 'y' de la ecuación 3 de calibrado.
3. Obtenemos los equivalentes de Trólox para la muestra, se multiplica este valor por la disolución utilizada.
4. Dividir este valor final por la masa introducida de la muestra en el momento de hacer la extracción

Este resultado es el de la capacidad antioxidante equivalentes en Trólox.

3.3.3. Método ORAC

El método ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity) se basa en la inhibición del radical peroxil oxidativo inducido por descomposición térmica de compuestos azo (AAPH).

La protección del antioxidante se mide a partir del área de fluoresceína debajo de la curva (AUC) de la muestra en comparación con la AUC del blanco, en la que el antioxidante no está presente. El AUC se calcula:

$$AUC = \left((i_1 + i_{65}) \cdot 2 + \left(\sum_{i=1}^{i=65} \frac{f_i}{f_1} \right) \right) \quad (5)$$

Donde:

i: número de ciclos

f: unidades de fluoresceína

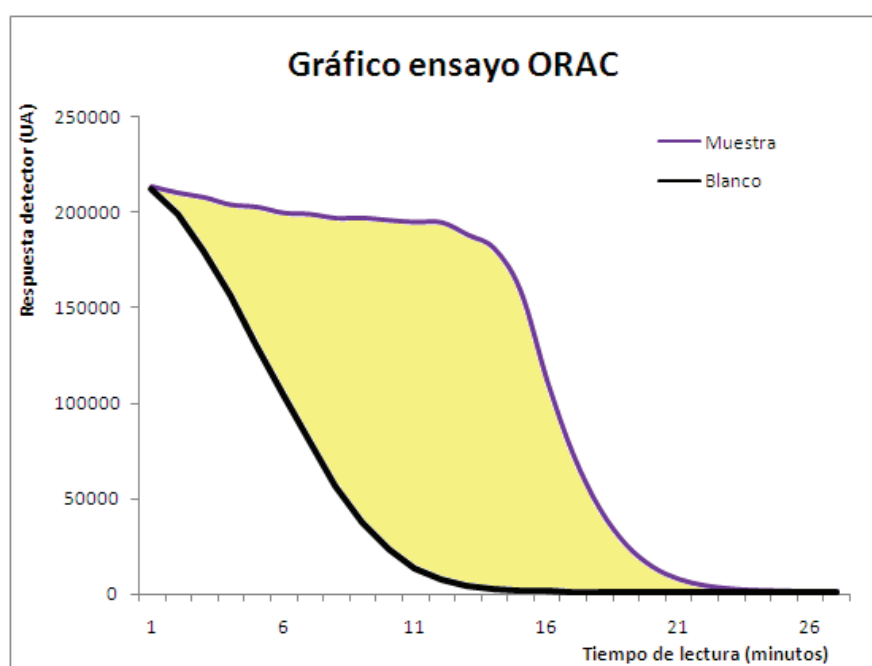


Figura 10. Ejemplo del área que se ha de calcular para el ORAC

Material



- Fluorímetro de placa (BMG LABTECH FluorStar Omega)
- Eppendorfs
- Pipetas y puntas
- Pipeta Multicanal

Reactivos

- Trólox 97%
- PBS
- AAPH
- Fluoresceína
- Agua Milli-Q.

Preparación de las disoluciones necesarias:

- PBS
 - Disolver un sobre del reactivo en 750 mL de agua Milli-Q
 - Etiquetar y guardar en nevera

- Fluoresceína:
 - Preparar la disolución diariamente de manera que la concentración final en el pocillo se de 80 μM .²
- Trólox Madre (0,5 μM)
 - Pesar 0,0124g de Trólox comercial
 - Aforar a 100 mL con tampón PBS 75 μM
 - Dividir en eppendorffs de 2 mL
 - Guardar a -80°C hasta su uso
- Trólox patrones
 - Descongelar un eppendorff con la disolución madre
 - En eppendorffs de 1,5 ml preparar los patrones.

Tabla 3. Volúmenes utilizados para calcular los patrones de Trólox

Nomenclatura	Concentración patrón	Volumen Trólox madre (μL)	Volumen PBS (μL)
T20	20	60	1440
T40	40	120	1380
T100	100	300	1200
T150	150	450	1050

² La solución de fluoresceína se prepara disolviendo 2 mg de reactivo en 100ml de PBS 75 mM (pH 7,0). La segunda disolución stock se prepara diariamente a partir de una dilución 1/10 de la primera solución en PBS 75 mM. Se prepara una tercera solución fluoresceína (preparación diaria), de la que se añaden 120 microlitros/pocillo a la placa obteniendo una concentración final por pocillo de 80 nM.

- AAPH
 - Esta disolución se ha de prepara justo antes de ser utilizada
 - Pesar en un vial 0,4068 g de reactivo AAPH
 - Añadir 5mL de tampón PBS

Procedimiento

Primero rellenar la placa con las muestras y los blancos correspondientes (40 μ L).

En este ejemplo se indica una manera de colocarlos, lo mejor es que es que los blancos y patrones no estén en la misma columna, dado que el fluorímetro lee por columnas, y si hubiera algún error en esa columna al añadir cualquiera de los reactivos con la pipeta multicanal no se podría ver si hay reproducibilidad.



Figura 11. Placa usada en el ORAC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bl1	Bl2	T20	T40	T100	T150						
B												
C												
D												
E							Bl1	Bl2	T20	T40	T100	T150
F												
G												
H							T150	T100	T40	T20	Bl2	Bl1

Figura 12. Ejemplo de cómo poner los blancos en una placa

Disoluciones:

- Realizar una primera prueba para ver cuál será la mejor disolución. Empezar con 1/100.
- Observar como los resultados en el tiempo establecido, han llegado a cero si no es así, diluir más.
- En nuestro caso utilizamos una disolución 1/300 (1/100 con PBS i la 2ª 1/3 con agua)

Uso del fluorímetro:

- El fluorímetro está controlado por ordenador.
- La temperatura del fluorímetro ha de ser de 37 °C.
- Pesar los gramos de AAPH y el PBS necesarios, reservar
- Añadir 120 µL de la solución de fluoresceína a cada pocillo con la pipeta multicanal.
- Preincubar la placa a 37°C durante 10 minutos
- Realizar la lectura a t=0
- Preparar el APPH con el PBS. Agitar para disolver completamente.
- Retirar la placa del fluorímetro y añadir rápidamente 40 µL del APPH+PBS a cada pocillo con a pipeta multicanal.
- Leer durante 120 minutos (65 ciclos, lectura cada 2 minutos aproximadamente)

Cálculos

Obtenemos una tabla con todas las lecturas, esta se ha de tratar para poder obtener el valor de la capacidad antioxidante.

1. Calcular el AUC de todos los pocillos.

$$AUC = \left((i_1 + i_{65}) \cdot 2 + \left(\sum_{i=1}^{i=65} \frac{f_i}{f_1} \right) \right) \quad (5)$$

2. Restar el AUC de las muestras de Trólox del AUC del blanco 1 (AUC T'), y AUC de las muestras de pétalos del AUC del blanco 2 (AUC M').

$$AUC T' = AUC Trólox - AUC blanco 1 \quad (6)$$

$$AUC M' = AUC Trólox - AUC blanco 2 \quad (7)$$

3. Dividir AUC M' por la masa introducida de la muestra en el momento de hacer la extracción

$$AUC\ M'' = \frac{AUC\ M'}{Masa\ pétalos} \quad (8)$$

4. Realizar nuestra recta de calibrado con los resultados AUC T'.
5. Utilizar el valor de la recta de calibrado donde X será la capacidad antioxidante y Y será el valor de AUC M''.
6. Una vez obtenida la capacidad antioxidante total se ha de multiplicar por la dilución utilizada en el proceso.
7. Para finalizar realizar el promedio de las muestras que se hayan hecho por duplicado y/o triplicado.

Capítulo 4:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización método extracción

La prueba que se realiza para determinarlo es con el método Folin. Se empieza abarcando todas las posibilidades, todos los disolventes y todas las extracciones.

Se utilizan pétalos de rosas blancas para realizar esta prueba, dado que tenemos más cantidad de esta muestra que de las demás.

Los resultados de esta parte se indican en la figura siguiente:

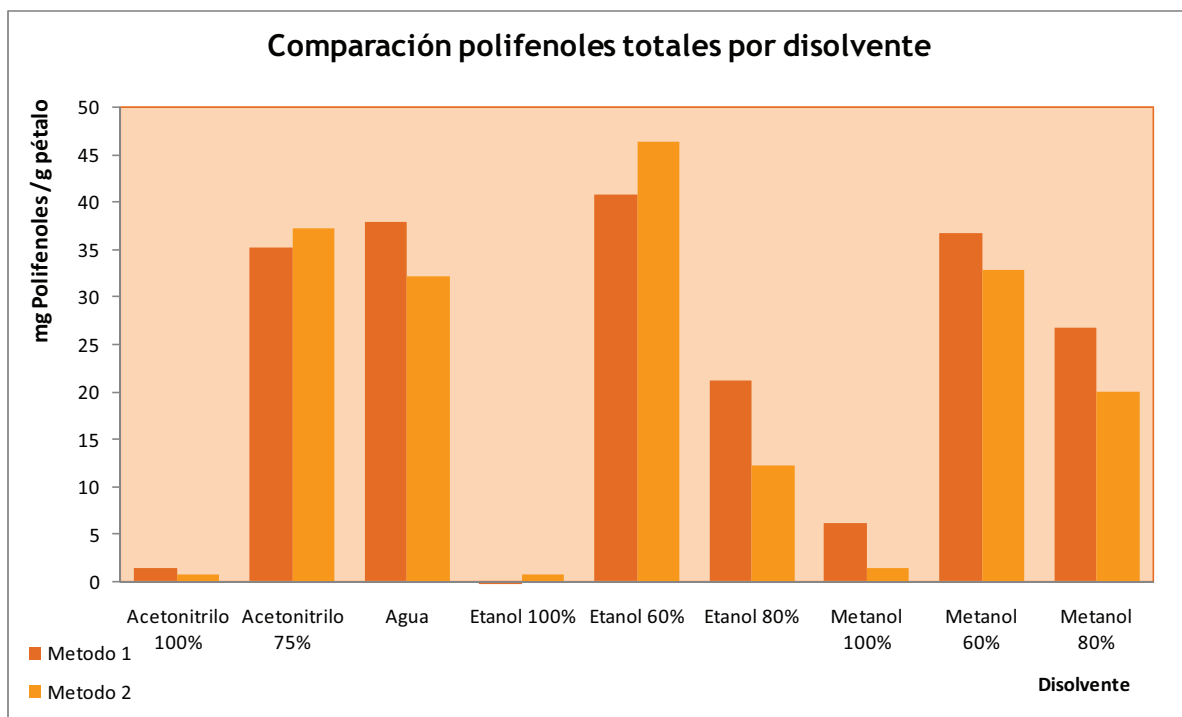


Figura 13. Comparación polifenoles totales en cada disolvente y con los dos métodos

Como se puede observar en el gráfico se extraen más polifenoles con el agua, el Acetonitrilo, el metanol del 60% y etanol del 60%.

Se puede explicar que la extracción sea más efectiva en agua (o disoluciones con gran contenido de ella) que en disolventes orgánicos por la estructura de los polifenoles. Éstas moléculas tienen un número elevado de grupos OH, con gran afinidad con el agua debido a que son muy buenos formadores de puentes de hidrógeno. Además los polifenoles son levemente ácidos y esta condición los hace especialmente afines al agua.

Por ello se repite el mismo experimento pero con agua, Acetonitrilo 75% y etanol 60%. Descartamos el metanol al 60% porque da menos cantidad que los demás. Se realiza cada muestra por triplicado y en el método Folin como siempre, por duplicado.

Además, se decide optimizar ambos métodos variando algunos procedimientos; se amplía el tiempo en el polýtron a 2 minutos.

Con estas variaciones, los resultados se detallan en la figura siguiente.

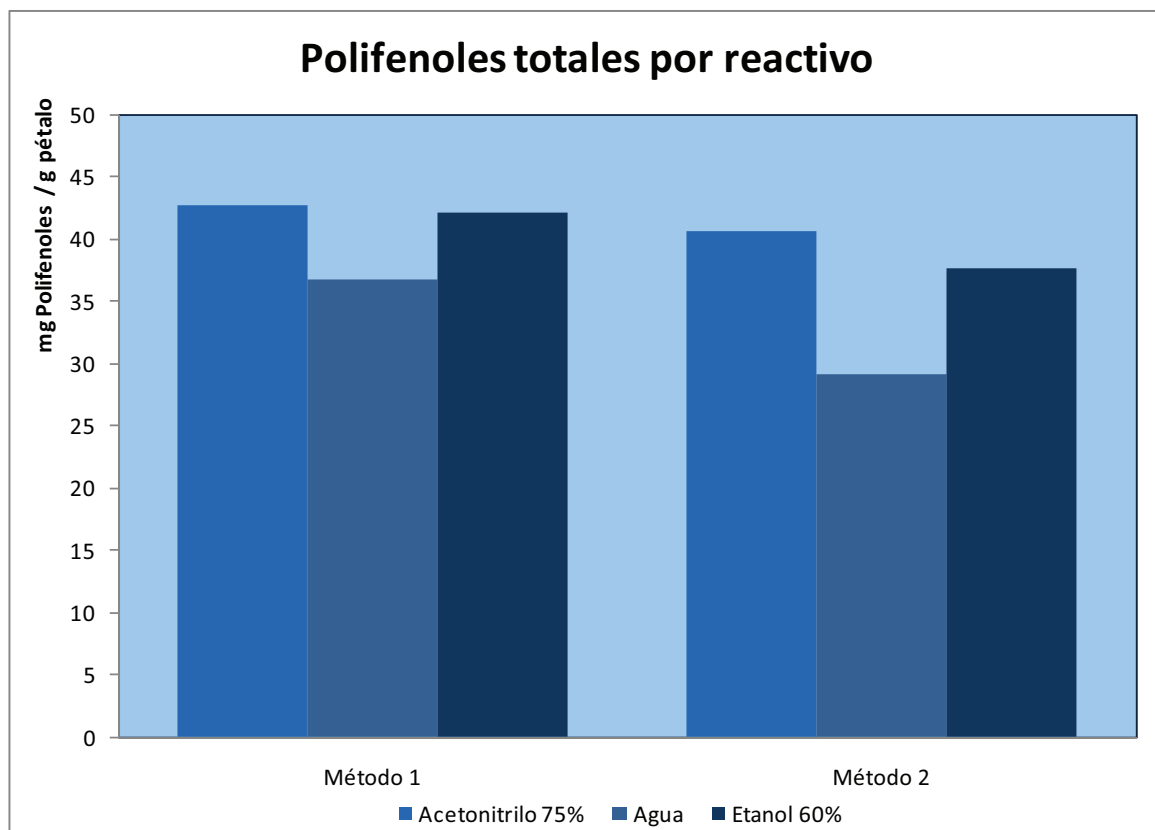


Figura 14. Comparación polifenoles totales con cada reactivo y con los dos métodos

Observamos claramente que el disolvente que más polifenoles extrae es el etanol al 60%. La naturaleza aromática de los polifenoles nos indica que el extractante ideal ha de combinar la capacidad para formar puente de hidrogeno y ciertas interacciones hidrofóbicas.

Una nueva variación para optimizar el método y ahorrar tiempo será no utilizar el ultrasonido en el método 1 (agitación) y no triturar los pétalos en el método 2 (polytron).

Para la siguiente optimización del método solo se realizará con el etanol al 60%.

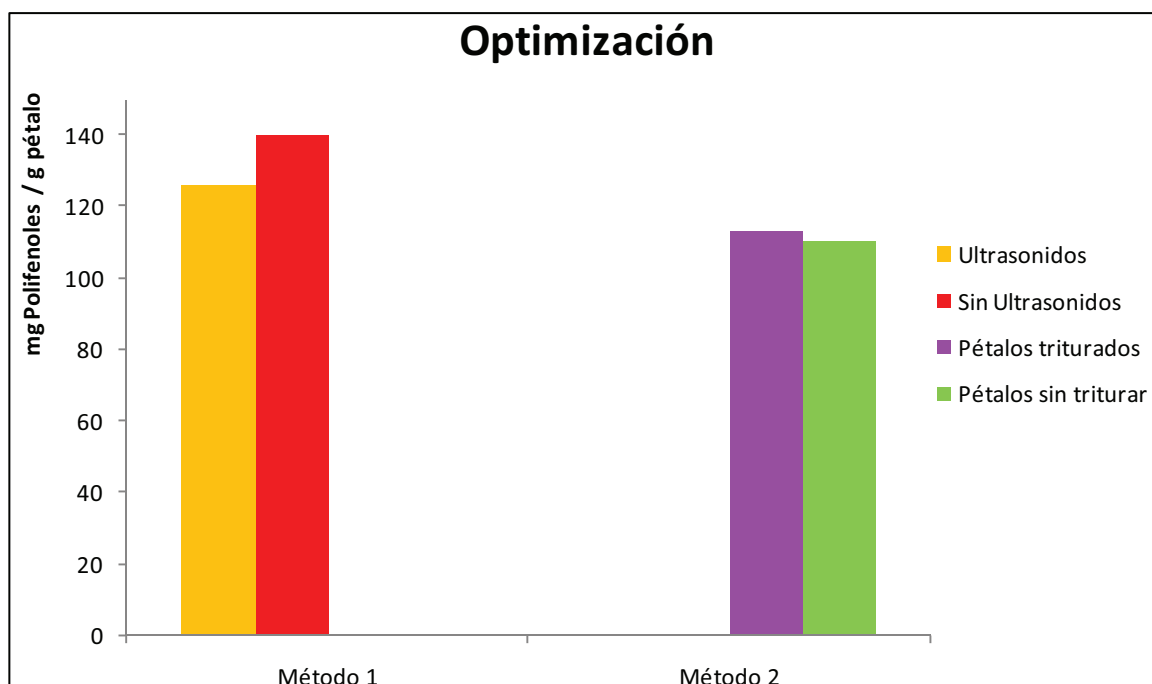


Figura 15. Optimización del método

Como se puede observar el método 1 extrae más polifenoles con ultrasonidos y el método 2 con los pétalos triturados. Además sigue siendo más eficaz el método 1.

Una evaluación de la cantidad de polifenoles qué se recogen en cada operación de extracción ofrece los resultados de las figuras siguientes.

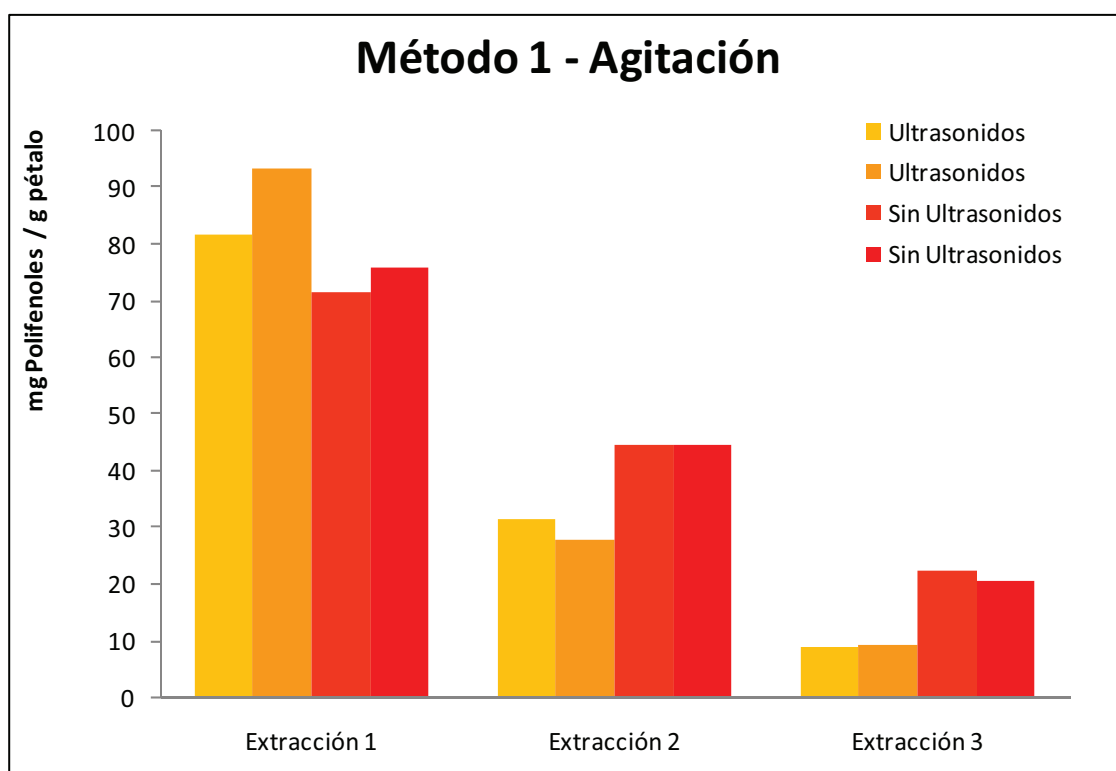


Figura 16. Comparación polifenoles totales método 1 con y sin ultrasonidos

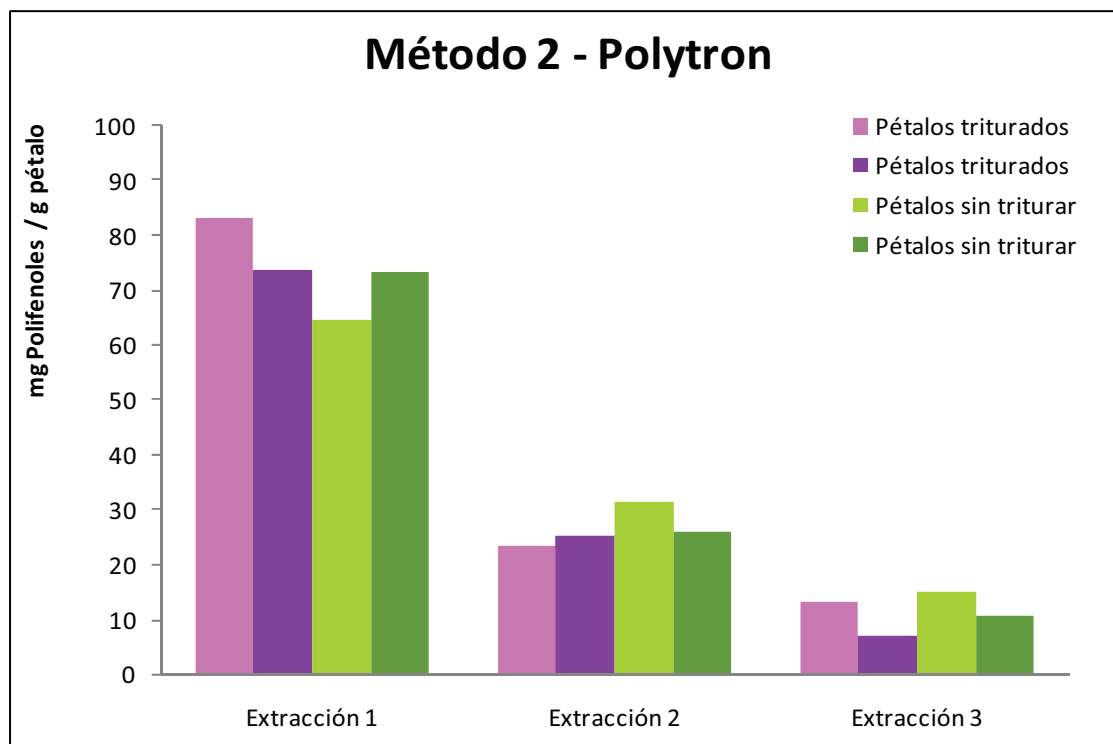


Figura 17. Comparación polifenoles totales método 2 con los pétalos triturados y sin triturar

Se advierte que con únicamente una extracción se recogen prácticamente todos los polifenoles. Por ello a partir de ahora solo se realizará una extracción. Otra vez esto es explicable por la alta afinidad de los polifenoles con el etanol al 60%.

Visto que hay diferentes tipos de variables que pueden afectar a la extracción de los polifenoles se dispone a realizar un método experimental para abarcar todas las posibilidades.

4.2. Método experimental

Los cambios que vamos a realizar son el tiempo de agitación y la concentración del disolvente. Como hemos observado anteriormente, no es necesario realizar las tres extracciones, pues en la segunda y en la tercera prácticamente no se extrae; el ultrasonidos se sigue utilizando dado que con él extraemos más polifenoles. Hemos visto que los mejores disolventes son el etanol y el Acetonitrilo pero a diluciones elevadas. Respecto al tiempo, analizamos cual puede ser el mínimo necesario y en el tiempo más alto para extraer. Por ello realizamos el método experimental con estas concentraciones y estos tiempos:

Tabla 4. Datos para el estudio experimental

Reactivo	Concentración	Tiempo	Reactivo	Concentración	Tiempo
Etanol	20%	10 min.	Acetonitrilo	20%	10 min.
		50 min.			50 min.
		90 min.			90 min.
	40%	10 min.		47,50%	10 min.
		50 min.			50 min.
		90 min.			90 min.
	60%	10 min.		75%	10 min.
		50 min.			50 min.
		90 min.			90 min.

Utilizando el programa Minitab generaremos una figura como la siguiente, donde se representa la superficie experimental de la investigación.

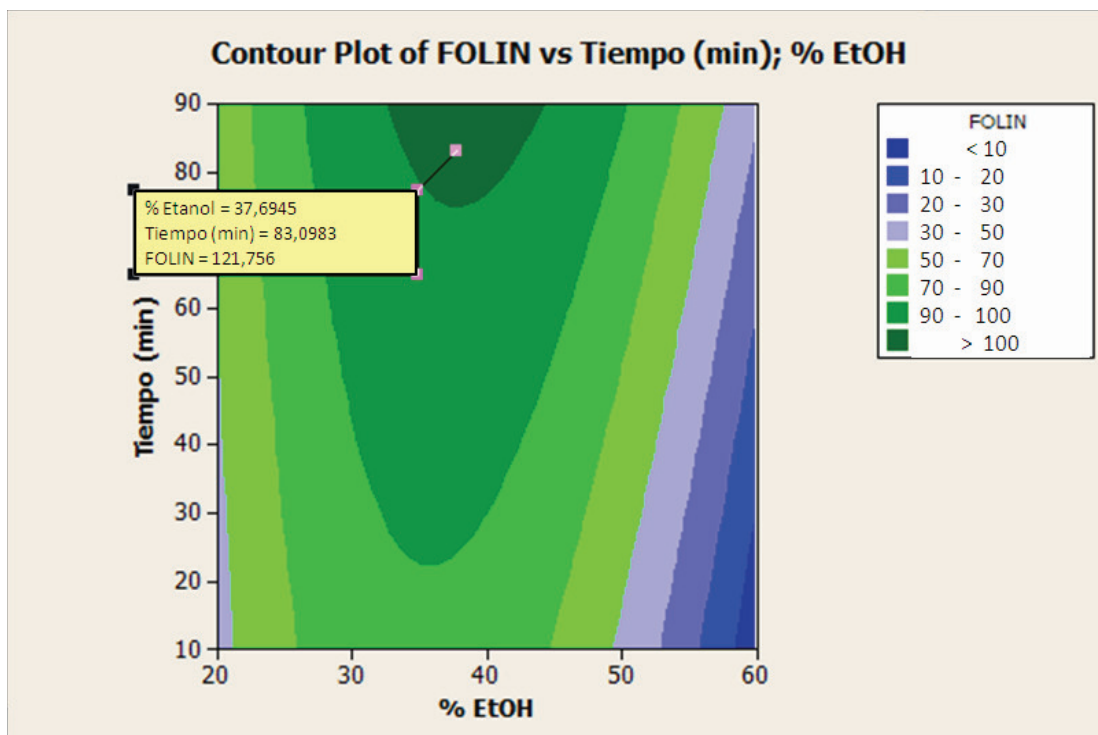


Figura 18. Estudio de la evolución de los polifenoles totales respecto a la concentración de etanol y el tiempo

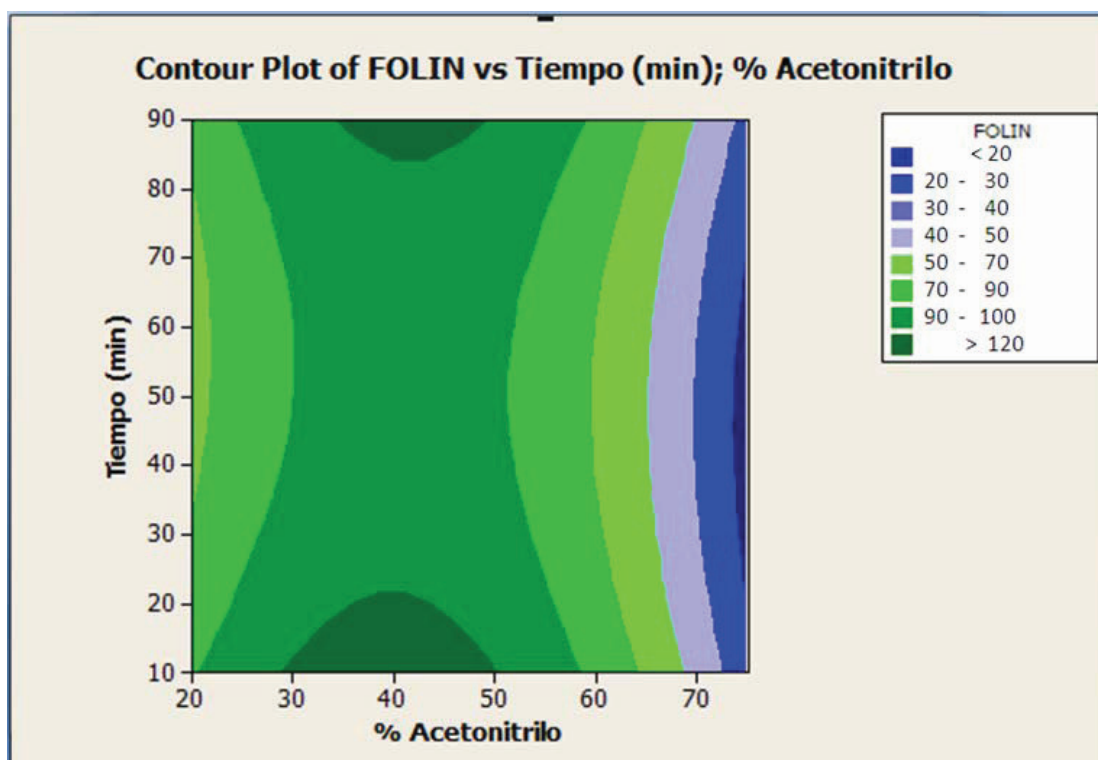


Figura 19. Estudio de la evolución de los polifenoles totales respecto a la concentración de acetonitrilo y el tiempo

Dado que los máximos de extracción en el etanol y el acetonitrilo son muy parecidos se escoge final mente seguir con el proyecto con el etanol dado que tiene una toxicidad muy inferior al del acetonitrilo.

La aplicación de este método experimental combinado con las superficies experimentales nos ha servido para optimizar la composición del disolvente extractante junto con el tiempo de extracción más adecuado, que es 40% etanol y un tiempo de agitación de 80 minutos.

4.3. Resultados Folin – TEAC – ORAC

Tras estas conclusiones se realiza el estudio con diferentes tipos de pétalos, para determinar si influye el tipo de planta y el color de los pétalos de estas en su capacidad antioxidante.

Los pétalos utilizados han sido:

- Pétalos del pensamiento: blancos, amarillo, naranja, granate, azul claro y azul oscuro
- Pétalos de rosas: blanco, amarillo, roja, rosa claro y rosa oscuro
- Pétalos de margarita: blancos y amarillos
- Pétalos de clavel: rojos

Los resultados del ensayo Folin son:

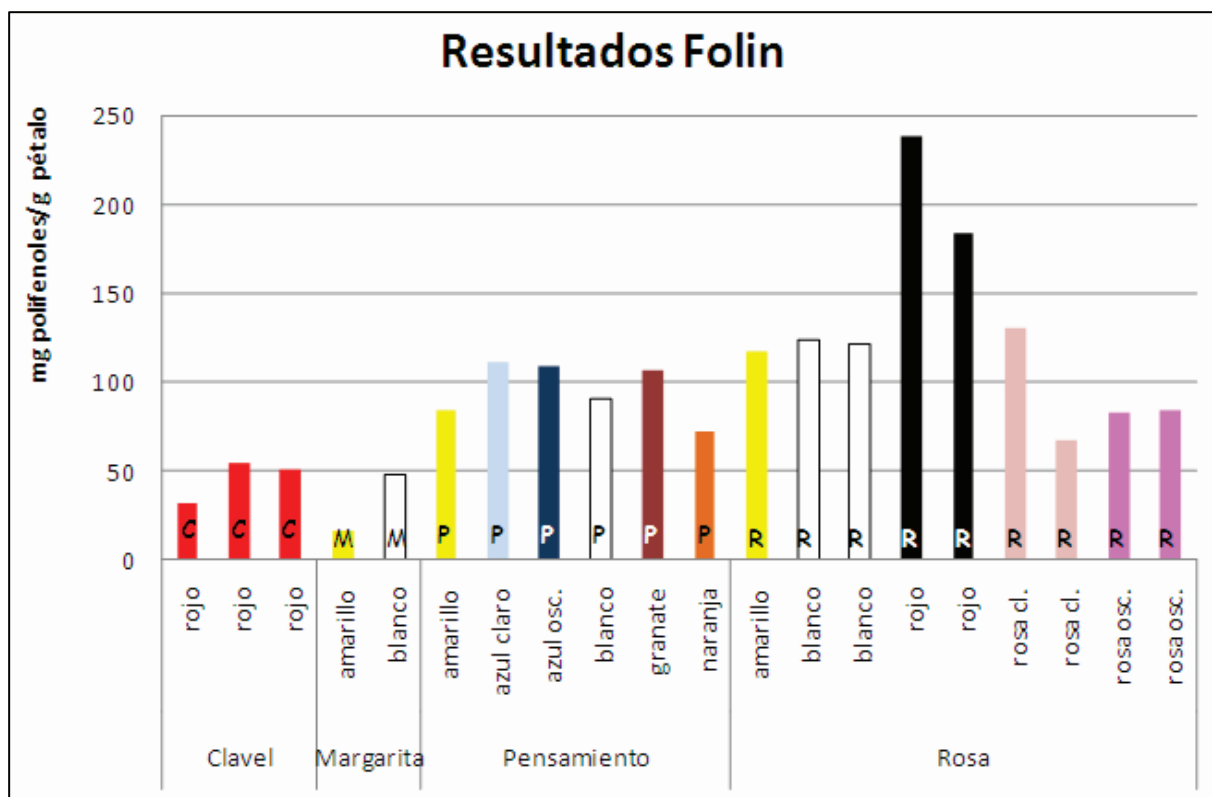


Figura 20. Resultados Folin

La mayor parte de las flores dan una concentración de polifenoles totales entre 20 y 120 mg/g pétalo (evaluados como ácido gálico). Hay dos resultados que son inesperados en comparación con el resto (los negros).

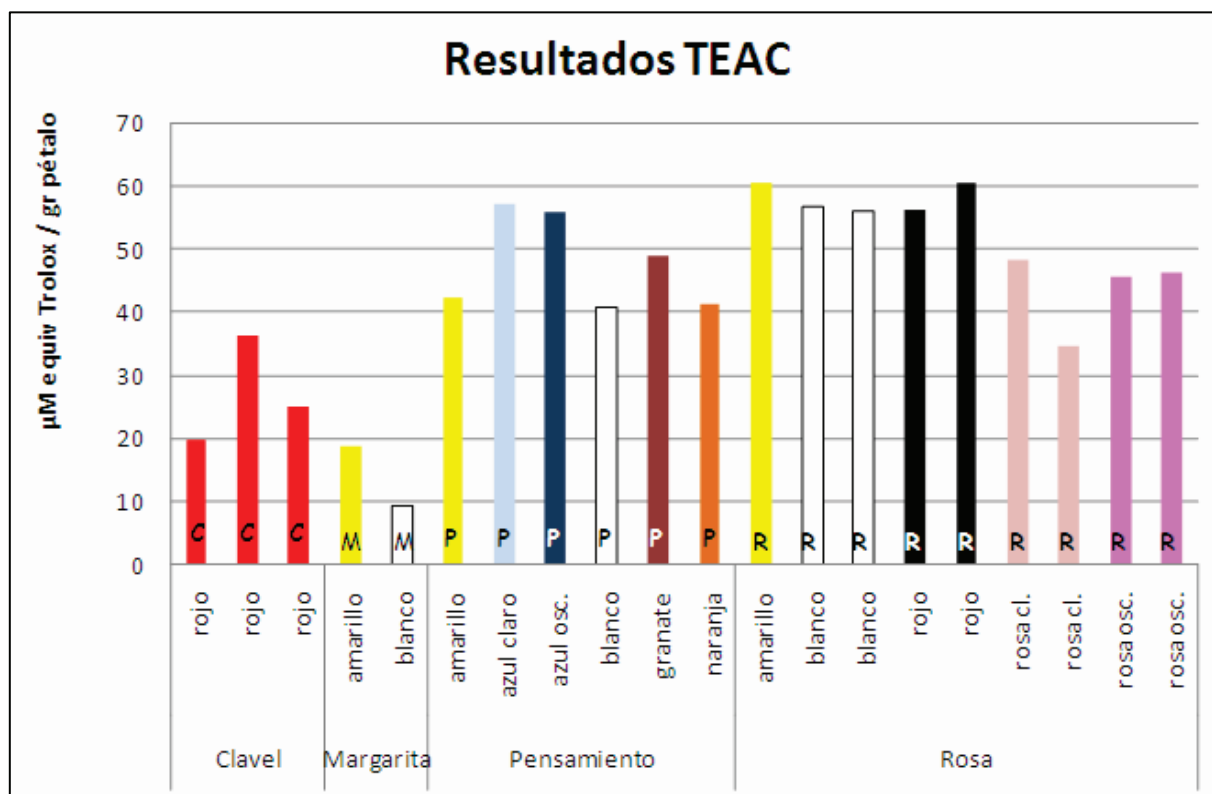


Figura 21. Resultados TEAC

La capacidad antioxidante obtenida mediante el ensayo TEAC varían entre 10 y 60 μM equivalentes de Trólox por gramo de pétalo. Se han marcado en negro los resultados poco fiables que, más adelante, mediante un análisis estadístico riguroso se demostrará que estos valores no deben considerarse.

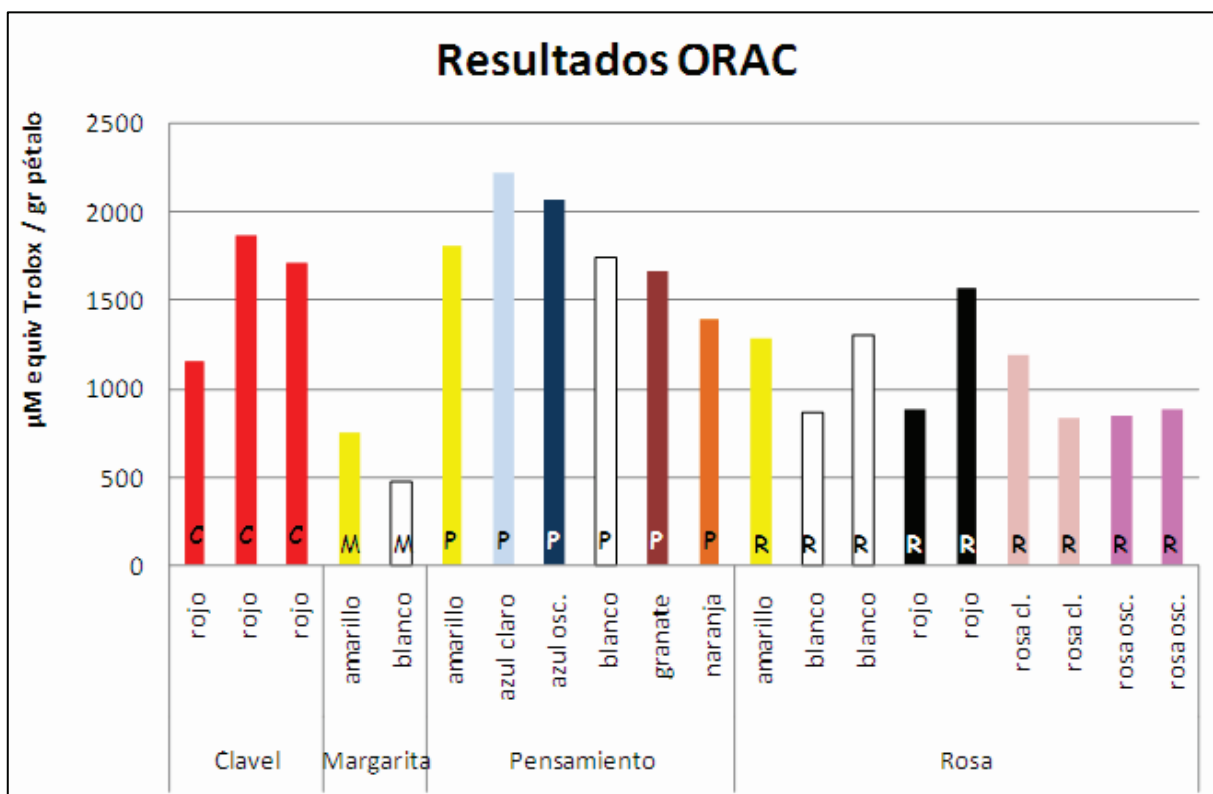


Figura 22. Resultados ORAC (promedio de las 3 placas)³

Los valores del ORAC a pesar de medir “en teoría” las mismas unidades que el TEAC (equivalentes de Trólox) dan valores muchos más elevados, entre 500 y 2000 μM equivalentes de Trólox por gramo de pétalo.

Tal como han descrito otros investigadores (Teow, C.C. et al., 2007), el TEAC mide fundamentalmente la capacidad antioxidante de polifenoles, mientras que el ORAC es capaz de detectar la capacidad antioxidante de muchos otros compuestos (flavonoides, betacarotenos e incluso iones metálicos) además de los polifenoles.

Si comparamos los resultados de los tres gráficos, se aprecia una cierta correlación en casi todos los casos. La cantidad de más o menos polifenoles y/o equivalentes en Trólox es similar, por ejemplo dentro de las rosas rosas, el valor de la primera es más alto que en el de la segunda y luego vuelven a incrementarse.

³ Se realizan 3 placas diferentes porque es un método muy sensible, se pueden comparar y ver si tienen correlación los diferentes resultados dentro de las repeticiones de la misma placa y con las otras

Por ello estudiamos si realmente hay correlación matemática entre los diferentes métodos.

A continuación tenemos los valores numéricos de los ensayos:

Taula 5. Resultados numéricos.

Tipo	Color	FOLIN	TEAC	ORAC
Clavel	rojo	32,13	56,62	865,88
	rojo	53,84	19,56	1150,75
	rojo	51,04	56,00	883,29
Margarita	amarillo	15,98	36,26	1867,47
	blanco	47,33	9,17	472,62
Pensamiento	amarillo	84,42	18,68	746,38
	azul claro	110,68	55,94	1305,80
	azul osc.	109,17	60,56	1563,64
	blanco	90,62	48,13	1184,77
	granate	106,48	60,52	1285,40
	naranja	71,87	34,70	837,19
Rosa	amarillo	116,67	45,56	841,88
	blanco	123,40	46,36	878,45
	blanco	120,76	25,08	1706,38
	rojo	238,82	42,19	1800,51
	rojo	183,99	57,10	2223,69
	rosa cl.	130,50	55,84	2067,04
	rosa cl.	66,79	40,58	1743,38
	rosa osc.	82,91	48,90	1663,86
	rosa osc.	83,65	41,27	1389,32

4.4. Estadística correlativa entre los ensayos

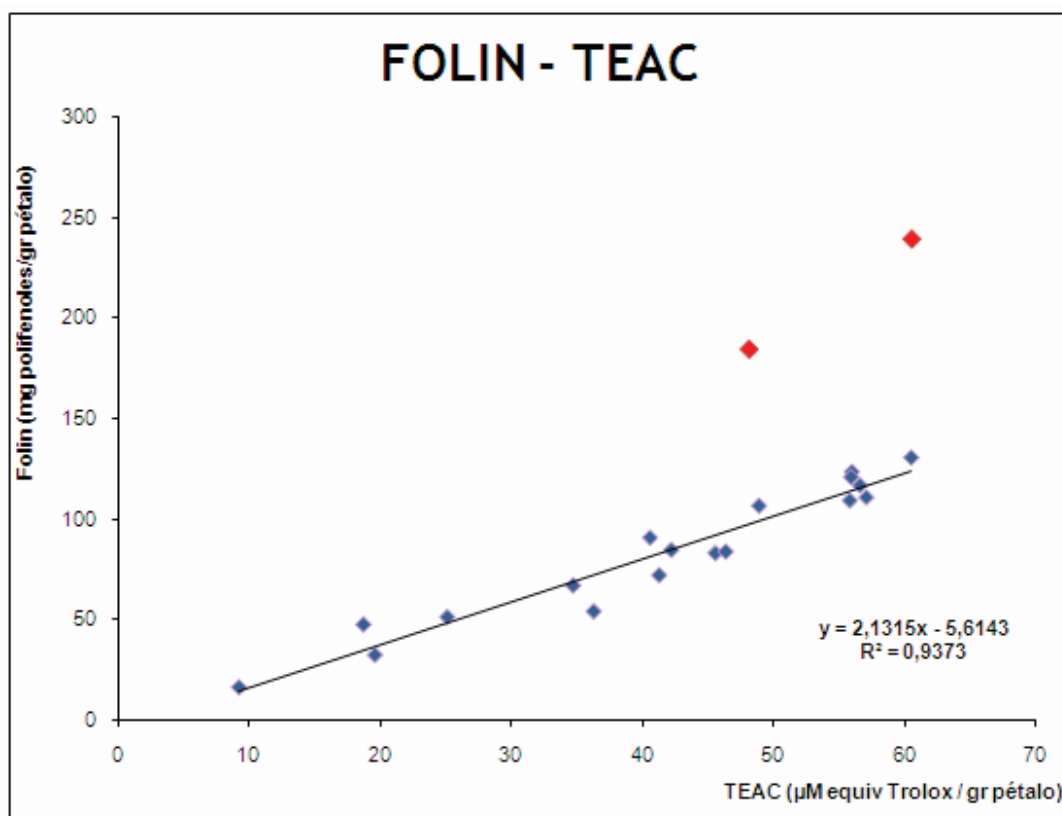


Figura 23. Resultados Folin-TEAC

Inicialmente observamos que la correlación Folin-TEAC se acerca mucho a una línea recta si descartamos los dos puntos correspondientes a dos rosas rojas. Esta correlación tiene una cierta lógica dado que miden lo mismo, el Folin los mg polifenoles y el TEAC la actividad antioxidante en μM equivalentes de Trólox pero éste método solo evalúa la cantidad de polifenoles.

A partir de ahora se eliminarán los puntos señalados, dado que ya queda demostrado que no son estadísticamente significativos.

En las dos gráficas siguientes ORAC-Folin, ORAC-TEAC no existe ningún tipo de correlación entre polifenoles totales y capacidad antioxidante. Lo que nos indica que el ORAC mide la capacidad antioxidante de muchos compuestos, no solo de los polifenoles.

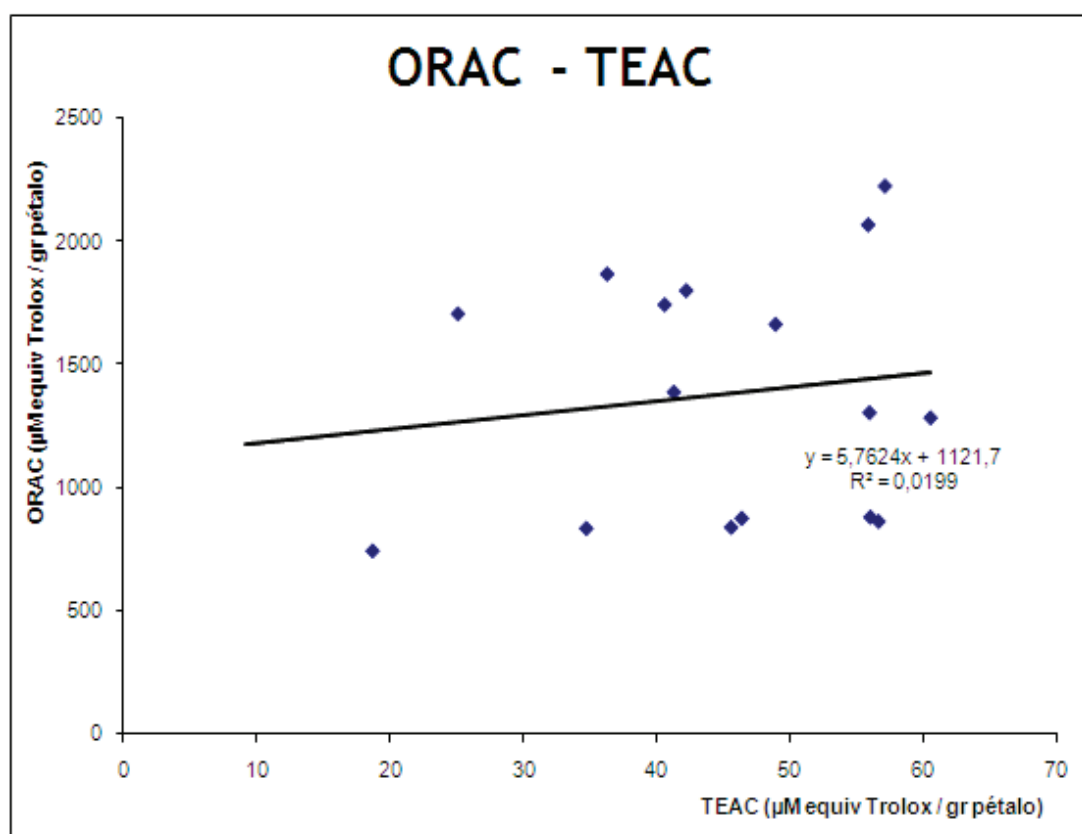


Figura 24. Resultados ORAC-Folin

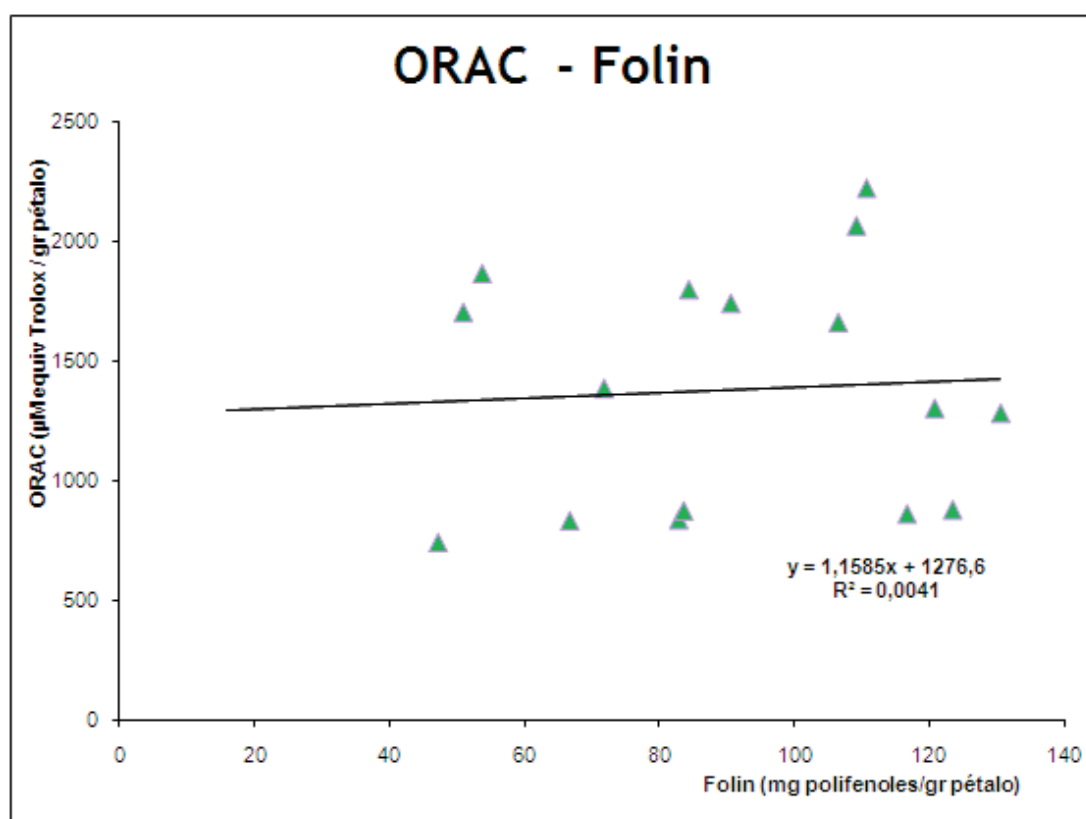


Figura 25. Resultados ORAC-TEAC

Para evaluar si efectivamente hay correlación pero ahora entre los distintos tipos de flores buscaremos la significación para cada especie en particular.

Por tipo de Planta

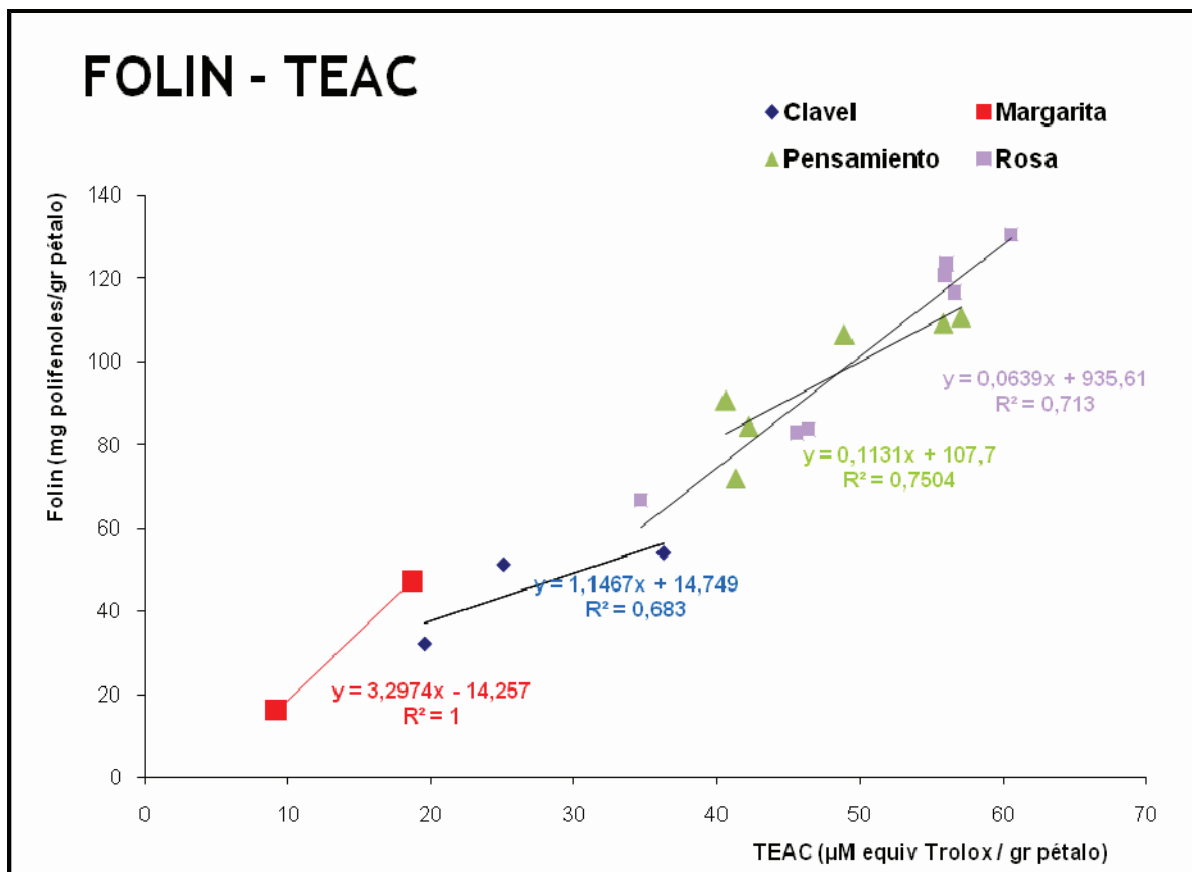


Figura 25. Resultados Folin-TEAC por planta

Como es de esperar la correlación por plantas TEAC-Folin sigue siendo muy buena

Cuando representamos los resultados de los ensayos ORAC-Folin y ORAC-TEAC para cada tipo de planta observamos que ahora si hay una correlación elevada.

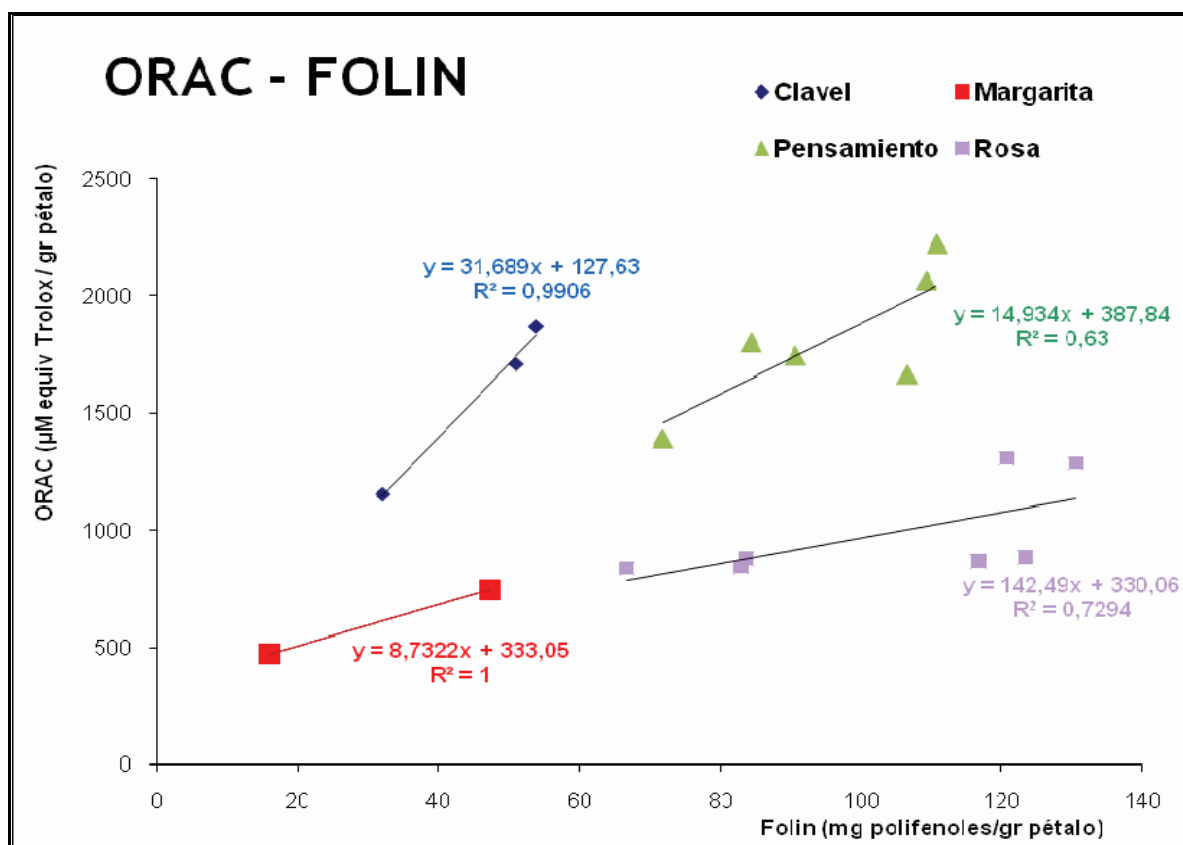


Figura 26. Resultados ORAC-Folin por planta

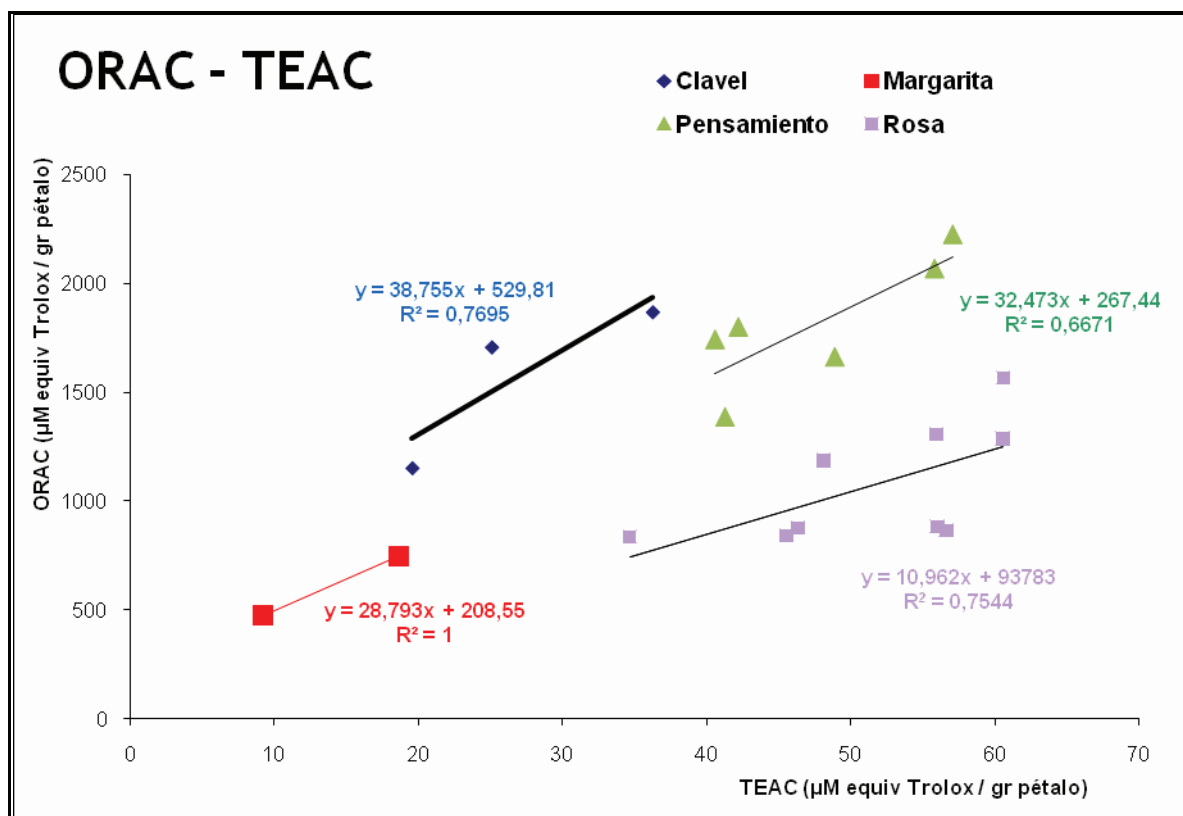


Figura 27. Resultados ORAC-TEAC por planta

Esto debe tener un significado científico basado en los compuestos antioxidantes y presentes en cada tipo de flor. Según datos de la bibliografía los flavonoides y los beta-carotenos (Teow, C.C. et al.,2007) son también antioxidantes aunque difíciles de medir con el ensayo TEAC y no medibles con el ensayo Folin. En cambio, el ORAC los detecta perfectamente; como cada tipo de flor tiene su propia composición antioxidante totales (polifenoles, flavonoides, beta-carotenos...) la correlación dentro de su propia especie es lógica y no necesariamente tiene que coincidir con otras plantas.

Por Colores

Finalmente se ha intentado estudiar la correlación entre los diferentes colores sin tener en cuenta de que tipo de planta provienen. El resultado que se representa en las figuras X, Y y Z no es en absoluto significativo, y por ello podemos descartar una correlación entre los distintos colores.

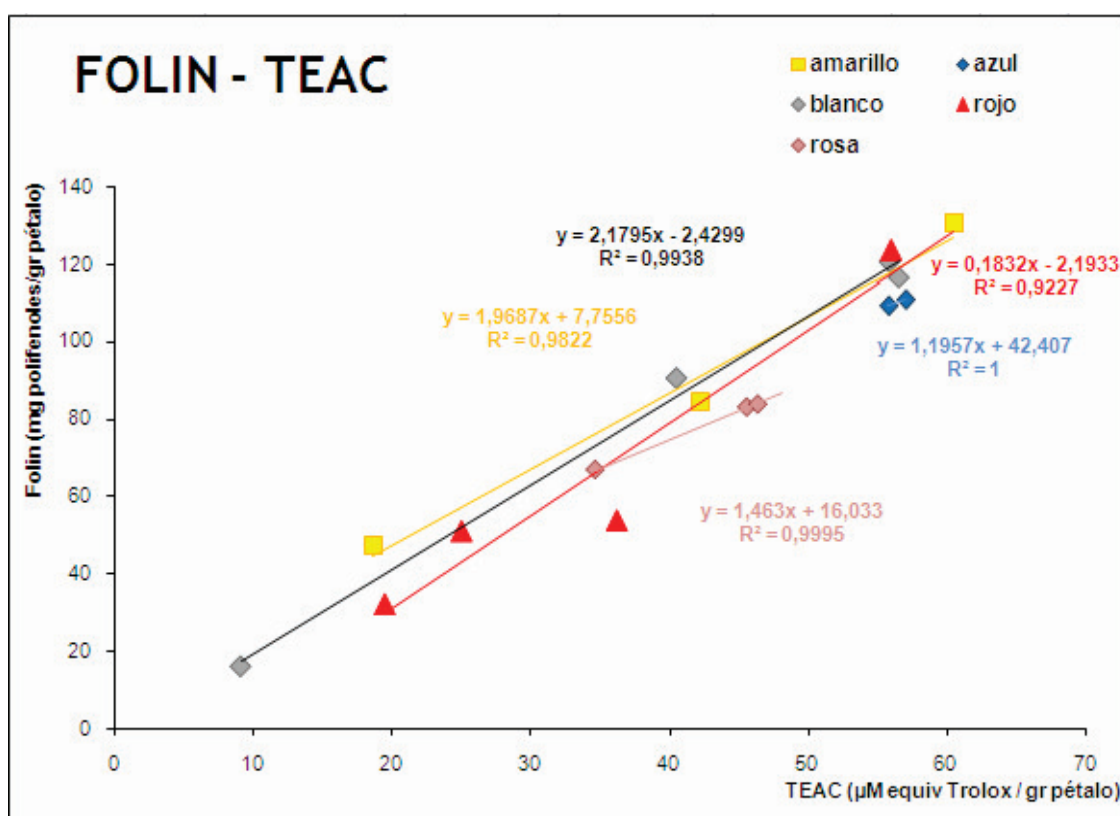


Figura 28. Resultados Folin-TEAC por color

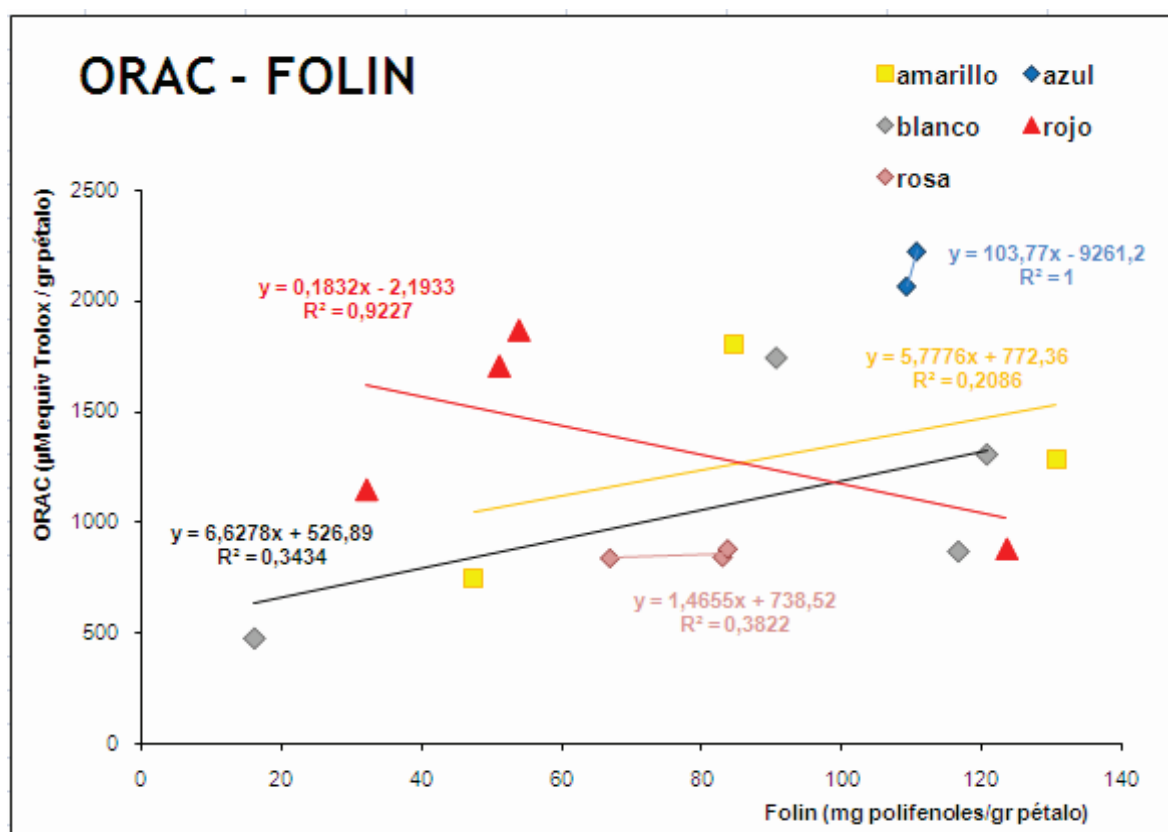


Figura 29. Resultados ORAC-Folin por color

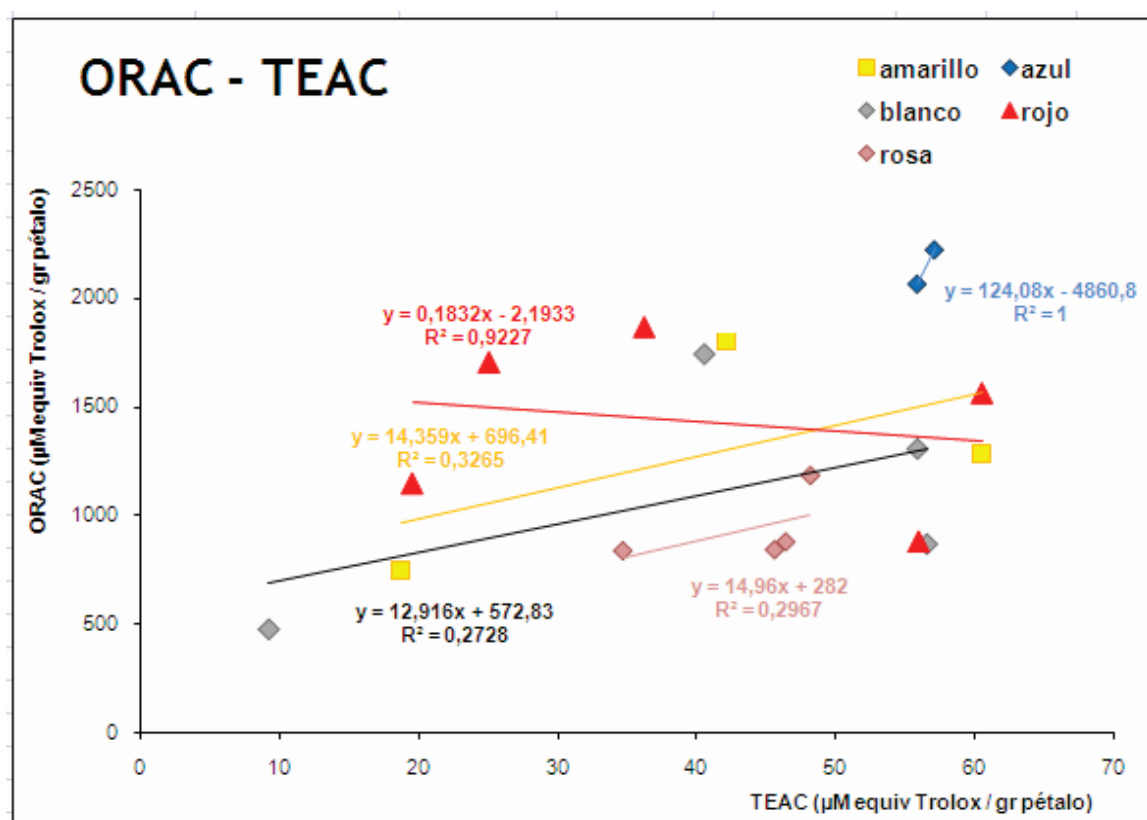


Figura 30. Resultados ORAC-TEAC por color