



Universidad Veracruzana

Instituto De Ciencias Básicas

**Desarrollo y evaluación de un sistema
lipofilizado con antioxidantes
naturales**

Tesis

**Para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias Alimentarias**

Presenta:

IIA. José Erick Ortega Valencia

Director de Tesis:

Dra. Maribel Jiménez Fernández

Dr. Oscar García Barradas

DEPENDENCIAS PARTICIPANTES:

Instituto de Ciencias Básicas

**Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica
(SARA) Universidad Veracruzana**

**Xalapa de Enríquez, Veracruz, México
Octubre, 2016**



La presente tesis titulada

“Desarrollo y Evaluación de un sistema lipofilizado con antioxidantes naturales”,

Realizada por el

I.I.A. JOSÉ ERICK ORTEGA VALENCIA

Ha sido aprobada por el comité de evaluación de tesis, y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

Maestro en Ciencias Alimentarias

Otorgando su autorización como jurado para ser presentada y defendida oralmente el 24 de octubre de 2016.

Dr. Cesar Ignacio Beristain Guevara

Dra. María Remedios Mendoza López

Dra. Luz Alicia Pascual Pineda

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis a mis padres, José Facundo Ortega Ortiz y Mariana Valencia Cruz; a mis hermanas Jessica Ortega Valencia y Jazmín Ortega Valencia; a mi prometida Jaqueline Stephanie Ley Martínez, por que en todo momento han estado conmigo apoyándome y animándome.

A dios por que en todo momento ha estado a mi lado y nunca me ha dejado solo, por escucharme cuando necesito su ayuda y por que me ha mostrado el camino correcto en todo momento.

“El éxito en la vida no se mide por lo que logras, si no por todos los obstáculos que superas”

AGRADECIMIENTOS

No tengo palabras para agradecer a todas las personas que me han apoyado en todo momento, es por eso que pido disculpas si dejo a alguien sin nombrar.

Antes que nada quiero agradecer nuevamente a mis padres José Ortega y Mariana Valencia que siempre me han apoyado, animado y enseñado a superar los obstáculos que la vida te pone en el camino. Agradezco a mis hermanas Jessica Ortega, Jazmín Ortega; y mi amigo Luis que han estado presentes como un gran apoyo y confidentes, que me han ayudado en los momentos más difíciles y en mis momentos felices.

Agradezco a mi prometida Jaqueline Stephanie Ley Martínez que en ella encontré el cariño, el amor y el apoyo para poder seguir adelante; ha sido mi acompañante de logros y fracasos además de ser mi motivación para superar todos los obstáculos. Agradezco a mi suegra Gloria Martínez Nájera que siempre me ha brindado su confianza y apoyo durante todo este tiempo.

Agradezco a mis directores de tesis la Dra. Maribel Jiménez Fernández y el Dr. Oscar García Barradas que me recibieron amablemente para colaborar en este proyecto de investigación, y que en todo momento me brindaron su apoyo, amistad, comprensión, paciencia y sus conocimientos para que pudiera realizar con éxito este trabajo de tesis.

A mis tíos(as) por el apoyo y cariño que me han brindado durante toda mi vida, a mis abuelos que me han mostrado su cariño y valiosos consejos principalmente a mi abuelita Balvina. A mis primas(os) (Itzel, Alyssum, Gabriela, Bety. Carolina, Miguel y Alexander)

A mis amigos(as) Raúl, Anselmo, Jorge que han estado conmigo desde la preparatoria apoyándome en todo momento; Cinthia, Daniel que desde que los conocí en la Universidad han estado conmigo dándome consejos y su amistad; Dafne, Liesel, Jesús y Andrés que me han brindado su amistad, cariño y comprensión en estos dos años, por ser mis confidentes y esperarme cuando me quedaba tarde; a mis compañeros de laboratorio Jazmín, Karina y Flor por sus palabras de apoyo y ayuda en el laboratorio.

Al Instituto de Ciencias Básicas y a la Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica-UV (SARA-UV) por permitirme realizar mi trabajo experimental.

Al Laboratorio de RMN del Instituto de Ecología A.C. (INECOL), con el apoyo técnico del M.C. Israel Bonilla Landa por su amabilidad y apoyo en las muestras analizadas.

A CONACYT por el apoyo que me ha brindado en estos dos años y darme la oportunidad de realizar una maestría.

ÍNDICE.

RESUMEN.....	16
SUMMARY	17
1. INTRODUCCIÓN.....	18
2. MARCO TEÓRICO.....	20
2.1 Estrés oxidativo.	20
2.2 Daño oxidativo a biomoléculas	21
2.3 Antioxidantes	22
2.3.1 Características de los Antioxidantes	23
2.3.2 Clasificación de los antioxidantes	23
2.4 Lipofilización.	36
2.4.1 Lipofilicidad y solubilidad (cLog P y cLog S).	36
2.5 Agente tensioactivo.....	37
2.6 Balance hidrofílico-lipofílico.....	38
2.6.1 Método de Davies (1959).....	39
2.7 Métodos para evaluar la actividad antioxidante.	39
· Análisis del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).	40
· Método del radical ABTS• (Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico).	41
3. ANTECEDENTES	42
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	44
5. JUSTIFICACIÓN	45
6. OBJETIVO GENERAL.....	46
6.1. Objetivos específicos	46
7. HIPÓTESIS	47
8. METODOLOGÍA.	48

8.1 Reacción de Esterificación.	49
8.2 Lipofilización del ácido ascórbico y el ácido linoleico conjugado.	55
8.2.1 Purificación de la reacción de lipofilización del ácido ascórbico y ácido linoleico conjugado.....	55
8.3 Lipofilización de carvacrol y ácido linoleico conjugado.	55
8.3.1 Purificación de la reacción de lipofilización del carvacrol y ácido linoleico conjugado.....	55
8.4 Lipofilización de quercetina y ácido linoleico conjugado.	56
8.4.1 Purificación de la reacción de lipofilización de quercetina y ácido linoleico conjugado.....	56
8.5 Lipofilización de resveratrol y ácido linoleico conjugado.	56
8.5.1 Purificación de la reacción de lipofilización de resveratrol y ácido linoleico conjugado.....	56
8.6 Lipofilización de vainillina y ácido linoleico conjugado.	56
8.6.1 Purificación de la reacción de lipofilización de vainillina y ácido linoleico conjugado.....	57
8.7 Metodos para evaluar la actividad antioxidante.	57
8.7.1 Método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•).....	57
8.7.2 Análisis del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).	58
8.7.3 Método del radical ABTS• (Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico).....	59
8.8 Metodos para la identificación de los productos.	59
8.8.1 Resonancia Magnética Nuclear.	59
8.9 Evaluación teórica de los parámetros fisicoquímicos y toxicológicos mediante el uso de herramientas computacionales.	60
8.10 Análisis estadístico	60
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	61
9.1 Evaluación de la actividad antioxidante de los antioxidantes precursores.	61
9.2 Obtención y asignación de los espectros de RMN ¹H y ¹³C de los antioxidantes precursores.	64

9.3 Lipofilización del ácido ascórbico-ácido linoleico conjugado y evaluación de los espectros de RMN de ¹H .	64
9.3.1. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado ácido ascórbico-ácido linoleico conjugado mediante el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•).	67
9.3.2. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado ácido ascórbico-ácido linoleico conjugado mediante el método del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).	68
9.3.3. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado ácido ascórbico-ácido linoleico conjugado mediante el método del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS•).	69
9.4 Lipofilización de carvacrol-ácido linoleico conjugado y evaluación de los espectros de RMN de ¹H.	71
9.4.1. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado carvacrol-ácido linoleico conjugado mediante el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•).	73
9.4.2. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado carvacrol-ácido linoleico conjugado mediante el método del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).	75
9.4.3. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado carvacrol-ácido linoleico conjugado mediante el método del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS•).	76
9.5 Lipofilización de quercetina-ácido linoleico conjugado y evaluación de los espectros de RMN de ¹H.	78
9.5.1. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado quercetina-ácido linoleico conjugado mediante el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•).	81
9.5.2. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado quercetina-ácido linoleico conjugado mediante el método del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).	81

9.5.3. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado quercetina-ácido linoleico conjugado mediante el método del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS•).	83
9.6 Lipofilización de resveratrol-ácido linoleico conjugado y evaluación de los espectros de RMN de ¹H.	85
9.6.1. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado resveratrol-ácido linoleico conjugado mediante el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•).	85
9.6.2. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado resveratrol-ácido linoleico conjugado mediante el método del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).	86
9.6.3. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado resveratrol-ácido linoleico conjugado mediante el método del ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS•).	88
9.7 Lipofilización de vainillina-ácido linoleico conjugado y evaluación de los espectros de RMN de ¹H.	89
9.7.1. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado vainillina-ácido linoleico conjugado mediante el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•).	92
9.7.2. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado vainillina-ácido linoleico conjugado mediante el método del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).	93
9.7.3. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado vainillina-ácido linoleico conjugado mediante el método del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS•).	94
9.8 Comparación de los sistemas lipofilizados mediante el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•).	96
9.9 Comparación de los sistemas lipofilizados mediante el método del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).	97
9.10 Comparación de los sistemas lipofilizados mediante el método del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS•).	98

9.11 Correlación de Pearson de los sistemas lipofilizados en los métodos de DPPH, FRAP y ABTS.	99
9.12 Evaluación teórica y análisis de los parámetros toxicológicos de los antioxidantes precursores y los sistemas lipofilizados.....	103
9.13 Determinación del valor de HLB (Balance hidrofílico-lipofílico) de los antioxidantes precursores y los sistemas lipofilizados.....	105
9.14 Evaluación teórica de los parámetros fisicoquímicos cLog P y cLog S para los antioxidantes precursores y los sistemas lipofilizados.....	107
10. CONCLUSIONES.....	109
BIBLIOGRAFÍA.....	111
ANEXOS	121

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los antioxidantes	24
Cuadro 2. Valor de los grupos hidrofílicos y lipofílicos mediante el método de Davies.....	39
Cuadro 3. Actividad antioxidante de los compuestos precursores.	63
Cuadro 4. Valores del coeficiente de correlación de la actividad antioxidante por el método del radical ABTS de los antioxidantes precursores y sistemas lipofilizados.	100
Cuadro 5. Valores del coeficiente de correlación de la actividad antioxidante por el método del radical DPPH de los antioxidantes precursores y sistemas lipofilizados.	101
Cuadro 6. Valores del coeficiente de correlación de la actividad antioxidante por el método del radical FRAP de los antioxidantes precursores y sistemas lipofilizados.	102
Cuadro 7. Parámetros toxicológicos de los antioxidantes precursores.	104
Cuadro 8. Parámetros toxicológicos de los sistemas lipofilizados.	104
Cuadro 9. Cálculo de HLB por el método de Davies de los antioxidantes precursores. .	105
Cuadro 10. Cálculo de HLB por el método de Davies de los sistemas lipofilizados.....	106
Cuadro 11. Parámetros fisicoquímicos (cLog P y cLog S) de los antioxidantes precursores.....	108
Cuadro 12. Parámetros fisicoquímicos (cLog P y cLog S) de los sistemas lipofilizados.	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de reacción del radical superóxido.....	21
Figura 2. Estructura química de la vitamina E.....	28
Figura 3. Formación de radicales libres del ácido ascórbico.....	29
Figura 4. Metabolismo del ácido ascórbico.....	31
Figura 5. Estructura química de los carotenoides más abundantes presentes en plantas.....	32
Figura 6. Estructura química del trans-resveratrol.....	33
Figura 7. Estructura del ácido 9-cis,11-trans linoleico conjugado.....	34
Figura 8. Esquema general de trabajo.....	48
Figura 9. Reacción de esterificación de Fisher.....	49
Figura 10. Reacción de esterificación del ácido ascórbico y el ácido linoleico conjugado.....	50
Figura 11. Reacción de esterificación de resveratrol y el ácido linoleico conjugado.....	51
Figura 12. Reacción de esterificación de vainillina y el ácido linoleico conjugado.....	52
Figura 13. Reacción de esterificación del carvacrol y el ácido linoleico conjugado.....	53
Figura 14. Reacción de esterificación de la quercetina y el ácido linoleico conjugado.....	54
Figura 15. Espectro de RMN ^1H del ácido ascórbico disuelto en metanol deuterado (CD_3OD) a 500 MHz.....	66
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H del sistema lipofilizado ácido ascórbico-ácido linoleico conjugado disuelto en cloroformo deuterado (CDCl_3) a 500 MHz.....	66
Figura 17. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado ácido ascórbico-CLA mediante el método del radical DPPH.....	68
Figura 18. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado ácido ascórbico-CLA mediante el método de FRAP.....	69

Figura 19. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado ácido ascórbico-CLA mediante el método de ABTS.....	70
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H del carvacrol disuelto en metanol deuterado (CD_3OD) a 500 MHz.....	72
Figura 21. Espectro de RMN ^1H del sistema lipofilizado carvacrol-ácido linoleico conjugado disuelto en metanol deuterado (CD_3OD) a 500 MHz.....	73
Figura 22. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado carvacrol-CLA mediante el método del radical DPPH.	74
Figura 23. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado carvacrol-CLA mediante el método de FRAP.	76
Figura 24. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado carvacrol-CLA mediante el método de ABTS.	78
Figura 25. Espectro de RMN de ^1H de la quercetina disuelto en metanol deuterado (CD_3OD) a 500 MHz.....	80
Figura 26. Espectro de RMN de ^1H del sistema lipofilizado (quercetina-ácido linoleico conjugado) disuelto en metanol deuterado (CD_3OD) a 500 MHz.....	80
Figura 27. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado quercetina-CLA mediante el método del radical DPPH.	82
Figura 28. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado quercetina-CLA mediante el método de FRAP.	83
Figura 29. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado quercetina-CLA mediante el método de ABTS.	84
Figura 30. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado resveratrol-CLA mediante el método del radical DPPH.	86
Figura 31. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado resveratrol-CLA mediante el método de FRAP.	87
Figura 32. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado resveratrol-CLA mediante el método de ABTS.	89
Figura 33. Espectro de RMN de ^1H de la vainillina disuelto en metanol deuterado (CD_3OD) a 500 MHz.....	91

Figura 34. Espectro de RMN de ^1H del sistema lipofilizado vainillina-ácido linoleico conjugado disuelto en cloroformo deuterado (CDCl_3) a 500 MHz.....	91
Figura 35. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado vainillina-CLA mediante el método del radical DPPH.	93
Figura 36. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado vainillina-CLA mediante el método de FRAP.	94
Figura 37. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado vainillina-CLA mediante el método de ABTS.	95
Figura 38. Actividad antioxidante de los sistemas lipofilizados mediante el método de DPPH.....	96
Figura 39. Actividad antioxidante de los sistemas lipofilizados mediante el método de FRAP.....	97
Figura 40. Actividad antioxidante de los sistemas lipofilizados mediante el método de ABTS.	98

ÍNDICE DE ECUACIONES

<i>Ecuación 1. Cálculo de HLB por el método de Davies.....</i>	<i>39</i>
<i>Ecuación 2. Reacción de estabilización del radical DPPH.....</i>	<i>40</i>
<i>Ecuación 3. Ecuación para obtener el porcentaje de actividad antioxidante.</i>	<i>57</i>

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
AcOEt	Acetato de etilo
Asc (OH 2)	Ácido ascórbico
HCl	Ácido clorhídrico
DHAA	Ácido dehidroascórbico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
CLA	Ácido linoleico conjugado
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico
FRAP	Análisis del poder reductor férrico/antioxidante
HLB	Balance hidrófilico/lipófilico
FeCl ₃ ·6H ₂ O	Cloruro férrico hexahidratado
HMBC	Correlación de enlace múltiple heteronuclear
COSY	Correlación espectroscópica
HSQC	Correlación heteronuclear simple cuántico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
GPx	Glutación peroxidasas
h	Horas
MHz	Megahertz
DEPT	Mejora sin distorsión por transferencia de polarización
DEPT-Q	Mejora sin distorsión por transferencia de polarización con núcleos cuaternarios
MeOH	Metanol
-CH-	Metino
-CH ₂ -	Metileno
CH ₃ -	Metilo
μL	Microlitros
μM	Micromolar
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
PKC	Proteína C quinasa
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno-1
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
Toc-OH	Tocoferol
Tocen-OH	Tocotrienol
UV-VIS	Ultravioleta-visible
v:v	Volumen:Volumen

RESUMEN.

Una de las problemáticas que producen los oxidantes acumulados en nuestro organismo y en los alimentos es la modificación química de las estructuras del núcleo celular, siendo que en este núcleo se encuentran las funciones de reproducción y crecimiento, y el origen de los trastornos propios del envejecimiento. La oxidación puede ser prevenida o retrasada por los antioxidantes, los cuales son sustancias orgánicas de origen sintético o natural que actúan como atrapadores de radicales libres del oxígeno involucrados en la oxidación de los ácidos grasos, si los radicales libres no son neutralizados inmediatamente por un antioxidante, estos causan daños celulares que al irse acumulando provocan un deterioro al organismo. La eficacia de un antioxidante se basa principalmente en su reactividad química (como captador de radicales), pero también es importante la forma en que interactúa con otros componentes de los alimentos, su concentración, y especialmente de su ubicación física en diferentes sistemas alimenticios homogéneos o heterogéneos, es por ello que en este trabajo se evaluaron cinco sistemas de antioxidantes (ácido ascórbico, carvacrol, quercetina, resveratrol y vainillina) lipofilizándolos con el ácido linoleico conjugado, evaluando su actividad antioxidante mediante los métodos de DPPH, FRAP y ABTS antes y después de la lipofilización para evaluar su efecto ante estos radicales libres y observar si existe un aumento o una disminución en sus propiedades antioxidantes. Los resultados indicaron que los compuestos lipofilizados carvacrol-ácido linoleico conjugado y vainillina-ácido linoleico conjugado presentaron una mejor actividad antioxidante que sus antioxidantes precursores, en cada uno de los métodos a evaluar; se observó que el sistema ácido ascórbico-ácido linoleico conjugado presentó una mejor actividad antioxidante que el ácido linoleico conjugado en cada uno de los métodos a evaluar pero presenta valores menores que el ácido ascórbico. El HLB (Balance hidrofílico-lipofílico) de cada uno de los sistemas lipofilizados presentó valores diferentes que sus antioxidantes precursores observándose que la lipofilización fue diferente en cada una de las reacciones de esterificación.

SUMMARY

One of the principal hassles that produce the oxidants accumulated in our body and in food, is a chemical modification of the structures of the cell nucleus, being in this functions of reproduction and growth, and the origin of aging disorders. Oxidation may be prevented or delayed by antioxidants, which are organic substances of synthetic or natural origin, which act as free radical scavengers of oxygen involved in the oxidation of fatty acids, if free radicals are not immediately neutralized by an antioxidant these cause cellular damage that when they accumulated cause deterioration to the body. The effectiveness of an antioxidant is mainly based on chemical reactivity (as radical scavenger), but it is also important how it interacts with other food components, concentration, and especially their physical location in different homogeneous food systems or heterogeneous, is why in this work five sets of antioxidants were evaluated (ascorbic acid, carvacrol, quercetin, resveratrol and vanillin) lipophilized with conjugated linoleic acid, its antioxidant activity was evaluated by the methods of DPPH, FRAP and ABTS before and after the lipophilization to evaluate its effect against free radicals and determine if there is an increase or decrease in its antioxidant properties. The results indicated that the compounds lipophilized carvacrol-conjugated linoleic acid and vanillin-conjugated linoleic acid showed a better antioxidant activity than its antioxidant precursors, in each of the methods assessed; it observed that ascorbic acid conjugated linoleic acid system showed better antioxidant activity than conjugated linoleic acid in each of the methods to evaluate but has lower values than ascorbic acid. The HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) of each of the lipophilized systems presented different values that its antioxidant precursors was observed that the lipophilization were different in each of the esterification reactions.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente los antioxidantes han sido fuente de varios trabajos dentro del área de la ciencia de los alimentos y nutrición humana. El daño más importante que producen los oxidantes acumulados en el organismo o en los alimentos es la modificación química de las estructuras del núcleo celular, siendo que en ésta se encuentran las funciones de reproducción y crecimiento, y el origen de los trastornos propios del envejecimiento. La producción de radicales libres y su acción en las células se observa en los diferentes tejidos. Esto es de suma importancia, ya que los oxidantes afectan al organismo que los acumula y producen daños que se transmiten a futuras generaciones.

La oxidación puede ser prevenida o retrasada por los antioxidantes, los cuales son sustancias orgánicas de origen sintético o natural que actúan como atrapadores de radicales libres del oxígeno involucrados en la oxidación de los ácidos grasos, los radicales libres son moléculas que se vuelven inestables al perder o ganar un electrón y quedar desapareado, el radical libre entonces roba otro electrón u oxida a otras moléculas para tener siempre pares de electrones, si los radicales libres no son neutralizados inmediatamente por un antioxidante, estos causan daños celulares que al irse acumulando provocan un deterioro al organismo.

La neutralización de los radicales libres puede ser afectada por muchos factores como el medio en donde se lleva a cabo la neutralización, las características de los antioxidantes y las interacciones con los radicales libres complicando su neutralización. Algunos antioxidantes no pueden actuar en el medio donde se encuentran ya que por sus características químicas los antioxidantes pueden ser hidrosolubles o liposolubles siendo una limitante en el área de alimentos. Una gran alternativa para resolver este problema es la "lipofilización", que de acuerdo con Aoki *et al.* 1981, consiste en una modificación química de algún compuesto para disminuir su carácter hidrofílico o aumentar su carácter lipofílico. Por lo que en este estudio se llevó a cabo la lipofilización de varios antioxidantes naturales

(ácido ascórbico, carvacrol, quercetina, resveratrol, vainillina y ácido linoleico conjugado) para aumentar su mecanismo de acción, evaluando sus propiedades antioxidantes y su estabilidad. En el presente trabajo se desarrolló y evaluó un sistema lipofilizado a partir de compuestos con propiedades antioxidantes mediante una esterificación química.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Estrés oxidativo.

El oxígeno está asociado a las condiciones de vida aerobia (Davis, 1995), representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y viabilidad celular al mismo tiempo que involucra un peligro potencial debido a las características paramagnéticas de este gas, responsable de la formación de intermediarios parcialmente reducidos y dotados de una reactividad alta conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Las ROS son radicales libres (RL) o precursores de radicales. En los orbitales, los electrones giran en pares con un espín particular, esto se conoce como máxima estabilidad natural; por tanto, si hay electrones desapareados en un orbital, se generan especies moleculares altamente reactivas que tienden a tomar un electrón de cualquier otro átomo para compensar su deficiencia electrónica (Davis, 1995).

El oxígeno, es el principal radical libre, ya que el tiene dos electrones desapareados. Entre las ROS destacan:

- **Radicales:** ión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo ($\bullet OH$), alcoxilo ($RO\bullet$), peroxilo ($ROO\bullet$) y óxido de nitrógeno ($NO\bullet$)
- **No radicales:** peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singulete $\bullet O_2$ y peroxinitrito ($ONOO\bullet$).

Las ROS tienen un origen tanto endógeno, como exógeno. Entre las fuentes endógenas destacan (Fridovich, 1978):

- La cadena respiratoria, donde la reducción monovalente de la molécula de oxígeno da lugar a la formación de la mayoría de las ROS.
- Las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos), utilizan el sistema de la NADPH oxidasa generando directamente al ión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Por otra parte, como mecanismo de defensa, dichas células también

generan óxido de nitrógeno (NO^\bullet), por acción de la óxido-nítrico- sintasa sobre la arginina intracelular. La combinación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ con el NO^\bullet da lugar a la formación del ONOO^\bullet capaz de inducir peroxidación lipídica en las lipoproteínas.

- La autooxidación de compuestos de carbono tales como aminoácidos, proteínas, lípidos, glucósidos y ácidos nucleicos dan lugar también a la formación de estos radicales.

Las fuentes exógenas de radicales libres pueden ser:

- **Ambientales.** Radiación electromagnética, luz solar, ozono, tabaco, etc.
- **Farmacológicas.** Xenobióticos, drogas, etc.
- **Nutricionales.** Contaminantes, aditivos, pesticidas, etc.

2.2 Daño oxidativo a biomoléculas

Son muchas las ROS que actúan como oxidantes biológicos, pero el $\text{O}_2^{\bullet-}$ es el principal reductor, la simple adición de un protón da lugar a la formación de HO_2^\bullet , convirtiéndose este en un agente oxidante muy activo. Estas transformaciones se resumen en la Figura 1 (Davis, 1995):

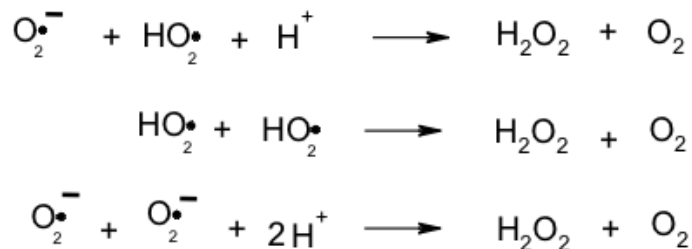


Figura 1. Mecanismo de reacción del radical superóxido (Davis, 1995).

Las ROS producen acciones diversas sobre el metabolismo que pueden ser el origen del daño celular:

- Sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL).
- Sobre los glucósidos, actúan alterando las funciones celulares tales como las asociadas a la actividad de las interleucinas y la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores.
- Sobre las proteínas produciendo inactivación y desnaturalización.
- Sobre los ácidos nucleicos mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis.

Ante el estrés oxidativo el organismo responde con la defensa antioxidante, pero en determinadas ocasiones puede ser insuficiente, desencadenando diferentes procesos fisiológicos y fisiopatológicos. En la actualidad son muchos los procesos relacionados con la producción de radicales libres como son: mutagénesis, transformación celular, cáncer, arteriosclerosis, infarto de miocardio, diabetes, enfermedades inflamatorias, trastornos del sistema nervioso central, envejecimiento celular, etc. (Rice-Evans *et al.* 1997; Halliwell, 2007).

2.3 Antioxidantes

El término antioxidante se ha definido de diversas maneras en la literatura. Una forma de definir lo que es un antioxidante es cualquier sustancia que pueda prevenir, reducir o reparar el daño inducido por ROS (especies reactivas de oxígeno) de una biomolécula en específico (Halliwell, 2007). Los antioxidantes protegen de las ROS (especies reactivas de oxígeno) y otros daños por tres mecanismos generales que se enumeran a continuación:

- La inhibición de la generación de ROS
- Captura de ROS ya formados
- Reparación del daño inducido por ROS.

El concepto de antioxidante biológico se refiere a cualquier compuesto que, cuando está presente en una concentración inferior en comparación con la de un sustrato oxidable, es capaz de prevenir o bien retrasar la oxidación del sustrato

(Halliwell y Gutteridge, 1995). Según Halliwell (2007), un antioxidante es cualquier sustancia (o acción) que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula. Los antioxidantes pueden ser de dos clases, con actividad y sin actividad enzimática. A la primera clase pertenecen los compuestos capaces de bloquear la iniciación, o sea, las enzimas que remueven las especies reactivas de oxígeno. En la segunda clase, están las moléculas que se integran con los radicales y son consumidas durante la reacción. Esta clasificación incluye tanto a los antioxidantes naturales como a los sintéticos (Mancini y Hunt, 2005).

2.3.1 Características de los Antioxidantes

La principal característica de un compuesto o sistema antioxidante es la prevención o detección de una cadena de propagación oxidativa, mediante la estabilización del radical generado y la regeneración del antioxidante radical ayudando así a reducir el daño oxidativo en el cuerpo humano (Namiki, 1990).

Las funciones antioxidantes implican reducir el estrés oxidativo, las mutaciones de ADN, transformaciones malignas, así como otros parámetros de daño celular. Los estudios epidemiológicos demostraron la capacidad de los antioxidantes para contener los efectos de la actividad de especies reactivas del oxígeno, y disminuir la incidencia de cáncer y otras enfermedades degenerativas (Godic *et al.* 2014).

Por lo anterior se puede definir como antioxidantes en el ámbito de los alimentos a “aquellas sustancias que, en bajas cantidades, actúan previniendo o retardando la oxidación de materiales fácilmente oxidables” (Chipault, 1962).

2.3.2 Clasificación de los antioxidantes

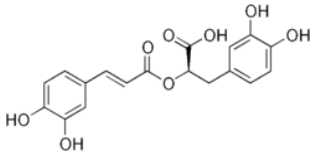
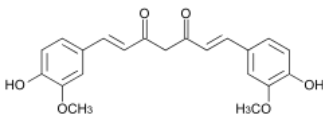
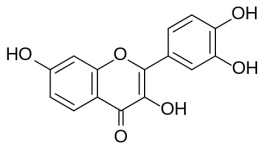
Los antioxidantes cubren diferentes clases de compuestos que pueden interferir con los ciclos de oxidación para inhibir o retardar el daño oxidativo de las biomoléculas. Las principales clases de compuestos con actividad antioxidante son: vitaminas (vitamina C y vitamina E), carotenoides (carotenos y xantófilas) y polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos y estilbenos).

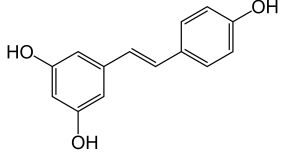
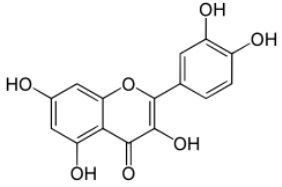
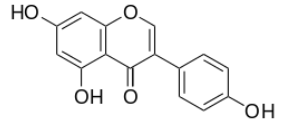
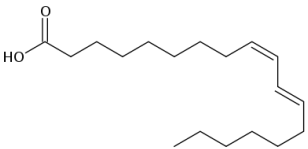
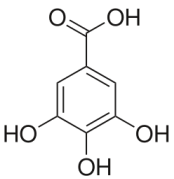
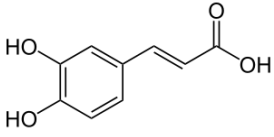
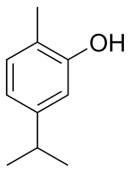
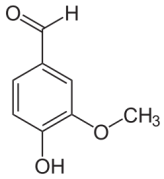
Según su estructura química y su función biológica se clasifican en:

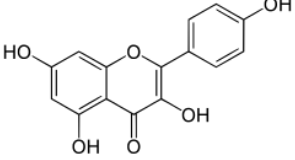
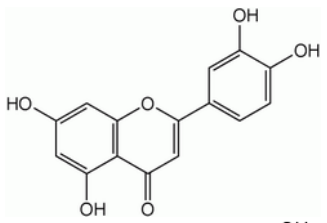
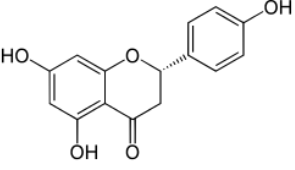
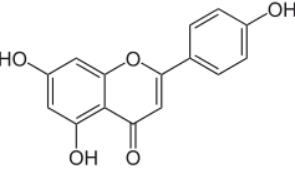
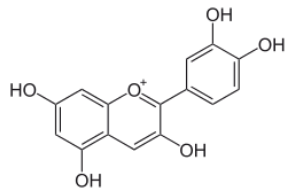
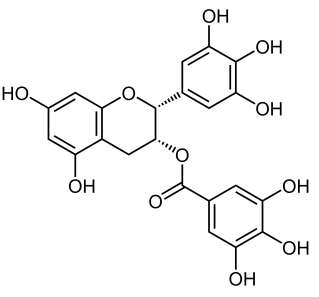
- Enzimas: glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa.
- Compuestos no enzimáticos: vitaminas C y E, carotenoides, flavonoides, fenoles, polifenoles, fitoestrógenos, selenio y manganeso, ácido lipoico, CoQ10. (Sunderam *et al.* 2004; Suzuki *et al.* 2006.)

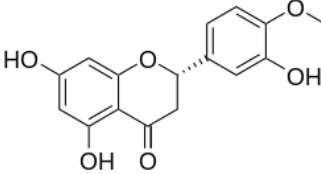
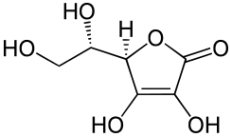
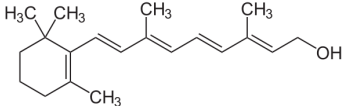
La clasificación de los antioxidantes se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de los antioxidantes

TIPO	ANTIOXIDANTE	ESTRUCTURA	Eliminador ROS	Atrapador ROS
Endógenos enzimáticos	Superóxido Dismutasa	Proteínica, dependiente Zn o Mn	✓	
	Catalasa	Proteínica, dependiente de grupo hemo	✓	
	Glutatión Peroxidasa	Proteínica dependiente de Zn o Mn	✓	
Exógenos (No enzimáticos)	Ácido rosmarínico		✓	
	Curcumina		✓	
	Fisetina		✓	

Exógenos (No enzimáticos)	Resveratrol		✓	
	Quercetina		✓	✓
	Genisteína		✓	
	Ácido linoleico conjugado		✓	✓
	Ácido gálico		✓	
	Ácido cafeico		✓	
	Carvacrol		✓	
	Vainillina		✓	

Exógenos (No enzimáticos)	Kaempferol		✓	
	Luteolina		✓	
	Naringenina		✓	
	Apigenina		✓	
	Cianidina		✓	
	Epigallocatequina galato		✓	

Exógenos (No enzimáticos)	Hesperetina		✓	
	Ácido ascórbico		✓	✓
	Retinol		✓	✓

(Kohen y Nyska, 2002; Dadoly, 2007; Gülcin, 2012; Selvaraj *et al.*, 2013; Piscochi y Pop, 2015)

Gordon (1990) da una clasificación de los antioxidantes, mencionando que; hay dos tipos principales de antioxidantes de acuerdo a su mecanismo de acción, el "primario" (ruptura de la reacción en cadena, secuestradores de radicales libres) y el "secundario o preventivo". Los mecanismos antioxidantes "secundarios" pueden incluir la desactivación de metales, inhibición de los hidroperóxidos lipídicos interrumpiendo la producción de volátiles indeseables, la regeneración de antioxidantes "primarios", la eliminación del oxígeno singulete, etc.

2.3.2.1 Antioxidantes exógenos

Los *antioxidantes exógenos*, son los que ingresan al organismo por la vía de los alimentos. Cuando llegan a las células, se depositan en sus membranas y las protegen de la lipoperoxidación, tal es el caso de las vitaminas E y C, flavonoides y carotenoides. A diferencia de los antioxidantes enzimáticos, estos otros reaccionan con los radicales libres y modifican su estructura, es decir, los capturan o neutralizan, y se oxidan en el proceso (Ayres. 2001). A pesar de la eficiencia de los sistemas antioxidantes endógenos, es necesario el consumo de antioxidantes exógenos a partir de frutas y vegetales para mantener concentraciones bajas de radicales libres (Poljsak *et al.*, 2013). Los antioxidantes exógenos considerados de

mayor importancia son el ácido ascórbico o vitamina C, α -tocoferol o vitamina E, carotenos, derivados de ácidos fenólicos, derivados del estilbeno y flavonoides.

- **Vitamina E**

El grupo de vitaminas E se dividen en dos clases, dependiendo de la naturaleza de la cadena lateral, R. La α -, β - y δ -tocoferoles (Toc-OH) difieren de los tocotrienoles correspondientes (Tocen-OH) sólo en la presencia de tres dobles enlaces de la cadena lateral en este último (Figura 2):

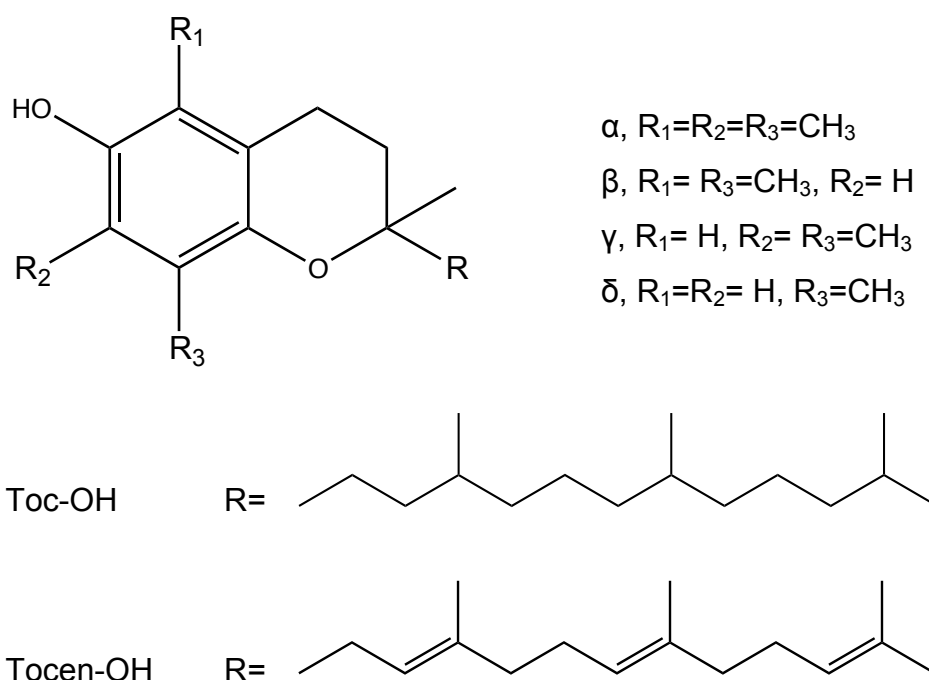


Figura 2. Estructura química de la vitamina E (Horwitt, 1990).

Las dimensiones físicas y conformación de los d-tocoferoles particularmente los adapta para ser una parte integral de la bicapa lipídica de la membrana celular. La vitamina E es el principal antioxidante que rompe la cadena en los tejidos del cuerpo, y se considera la primera línea de defensa contra la peroxidación lipídica, protegiendo las membranas celulares en una etapa temprana del ataque de los radicales libres (Horwitt, 1990; Van Gossum *et al.* 1988).

La vitamina E tiene como función la protección de los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares que son importantes para la función y la estructura de la membrana (Van Gossum *et al.* 1988; Maxwell, 1995). El aumento de la ingesta de vitamina E puede mejorar la respuesta inmune. La vitamina E regula la agregación plaquetaria mediante la inhibición de la producción de prostaglandina (tromboxano). También tiene un papel en la regulación de la activación de la proteína C quinasa (PKC) (Watson *et al.* 1988; Machlin, 1991).

- **Vitamina C**

El ácido ascórbico (Asc (OH)₂), uno de los más poderosos agentes reductores que se encuentran en los sistemas biológicos, es soluble en agua y se encuentra principalmente en el plasma sanguíneo (Keaney y Frei, 1995), se reduce fácilmente en especies reactivas del oxígeno, en particular superóxido (Keaney y Frei, 1995; Al Malaika *et al.* 1989), ácido hipocloroso, y el grupo hidroxilo que es soluble en agua (Figura 3).

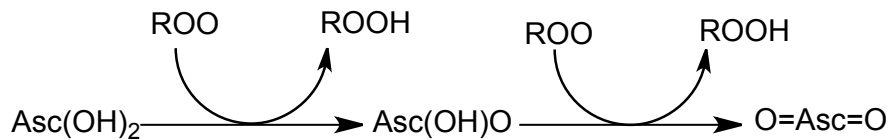


Figura 3. Formación de radicales libres del ácido ascórbico (Keaney y Frei, 1995).

La vitamina C (ácido ascórbico, ascorbato) es una lactona con y en su estructura contiene seis átomos de carbono, es soluble en agua y se encuentra ampliamente en plantas. La mayoría de los animales la sintetizan a partir de glucosa en el hígado (mamíferos) o riñones (aves y reptiles). Varias especies de animales, repartidos por todo el árbol evolutivo, son incapaces de sintetizar la vitamina C. Estos incluyen a los primates humanos y no humanos, cobayas, murciélagos de la fruta de la India, ruiseñores, y algunos peces (Nishikimi *et al.* 1995). Para los seres humanos, la incapacidad de sintetizar el ácido ascórbico hace que este producto químico se caracterice por ser una vitamina. La vitamina C se sintetiza por varios precursores de las plantas y es abundante en hojas, en particular, el cloroplasto

(Wheeler *et al.* 2000). La vitamina C puede jugar un papel importante en la fotosíntesis, resistencia al estrés, y crecimiento de la planta y su desarrollo (Smirnoff, 2000).

El ascorbato es un donador de electrones, y esto explica las propiedades de sus funciones conocidas y postulados. Como un antioxidante o agente reductor, dona secuencialmente dos electrones del doble enlace C2-C3, formando el radical libre intermediario ácido semideshidroascórbico (radical libre de ascorbato) (Figura 2). El radical libre de ascorbato es inestable (5-10 s), pero es relativamente no reactivo con otros compuestos para formar radicales libres potencialmente dañinos, y puede ser reversible reduciéndose a ascorbato (Buettner y Moseley, 1993). Estas propiedades hacen que el ascorbato sea un donante ideal de electrones. El ácido semideshidroascórbico, siendo inestable, se somete a una oxidación adicional para formar el producto más estable, ácido dehidroascórbico (DHAA), que puede existir en más de una forma estructural (Figura 4), pero sólo unos pocos minutos a pH fisiológico. DHAA se puede reducir de nuevo a ascorbato por el glutatión, con la formación de disulfuro de glutatión (Rumsey y Levine, 1998; Winkler y Orselli, 1994) o por reducción enzimática mediada por al menos tres proteínas distintas. Si no se reduce, DHA sufre ruptura del anillo y ésta irreversiblemente hidroliza a ácido 2,3-dicetogulónico. Ácido dicetogulónico se metaboliza a xilosa, xilonato, lixonato, y oxalato, siendo el último un producto final clínicamente significativo del metabolismo de ascorbato (Rumsey y Levine, 1998).

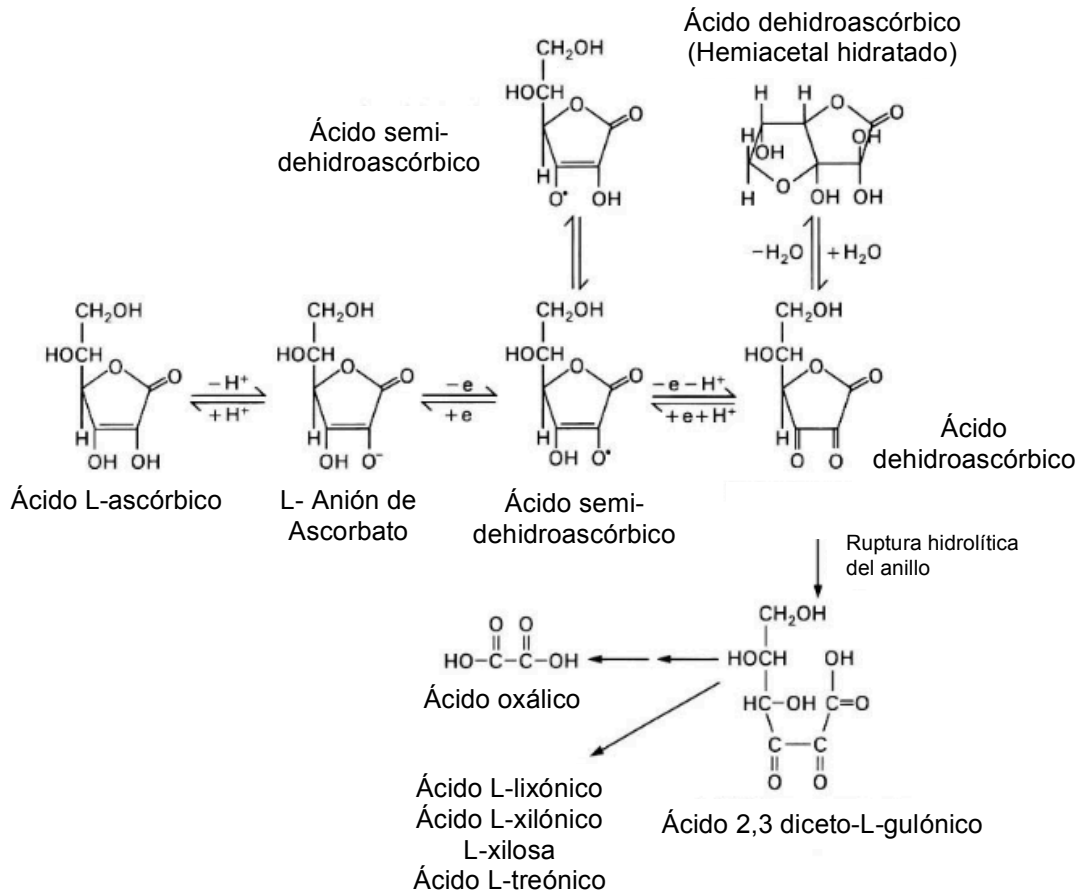
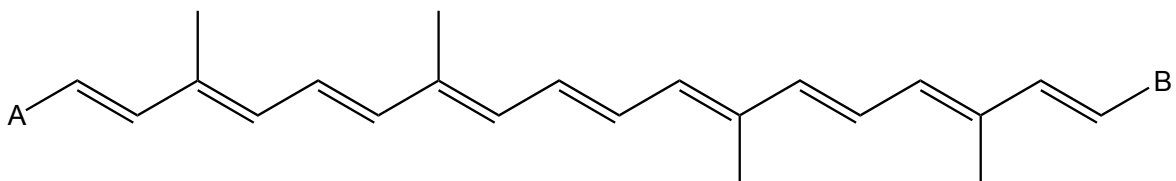


Figura 4. Metabolismo del ácido ascórbico (Rumsey y Levine, 1998).

- **Carotenoides y retinoides**

Los carotenoides son un grupo de compuestos altamente conjugados que se ha demostrado que confieren protección contra las enfermedades de oxidación, en particular cáncer y la aterosclerosis



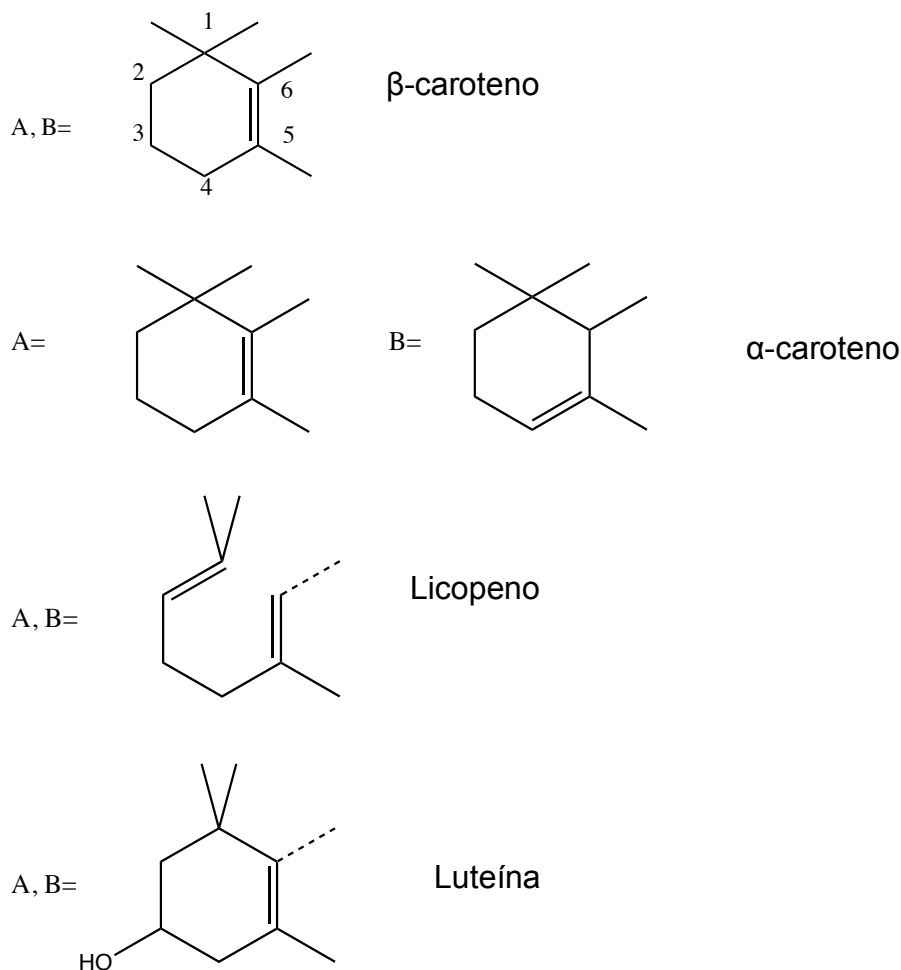


Figura 5. Estructura química de los carotenoides más abundantes presentes en plantas (Britton y Mendez, 1997).

Los carotenoides o tetraterpenoides son una clase de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono (Figura 5) derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranil-geranil-pirofosfato, en su mayoría son solubles en disolventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo (por ejemplo el β -caroteno) y el rojo (por ejemplo el licopeno). Los carotenoides se clasifican en dos grupos: carotenos y xantófilas. Los carotenos solo contienen carbono e hidrógeno (por ejemplo el β -caroteno, el licopeno, etc.), mientras que las xantófilas contienen además oxígeno (por ejemplo la luteína). El caroteno más comúnmente encontrado es el β -caroteno, y normalmente constituye entre el 25-30% del contenido total de carotenoides en las plantas. La luteína es la xantófila más

abundante (40-45%), pero siempre se encuentra en menor proporción que el β -caroteno (Britton y Mendez, 1997).

- **Resveratrol**

El resveratrol (*trans*-resveratrol, 3,5,4'-trihidroxi- *trans*-estilbeno) es un compuesto polifenólico de la familia del estilbeno (Figura 6), hidrosoluble, que se encuentra principalmente en la piel de la uva, maní, y las raíces de *Polygonum cuspidatum* (Walle *et al.* 2004).

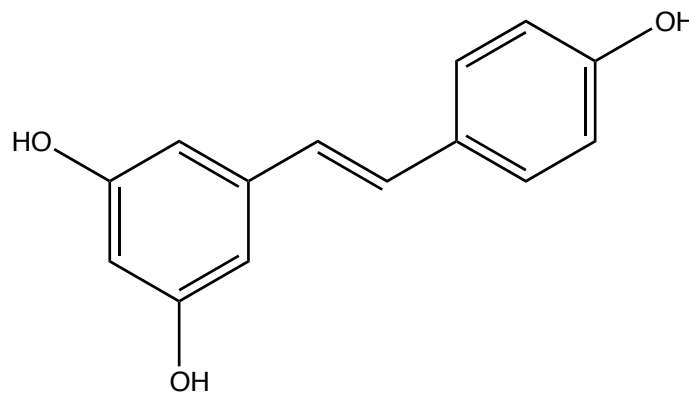


Figura 6. Estructura química del *trans*-resveratrol (Walle *et al.* 2004).

In vitro e *in vivo* sugieren que el resveratrol tiene una serie de beneficios potenciales para la salud, incluidos los efectos de protección anti-cancerígena, anti-inflamatoria, anti-obesidad, y del corazón/cerebro. Por esta razón, ha habido un considerable interés en la utilización de resveratrol como un agente bioactivo en los alimentos y productos farmacéuticos.

Existe evidencia de que el resveratrol es un potente inhibidor de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) encontrados en lipoproteínas de baja densidad (Miller y Rice, 1995). De hecho, se demostró que el resveratrol es mas potente que los flavonoides en la prevención de la oxidación catalizada por cobre de las lipoproteinas de baja densidad, ya que tiene una alta afinidad por el cobre, provocando que el cobre tenga una actividad quelante impidiendo la modificacion oxidativa de las lipoproteinas de baja densidad (Frankel *et al.* 1993).

- **Acido linoleico conjugado (CLA)**

El ácido linoleico conjugado (CLA) es el nombre colectivo dado a un grupo de ácidos grasos (C18) isoméricos posicionales y geométricos que contienen dos dobles enlaces conjugados, en lugar de la secuencia de doble enlace de metileno interrumpido más común. Un ejemplo de uno de los isómeros se muestra en la Figura 7.

Estos compuestos han sido reconocidos en la leche durante más de 50 años, pero en la última década han provocado un nuevo interés, ya que han demostrado potencial en sistemas animales y celulares para el tratamiento de una serie de importantes condiciones médicas, como el cáncer, la obesidad y la diabetes.

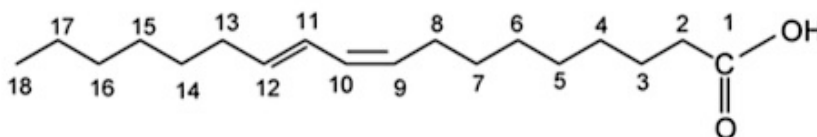


Figura 7. Estructura del ácido 9-*cis*,11-*trans* linoleico conjugado (Shantha *et al.*, 1992).

El ácido linoleico conjugado es un derivado dienoico abreviado como CLA, es un término colectivo que se refiere a una mezcla de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico (ácido C9,C12-octadecadienoico). Los dos dobles enlaces en el CLA están en las posiciones 9 y 11, o 10 y 12, a lo largo de la cadena de carbono, dando así lugar a la designación de un dieno conjugado. Cada uno de los dobles enlaces pueden estar en la configuración *cis* o *trans* (Ha *et al.*, 1987).

El CLA es una sustancia que está presente naturalmente en los alimentos. Inicialmente fue aislado e identificado por Ha *et al.* (1987) como un agente anticancerígeno de la carne picada a la parrilla, también está presente en una variedad de productos lácteos. Prácticamente todo el CLA en la leche y los quesos se encuentra esterificado en forma de triglicéridos (Chin *et al.* 1992; Shantha *et al.* 1992).

2.3.2.2 Antioxidantes endógenos

Los mecanismos enzimáticos, llamados *antioxidantes endógenos* incluyen a las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y la coenzima Q10, urato, bilirrubina (Gilbert y Ayres, 2001; Sunderam *et al.* 2004).

En este grupo se destacan las siguientes enzimas (Katalinic *et al.* 2005):

- ✓ Las Superóxido dismutasas (SOD) son un grupo de metaloenzimas que pueden dividirse en dos familias filogenéticas diferentes CuZn-SOD y Fe/Mn-SOD y catalizan la conversión de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 y O_2 (Pareja *et al.*, 2010). En los organismos eucariotas existen cuatro tipos diferentes de SOD:
 1. Cu/ZnSOD: Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (primera línea de defensa antioxidante).
 2. Fe/MnSOD: Superóxido dismutasa dependiente de hierro y manganeso
 3. EC-SOD: Superóxido dismutasa extracelular (participa en el control primario de la inactivación del NO).
- ✓ Las Glutatión peroxidasas (GPx), son dos enzimas selenio dependientes puesto que éste las mantiene activas (Cemeli *et al.* 2009), para que ejerzan su acción detoxificante por la reducción del H_2O_2 o los ROOH. La glutatión peroxidasa (GPx) está ampliamente distribuida en los tejidos humanos y animales. Su forma reducida (GSH) dona electrones y se encuentra a concentraciones intracelulares a menudo en el rango milimolar. Las GPx son consideradas enzimas con la mayor capacidad de remover peróxidos encontradas en el tejido humano.
- ✓ La catalasa participa en el metabolismo del H_2O_2 , está presente en la mayoría de los órganos del cuerpo. Aunque su afinidad por el H_2O_2 es inferior a la que muestra la GPx, bajo condiciones de sobreproducción puede asumir el papel preponderante en la eliminación del H_2O_2 , ésta

cataliza la reducción de H_2O_2 a O_2 y H_2O . A altas concentraciones de H_2O_2 , la catalasa tiene la capacidad de reducirlo, puesto que la catalasa requiere dos moléculas de H_2O_2 para llevar a cabo su reducción; por el contrario, a bajas concentraciones de H_2O_2 decrece su eficiencia (Cemeli *et al.* 2009).

2.4 Lipofilización.

La lipofilización es la esterificación de un resto lipofílico (ácido graso o alcohol graso) en diferentes sustratos (ácido fenólico, azúcar, proteínas, etc), resultando nuevas moléculas con un balance hidrofílico/lipofílico modificado. Esta reacción se puede conseguir química o enzimáticamente. (Figuerola y Villeneuve, 2005)

El término lipofilización se ha utilizado en un sentido amplio para describir el aumento de la hidrofobicidad de proteínas mediante una modificación química (Aoki *et al.* 1981). Sin embargo, se usa en un sentido mucho más estrecho por Haque y Kito (1983) para describir la unión de un ácido graso a la caseína.

El término "lipofilización", se refiere al fenómeno general en donde la hidrofobicidad de la molécula aumenta por la modificación estructural mediante una reacción química o con métodos enzimáticos, con el consiguiente aumento de la afinidad a compuestos no polares. (Aoki *et al.* 1981).

2.4.1 Lipofilicidad y solubilidad (cLog P y cLog S).

La lipofilicidad es posiblemente una de las propiedades físicoquímicas más importante de una molécula potencial, esta propiedad juega un papel importante en la solubilidad, absorción, penetración de la membrana, unión a proteínas plasmáticas, distribución, penetración en el SNC y la partición en otros tejidos u órganos, como el hígado y tiene un impacto en las rutas metabólicas. Es importante en el reconocimiento de ligandos, no sólo a las proteínas también en las interacciones de CYP450, uniones HERG y PXR mediada por la inducción de enzimas. La medida más comúnmente utilizada para la lipofilicidad es Log P, este

es el coeficiente de reparto de una molécula entre una fase acuosa y una lipofílica, por lo general es agua y octanol; y un valor adecuado de $c\text{Log P}$ debe ser ≤ 5 esto de acuerdo a las reglas de Lipinski (Cambridge MedChem Consulting).

La medición del Log P puede llevarse a cabo en una variedad de formas, la más común es por el método de frasco de agitación, que consiste en la disolución de algunos de los solutos en cuestión en un volumen de octanol y agua, con agitación durante un período de tiempo, posteriormente, se calcula la concentración del soluto en cada disolvente. Por lo general, no es práctico determinar experimentalmente el Log P de cada compuesto (que puede ser de interés para calcular log P antes de la síntesis), por lo tanto se usan los resultados calculados mediante una serie de programas, ya que estos permiten calcular diversos parámetros fisicoquímicos (Cambridge MedChem Consulting).

La solubilidad es otro parámetro fisicoquímico común para las moléculas potenciales. La solubilidad acuosa de un compuesto afecta de manera significativa sus características de absorción y distribución. Por lo general, una baja solubilidad va junto con una mala absorción y por lo tanto, el objetivo general refleja la biodisponibilidad del compuesto. El valor estimado de Log S es una unidad de logaritmo (base 10) que se mide en mol/litro. Más del 80% de los fármacos en el mercado tienen un valor (estimado) de Log S mayor de -4 (Novamass).

2.5 Agente tensioactivo.

Un tensioactivo es una molécula capaz de reducir las tensiones interfaciales entre el medio en el cual está disuelto y cualquier otro fluido en contacto. Presenta carácter anfifílico; es decir, contiene una parte hidrófila y otra hidrófoba. Sin embargo, no todas las moléculas que presentan estos dos grupos en su estructura desarrollan comportamiento tensioactivo. Es necesario además que exista una relación mínima entre las características hidrófilas y lipófilas. Normalmente, esto se consigue cuando el número de átomos de carbono de la cadena

hidrocarbonada es superior a ocho. Finalmente, se requiere que el tensioactivo sea capaz de formar micelas (Domingo, 1995).

Los tensioactivos tienen la propiedad de adsorberse en las interfases, pero esa adsorción no es instantánea, tiene lugar según una cinética que depende de la composición del líquido, especialmente de su fuerza iónica, y del tipo de tensioactivo. Aunque la presencia de tensioactivos en las interfases, incluso en concentraciones bajas, del orden de 1 mM, reduce considerablemente la tensión superficial del medio, al superarse una determinada concentración, la tensión superficial se estabiliza. Es decir, se produce una discontinuidad. Este comportamiento se da también en muchas otras propiedades físico-químicas de la disolución (Cahn y Lynn, 1983; Shaw, 1980).

2.6 Balance hidrofílico-lipofílico.

El parámetro más utilizado de un tensioactivo es su HLB, que está relacionado con su capacidad emulsionante. Los tensioactivos solubles en agua favorecen la formación de emulsiones o/w, mientras que los solubles en aceite favorecen las emulsiones w/o (Bancroft, 1913). Según Griffin, el HLB es el balance del tamaño y fuerza entre la parte hidrófila y la parte lipófila de una molécula tensioactiva (Griffin, 1949) y se basa en la composición de los grupos moleculares del tensioactivo.

El concepto de HLB es esencialmente fisicoquímico, en el sentido que indica un balance entre las tendencias hidrofílicas y lipofílicas del emulsionante. Si se estudia la estabilidad de algunas emulsiones preparadas con un aceite idéntico y dos series de surfactantes diferentes, se observará el máximo de estabilidad para un mismo valor de HLB en las dos series. Sin embargo, el valor absoluto de la estabilidad puede ser considerablemente diferente de una serie a la otra. En general, se observa que la estabilidad absoluta de las emulsiones es superior para mezcla de surfactantes diferentes, que para surfactantes puros o mezclas de surfactantes de HLB vecinos.

2.6.1 Método de Davies (1959)

En 1959, Davies sugirió un método basado en el cálculo de un valor en los grupos químicos de la molécula. Continuando con el concepto introducido por Griffin, Davies propuso determinar el HLB de un tensioactivo según la Ecuación 1 basándose en la asignación de un número de grupo a los grupos químicos que componen el tensioactivo (Davies, 1959).

$$\text{HLB} = 7 + \Sigma \text{ número de grupo hidrófilo} + \Sigma \text{ número de grupo lipófilo} \quad (1)$$

La ventaja de este método es que toma en cuenta el efecto de grupos hidrófilos fuertes y débiles (Cuadro 2).

Cuadro 2. Valor de los grupos hidrofílicos y lipofílicos mediante el método de Davies.

Grupos hidrofílicos	Valor de los grupos hidrófilos
-SO ₄ ⁻ Na ⁺	38.7
-COO ⁻ K ⁺	21.1
-COO ⁻ Na ⁺	9.4
N (amina terciaria)	9.4
Éster (anillo de sorbitano)	6.8
Éster (libre)	2.4
-COOH	2.1
Hidroxilo (libre)	1.9
-O-	1.3
Hidroxilo (anillo de sorbitano)	0.5
Grupos lipofílicos	Valor de los grupos lipofílicos
-CH-	-0.475
-CH ₂ -	-0.475
CH ₃ -	-0.475
=CH-	-0.475

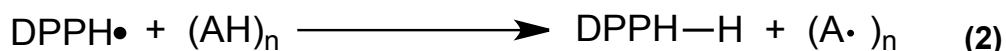
2.7 Métodos para evaluar la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante de un compuesto puede evaluarse *in vitro* por medio de procedimientos sencillos que examinan directamente dicha habilidad y que a la vez evalúan el posible efecto prooxidante sobre diferentes moléculas.

Las siguientes pruebas se realizarán para evaluar la actividad antioxidante de nuestro sistema lipofilizado.

- **Método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•).**

Brand-Williams *et al.* (1995) evaluaron la actividad de compuestos específicos o extractos usando el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) en una solución metanólica. La reducción del DPPH• se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH• absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales. El modelo que explica la actividad de un compuesto como antirradical se ejemplifica con la siguiente ecuación (Ecuación 2):



Donde AH es un antioxidante que actúa como antirradical donando átomos de hidrógeno, dando como resultado radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena, tal es el caso de los fenoles. El nuevo radical formado (A•) puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DPPH-A, A-A). La reacción entre el DPPH• y un compuesto depende de la conformación estructural del mismo, por lo que las comparaciones cuantitativas no siempre son apropiadas.

- **Análisis del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).**

El análisis de FRAP fue introducido por Benzie y Strain (Benzie y Strain, 1996; Pulido-Bravo y Saura-Calixto, 2000) para medir la actividad antioxidante total y se basa en la capacidad de los polifenoles para reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} . Este método fue modificado recientemente para su uso en microplacas de 96 pozos (Tsao y Deng, 2004), dando una reproducibilidad mejor y un rendimiento de procesamiento más alto de muestras. El análisis se basa en el poder reductor de un antioxidante que reduce el ion férrico (Fe^{3+}) al ion ferroso (Fe^{2+}); formando un complejo azul. Una

absorción alta a una longitud de onda de 700 nm indica un poder de reducción alto del fitoquímico, es decir una actividad antioxidante alta (Roginsky y Lissi, 2005).

- **Método del radical ABTS• (Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico).**

El radical ABTS• se genera a partir de su precursor el Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS•) (Prior, 2005). El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-Visible.

Es un radical artificial que no mimetiza bien la situación *in vivo*, termodinámicamente puede ser reducido por compuestos que tengan un potencial redox menor que el del ABTS• (0.68V), pudiendo reaccionar con el radical, muchos compuestos fenólicos con un potencial más bajo. El punto final de la reacción lo marca la sustancia antioxidante empleada, fijando tiempos cortos o muy elevados que pueden interferir en los resultados finales, lo cual, es un inconveniente. La ventaja de este ensayo es que puede realizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles, eligiendo el disolvente apropiado en cada caso (Prior, 2005).

Existen varios métodos de generación del radical ABTS•:

- Enzimáticamente (mioglobina, peroxidasa de rábano).
- Químicamente (Dióxido de manganeso, persulfato potásico, radicales peroxilo).
- Electroquímicamente.

En el presente estudio, se ha realizado el método ABTS• generando el radical químicamente utilizando persulfato potásico. La oxidación con persulfato potásico se lleva a cabo a temperatura ambiente, en ausencia de luz, en un tiempo de 12 a 16 h. El persulfato potásico y el ABTS• reaccionan estequiométricamente (1:0.5). Una vez generado el radical la medida se realiza mediante un ensayo de post-adición.

3. ANTECEDENTES

Una de las grandes mejoras de la actividad antioxidante ha sido mediante la alteración de la polaridad de un antioxidante (por ejemplo, la adición de una molécula lipofílica a un antioxidante hidrofílico), esto ha sido observado sólo en unos pocos estudios (Figueroa y Villeneuve, 2005). En el 2005 se estudió la eficacia antioxidante del ascorbato de retinilo, que es un conjugado del ácido retinoico lipofílico y el ácido ascórbico, antioxidante soluble en agua, donde se observó una mejora en comparación con la del antioxidante principal (Abdulmajed *et al.* 2005).

En estudios anteriores se observó que la conjugación de un antioxidante liposoluble (α -tocoferol) con fosfatidilcolina, aumenta la actividad antioxidante en manteca de cerdo en comparación con la adición de α -tocoferol y fosfatidilcolina solos o en combinación. El aumento del efecto antioxidante de α -tocoferol-fosfatidilcolina ha sido explicado por su capacidad para formar micelas inversas en aceite con una cantidad baja de agua (trazas), resultando en una mejor accesibilidad en la eliminación de radicales grupo cromano-6-ol para el sitio polar, donde las reacciones de iniciación del hierro tienen lugar (Koga y Terao, 1994).

La β -lactoglobulina fue modificada químicamente adjuntando diferentes niveles de ácido esteárico, y se evaluó el efecto sobre la hidrofobicidad, así como sus propiedades emulsionantes y espumantes. La incorporación de los ligandos hidrófobos condujo a un aumento de las interacciones hidrofóbicas, resultando una disminución de la solubilidad con el grado de incorporación. Las mediciones de hidrofobicidad de superficie mostraron que las dos sondas de fluorescencia 8-anilino-naftaleno-1-sulfonato (ANS) y ácido *cis*-parinámico (CPA) que se utilizaron no eran equivalentes. Se observó cierta mejora de las propiedades emulsionantes y espumantes en niveles bajos y medios de incorporación, que disminuyeron cuando el grado de unión del ácido graso fue aumentando. La alta solubilidad y la hidrofobicidad de la superficie de la β -lactoglobulina fueron necesarios para mejorar las propiedades emulsionantes (Akita y Nakai, 1990).

La hidrofobicidad de los ácidos fenólicos se mejoró por lipofilización química o enzimática, por esterificación de la porción carboxílica del ácido fenólico con un alcohol graso, para obtener una molécula anfifílica, que debe mantener sus propiedades funcionales originales (antioxidante, antimicrobiano, filtro UV, etc.) (Nihei *et al.* 2004).

Guyot *et al.* (2000) sintetizaron algunos ésteres fenólicos por esterificación directa de alcoholes grasos utilizando una lipasa inmovilizada termoestable B (*Novozyme 435*) de *Candida antarctica*. En este estudio fueron probados diferentes ácidos fenólicos (cinámico, cafeico, dihidrocafeico, ferúlico, 3,4-dimetoxicinámico, ácido clorogénico) y varios alcoholes grasos [butanol (C4), octanol (C8), dodecanol (C12), *cis*-9-octadecen-1-ol (alcohol oleico) (C18:1)].

Existen una serie de trabajos recientes donde examinaron la actividad de algunos antioxidantes (ácido clorogénico, ácido rosmarínico, hidroxitirosol, ácido dihidrocafeico y rutina) cuya polaridad fue modificada por esterificación con cadenas alquilo de longitud variable (1-20 carbonos) (Laguerre *et al.* 2009; Sorensen *et al.* 2010).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la industria alimentaria, el uso de antioxidantes eliminadores de radicales libres es una de las principales estrategias para retrasar las reacciones de oxidación y así mejorar la conservación de los alimentos mediante la inhibición en las etapas de iniciación y de propagación de la oxidación. Debido a la complejidad del proceso de oxidación, la selección de antioxidantes para diversas aplicaciones basadas en sus propiedades químicas intrínsecas, incluyendo la velocidad de formación de radicales libres y la estequiometría de la transferencia de electrones, no muestra ser apropiado para predecir la actividad antioxidante en todos los sistemas alimentarios.

La reactividad química de moléculas antioxidantes hacia los radicales libres ha sido ampliamente explorada y en gran medida aclarada en las últimas décadas. Sin embargo, los factores determinantes subyacentes a su mecanismo de acción, y sobre todo su eficiencia real en un medio dado, no se han determinado.

5. JUSTIFICACIÓN.

La eficacia de un antioxidante se basa principalmente en su reactividad química (como captador de radicales o como quelante de metales), pero también es importante la forma en que interactúa con otros componentes de los alimentos, su concentración, y especialmente de su ubicación física en diferentes sistemas alimenticios homogéneos o heterogéneos (por ejemplo, el aceite a granel o aceite en agua). Por esa razón, la transformación química de los antioxidantes en donde se modifican sus características fisicoquímicas, tales como el aumento de su lipofilia o hacerlos anfífilos, puede ser importante para su rendimiento antioxidante.

La modificación covalente de antioxidantes a través de lipofilización es un importante campo de investigación dirigida a desarrollar antioxidantes con mayor eficacia. En consecuencia, la lipofilización aparece cada vez más como un paso crucial en el diseño de nuevos aditivos antioxidantes y fármacos. Básicamente, la lipofilización consiste en una modificación química donde se une una porción de una molécula con propiedades lipofílicas a una molécula hidrofílica para aumentar sus propiedades químicas y físicas.

6. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y evaluar el efecto de la lipofilización a partir de un antioxidante hidrofílico (ácido ascórbico, carvacrol, quercetina, resveratrol y vainillina) y un antioxidante lipofílico (ácido linoleico conjugado) mediante una reacción de esterificación para mejorar sus propiedades antioxidantes.

6.1. Objetivos específicos

- Desarrollar un sistema lipofilizado de antioxidantes utilizando una reacción química (esterificación).
- Evaluar las propiedades antioxidantes de un sistema compuesto de ácido ascórbico y ácido linoleico conjugado.
- Evaluar las propiedades antioxidantes de un sistema compuesto de carvacrol y ácido linoleico conjugado.
- Evaluar las propiedades antioxidantes de un sistema compuesto de quercetina y ácido linoleico conjugado.
- Evaluar las propiedades antioxidantes de un sistema compuesto de resveratrol y ácido linoleico conjugado.
- Evaluar las propiedades antioxidantes de un sistema compuesto de vainillina y ácido linoleico conjugado.
- Evaluar las propiedades antioxidantes de los derivados o fracciones obtenidas.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas y toxicológicas de los antioxidantes precursores y de los sistemas lipofilizados mediante el programa OSIRIS Data Warrior v.4.4.3.
- Seleccionar el mejor sistema lipofilizado con mejores propiedades antioxidantes.

7. HIPÓTESIS

El sistema lipofilizado utilizando ácido linoleico conjugado (CLA) posee mejores propiedades antioxidantes en comparación con los compuestos precursores.

8. METODOLOGÍA.

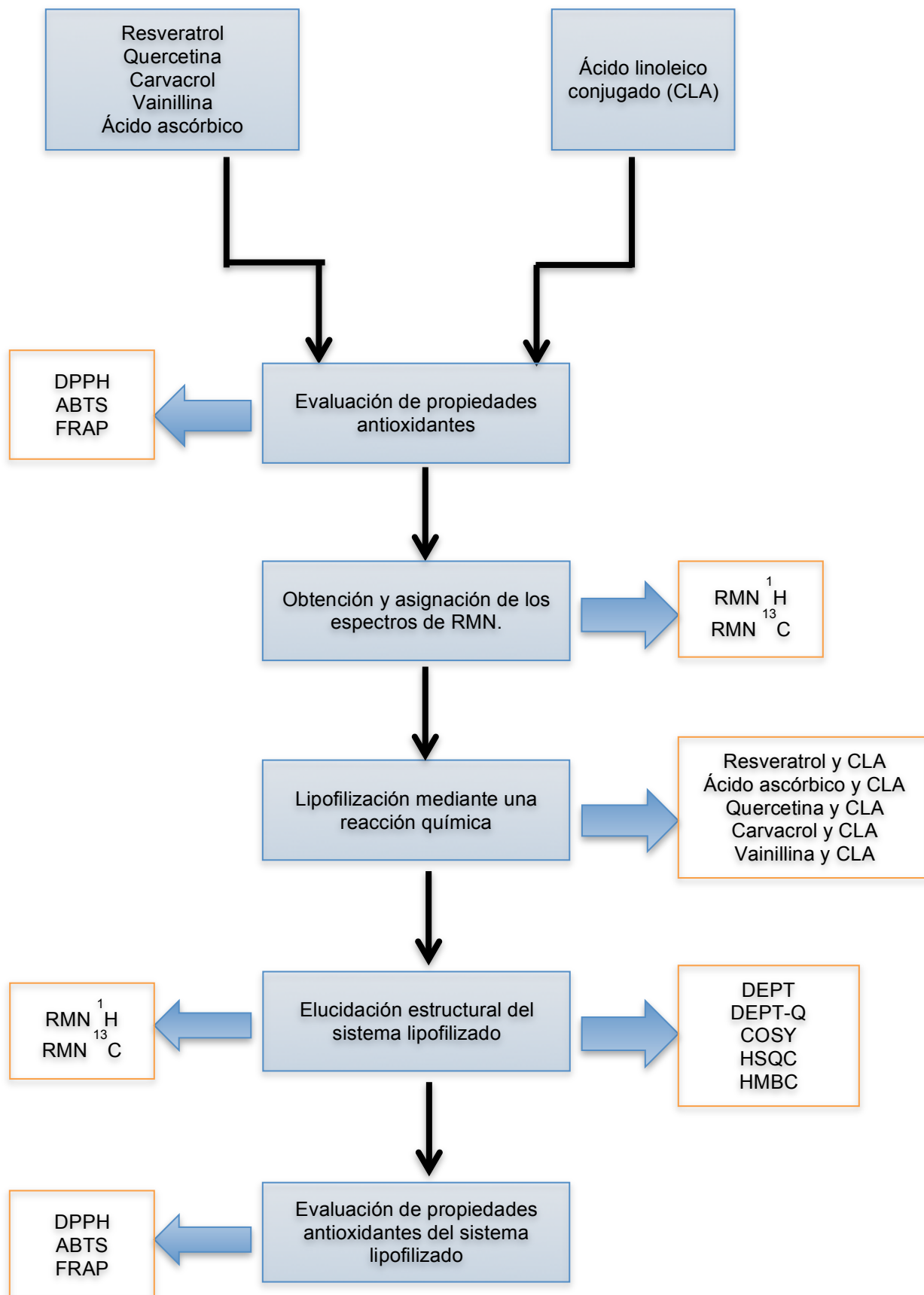


Figura 8. Esquema general de trabajo.

En la Figura 8 se muestra el esquema general de trabajo el cual se dividió en dos etapas, la primera parte consistió en la evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos precursores así como la obtención y asignación de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , en la segunda etapa se realizó la lipofilización mediante una reacción de esterificación y la evaluación de la actividad antioxidante de cada uno de los sistemas lipofilizados.

8.1 Reacción de Esterificación.

Un ácido carboxílico se puede transformar directamente al éster correspondiente cuando se calienta con un alcohol en presencia de un ácido mineral como catalizador. Este método de síntesis se conoce como reacción de Fischer (Figura 9). Esta reacción es reversible y, cuando se usan cantidades equivalentes de los reactivos, generalmente alcanza el equilibrio cuando hay una cantidad apreciable tanto de reactivos (alcohol y ácido carboxílico) como de productos (éster y agua).

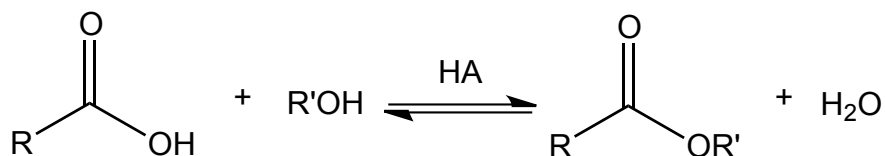


Figura 9. Reacción de esterificación de Fisher.

En éste trabajo de investigación se realizó la lipofilización mediante una reacción de esterificación utilizando como catalizador ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), en las esterificaciones que se realizaron se empleó como porción carboxílica al ácido linoleico conjugado, y como porción alcohólica al ácido ascórbico (Figura 10), resveratrol (Figura 11), vainillina (Figura 12), carvacrol (Figura 13) y quercetina (Figura 14).

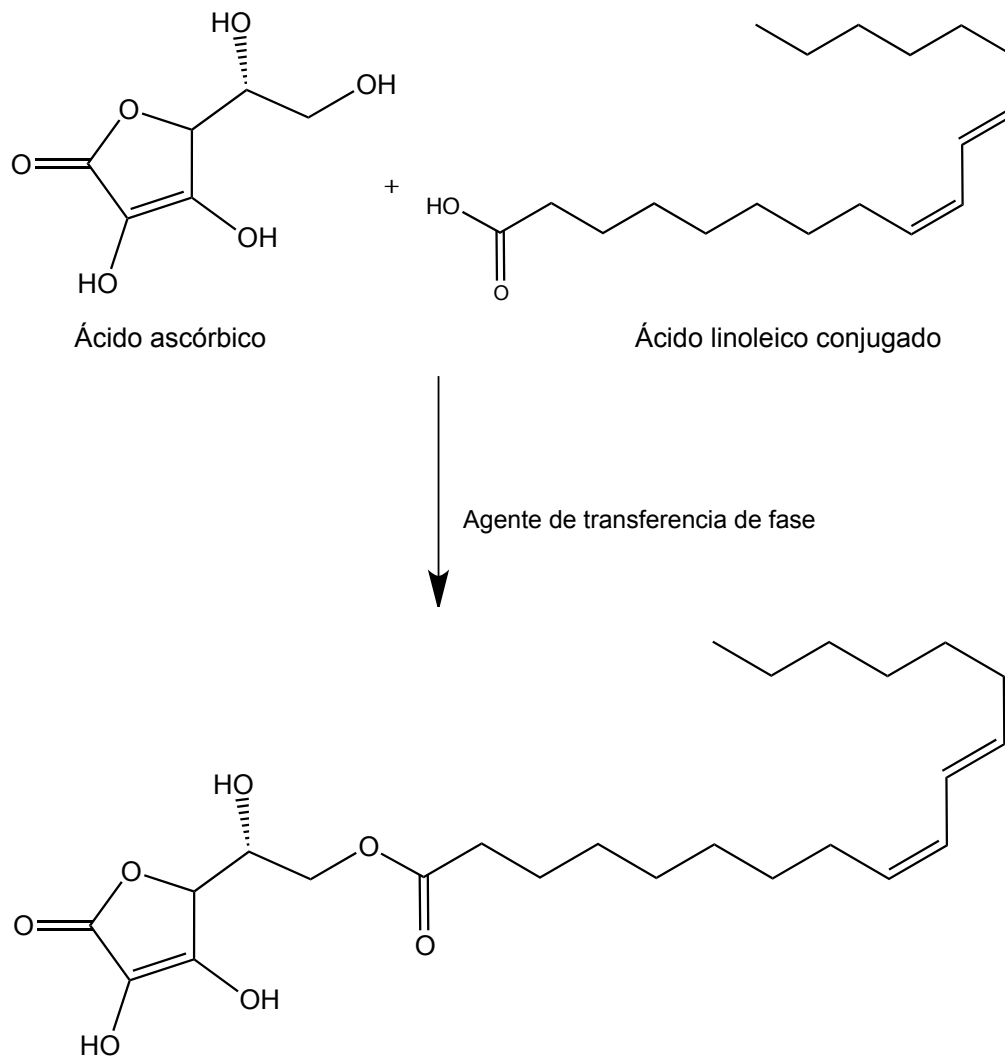


Figura 10. Reacción de esterificación del ácido ascórbico y el ácido linoleico conjugado.

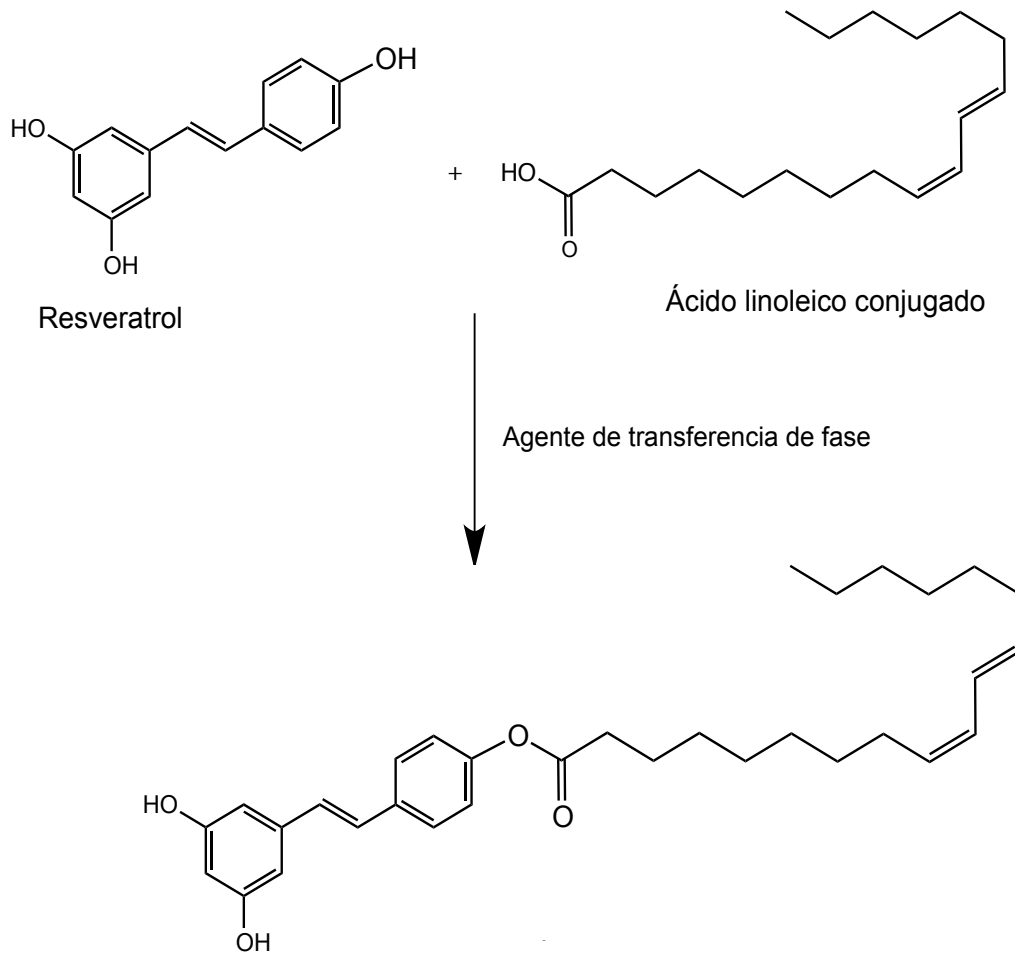


Figura 11. Reacción de esterificación de resveratrol y el ácido linoleico conjugado.

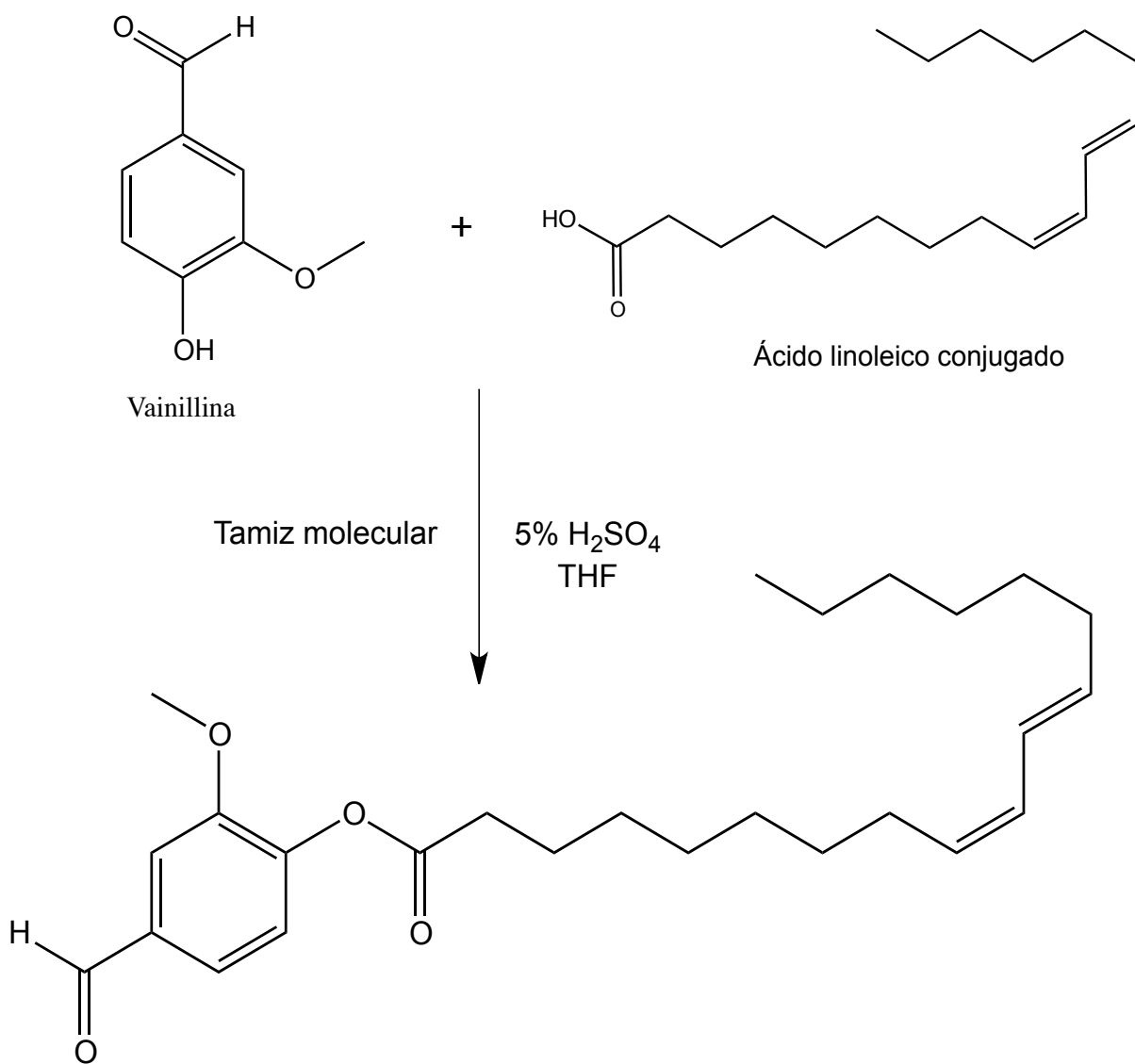


Figura 12. Reacción de esterificación de vainillina y el ácido linoleico conjugado.

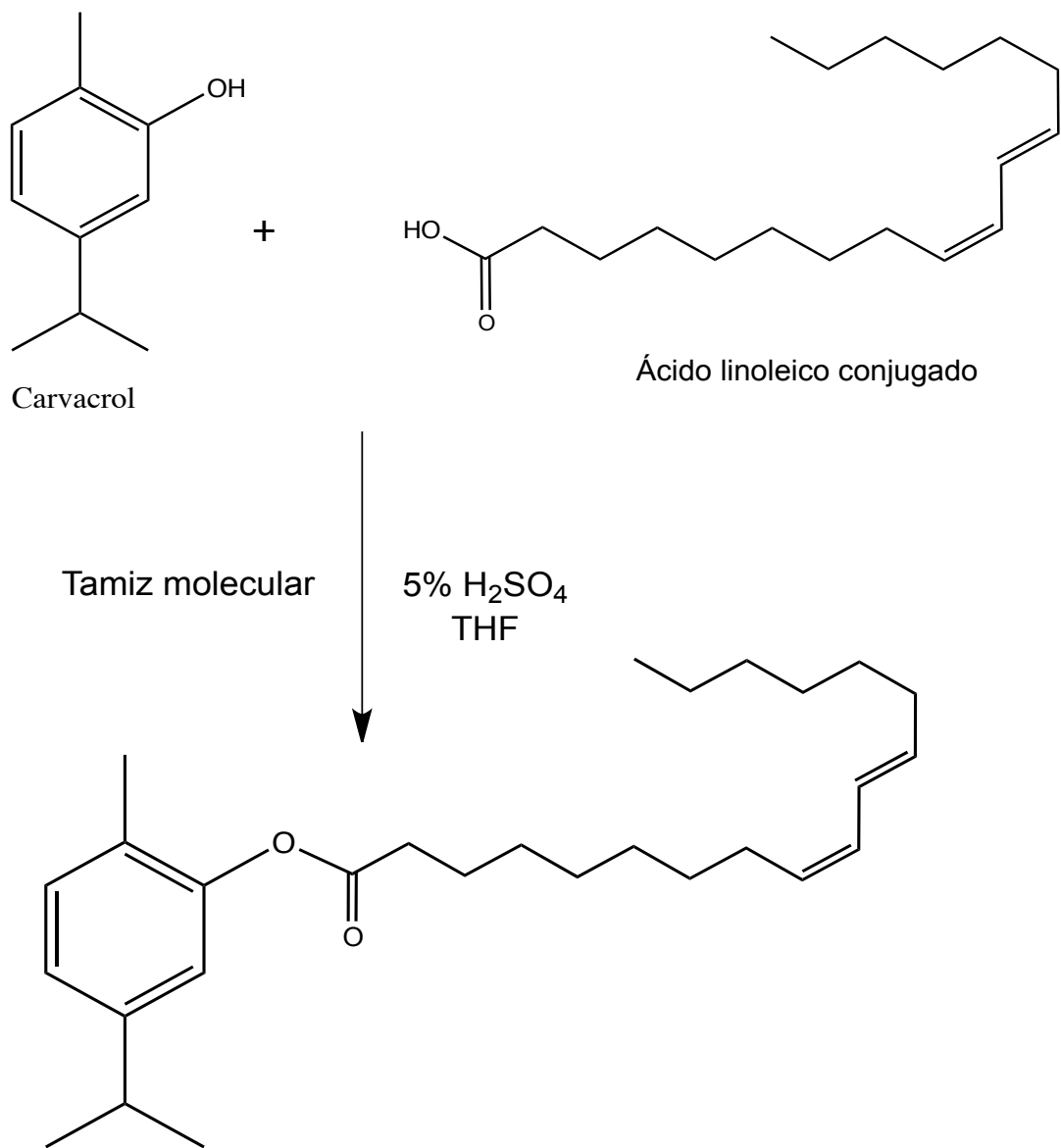


Figura 13. Reacción de esterificación del carvacrol y el ácido linoleico conjugado

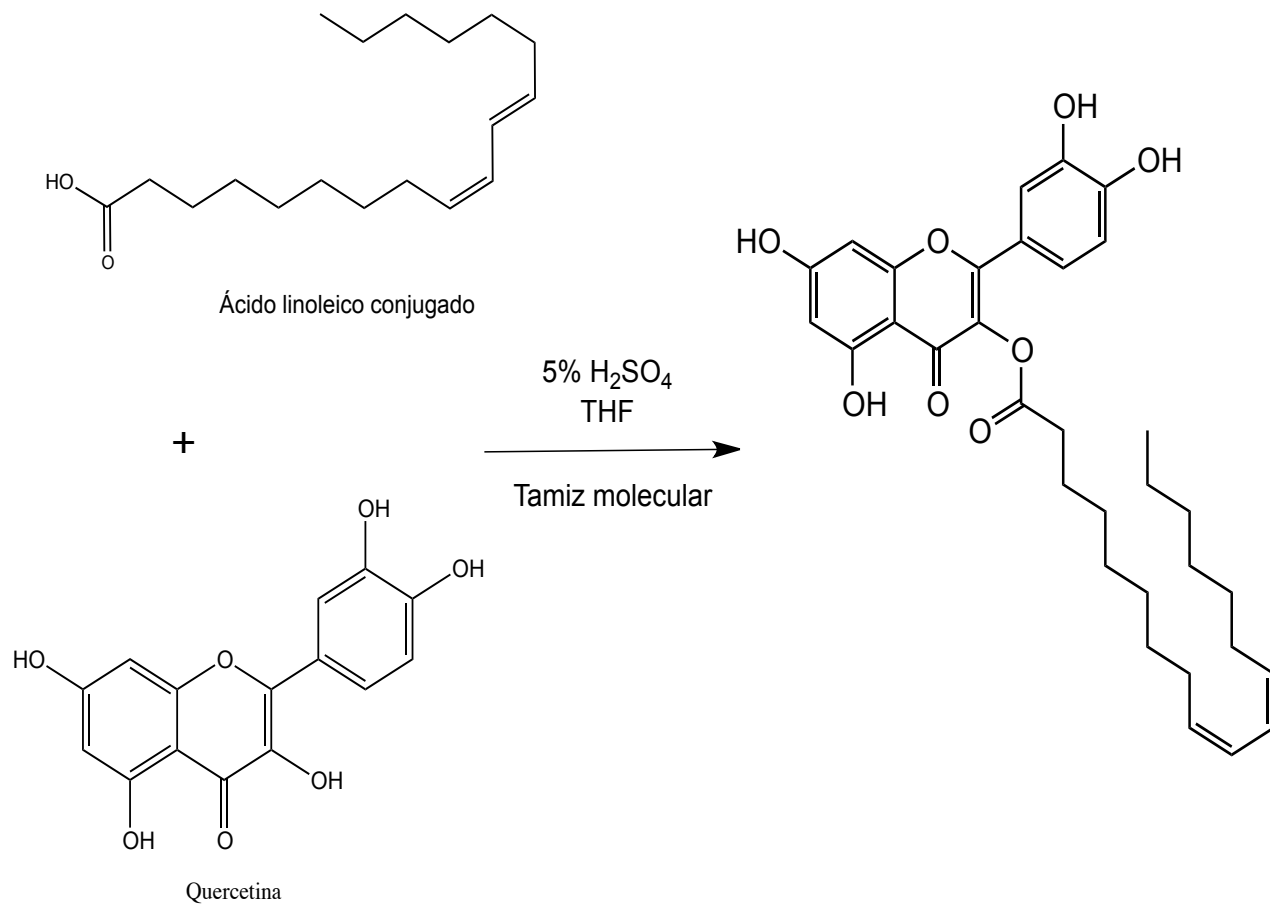


Figura 14. Reacción de esterificación de la quercetina y el ácido linoleico conjugado.

8.2 Lipofilización del ácido ascórbico y el ácido linoleico conjugado.

La lipofilización del ácido ascórbico y el ácido linoleico conjugado se llevó a cabo mediante la reacción de esterificación obteniéndose un rendimiento del 70%; la reacción se logró después de 14 horas de reacción observándose la formación de un nuevo compuesto, esto se determinó mediante cromatografía en capa fina utilizando como fase móvil Hexano/AcOEt 6:4 (v:v) que fue la fase móvil que logró la mejor separación del sistema lipofilizado.

8.2.1 Purificación de la reacción de lipofilización del ácido ascórbico y ácido linoleico conjugado.

La purificación del compuesto lipofilizado se realizó mediante cromatografía en columna utilizando una fase móvil AcOEt/MeOH 9:1 (v:v) y la fase estacionaria fue silica gel (100 a 200 mallas) obteniéndose las fracciones correspondientes que posteriormente se observaron mediante cromatografía en capa fina del sistema lipofilizado.

8.3 Lipofilización de carvacrol y ácido linoleico conjugado.

La lipofilización del carvacrol y el ácido linoleico conjugado se realizó mediante una reacción de esterificación mediante catálisis ácida utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4) grado reactivo, la relación molar fue de 1:1 obteniéndose un rendimiento del 80%, la lipofilización se logró a las 14 horas de reacción, detectándose la formación de un nuevo compuesto mediante la cromatografía en capa fina.

8.3.1 Purificación de la reacción de lipofilización del carvacrol y ácido linoleico conjugado.

La purificación del compuesto lipofilizado se realizó mediante cromatografía en columna utilizando una fase móvil AcOEt/Hexano 8:2 (v:v) y la fase estacionaria fue silica gel (100 a 200 mallas) obteniéndose las fracciones correspondientes del sistema lipofilizado, que posteriormente se observaron mediante cromatografía en capa fina.

8.4 Lipofilización de quercetina y ácido linoleico conjugado.

El sistema lipofilizado compuesto por quercetina y ácido linoleico conjugado como antioxidantes precursores se realizó mediante una reacción de esterificación utilizando como catalizador ácido sulfúrico (H_2SO_4), la relación molar fue de 1:1 de igual forma que en los sistemas lipofilizados anteriores; la lipofilización se logró a las 11 horas de reacción y se obtuvo un rendimiento del 75%, la detección del sistema lipofilizado se realizó mediante cromatografía en capa fina.

8.4.1 Purificación de la reacción de lipofilización de quercetina y ácido linoleico conjugado.

La purificación del compuesto lipofilizado se realizó mediante cromatografía en columna utilizando una fase móvil AcOEt/MeOH 8:2 (v:v) y la fase estacionaria fue silica gel (100 a 200 mallas) obteniéndose las fracciones correspondientes al sistema lipofilizado mediante cromatografía en capa fina.

8.5 Lipofilización de resveratrol y ácido linoleico conjugado.

La lipofilización del resveratrol y ácido linoleico conjugado se obtuvo después de 9 horas de reacción y se obtuvo un rendimiento del 50%, se realizó mediante catálisis ácida utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4); la formación del sistema lipofilizado fue detectada mediante cromatografía en capa fina.

8.5.1 Purificación de la reacción de lipofilización de resveratrol y ácido linoleico conjugado.

La purificación del compuesto lipofilizado se realizó mediante cromatografía en columna utilizando una fase móvil AcOEt/Hexano 7:3 (v:v) y la fase estacionaria fue silica gel (100 a 200 mallas) obteniéndose las fracciones correspondientes al sistema lipofilizado mediante cromatografía en capa fina.

8.6 Lipofilización de vainillina y ácido linoleico conjugado.

La formación del sistema lipofilizado de vainillina y ácido linoleico conjugado tuvo un tiempo de reacción de 13 horas obteniéndose un rendimiento del 70%, el seguimiento de la misma se realizó mediante cromatografía en capa fina.

8.6.1 Purificación de la reacción de lipofilización de vainillina y ácido linoleico conjugado.

La purificación del compuesto lipofilizado se realizó mediante cromatografía en columna utilizando una fase móvil AcOEt/Hexano 6:4 (v:v) y la fase estacionaria fue silica gel (100 a 200 mallas) obteniéndose las fracciones correspondientes al sistema lipofilizado mediante cromatografía en capa fina.

8.7 Metodos para evaluar la actividad antioxidante.

8.7.1 Método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•).

La capacidad de captura de radicales libres de los compuestos y sistemas lipofilizados se determinó a través del método del radical DPPH•, este radical libre presenta un color violeta intenso que al ser estabilizado por una sustancia antioxidante vira a un color amarillo pálido. Este cambio se detecta a 520 nm (Modificación del método de Velázquez *et al.* 2007).

Todas las muestras se evaluaron a 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM y 25 mM, como blanco control se utilizó etanol absoluto y como control estándar una solución v/v (1:1) de DPPH• 300 µM y etanol, la cual representó el 0% de actividad antioxidante. Se tomaron 100 µL de las muestras por triplicado y se colocaron en una placa de 96 pozos, posteriormente se adicionaron 100 µL de DPPH• 300 µM en etanol. La mezcla de reacción se agitó e incubó por 30 minutos al resguardo de la luz, finalmente se midió la absorbancia a 520 nm contra el blanco control. Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas Multiskan Spectrum (Thermo Electron Corporation). Para obtener el porcentaje de inhibición del radical DPPH• se aplicó la siguiente fórmula (Ecuación 3):

$$\%Actividad\ antioxidante = \left[1 - \frac{Absorbancia\ de\ la\ muestra}{Absorbancia\ del\ estándar} \right] \times 100$$

8.7.2 Análisis del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).

La capacidad reductora de los compuestos precursores y de los sistemas lipofilizados se determinó mediante el método de FRAP. A un pH bajo se coloca el complejo de Fe^{3+} -TPTZ, este complejo en presencia de agentes reductores se reduce a Fe^{2+} -TPTZ y desarrolla un color azul intenso con un máximo de absorción a 600 nm (Griffin y Bhagooli, 2004).

La solución para realizar este método se describe a continuación: se mezcló una solución amortiguadora de acetato de sodio 300 mM (pH 3.6), con el reactivo TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) 10 mM y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM en una proporción 10:1:1, esta solución se preparó inmediatamente antes de realizar las determinaciones y se utilizó a temperatura ambiente.

La solución amortiguadora de acetato de sodio 300 mM se realizó mezclando 3.1 g de acetato de sodio trihidratado ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) con 16 mL de ácido acético glacial y se llevó a un volumen de 1 L con agua destilada. Mientras que la solución de TPTZ 10 mM se disolvió en una solución de HCl 40 mM.

Una vez preparadas las soluciones el método consiste en lo siguiente: Se colocaron 150 μL por triplicado del reactivo de trabajo (FRAP) en una microplaca de 96 pozos y se midió la absorbancia a 595 nm para obtener la lectura blanco (lectura inicial). Posteriormente, se colocaron 5 μL de muestra a cada pozo. Se incubó durante 8 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm (lectura final). Para obtener el valor de FRAP de cada muestra, a la lectura inicial se le resta la lectura final. Las mediciones se realizaron en un lector de microplacas Multiskan Spectrum (Thermo Electron Corporation). Los valores de FRAP se expresaron como micromoles (μmoles) equivalentes de TROLOX (un análogo hidrosoluble de la vitamina E)/L.

8.7.3 Método del radical ABTS• (Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico).

El radical ABTS• se genera a partir de su precursor el Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS•) (Prior, 2005). El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible.

La preparación del radical ABTS• se llevó a cabo mezclando partes iguales la solución de ABTS 7 mM y la de persulfato potásico 2.45 mM. La mezcla se mantiene en oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas para la formación del radical. Esta solución es estable durante dos días. La solución se diluye en etanol para obtener una absorbancia de 0.8 a 730 nm. Esto se consigue mezclando 2.5 mL de la solución del radical con aproximadamente 100 mL de etanol.

8.8 Metodos para la identificación de los productos.

8.8.1 Resonancia Magnética Nuclear.

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es la técnica que mayor información estructural nos proporciona. Ello se debe a que se puede determinar los núcleos de los átomos y el entorno molecular sobre cada uno de los mismos.

Los átomos más abundantes en los compuestos orgánicos, H y C, se pueden determinar fácilmente con cantidades pequeñas de muestra. Además de los átomos de H y C, se pueden observar otros átomos, siempre que haya una abundancia suficiente (en función de la sensibilidad y la abundancia relativa de cada uno de ellos) de un isótopo magnéticamente activo (momento magnético).

Los estudios por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se llevaron a cabo en un espectrómetro marca BRUKER modelo Ascend 500 MHz utilizando como disolventes metanol deuterado (CD_3OD) y cloroformo deuterado (CDCl_3).

8.9 Evaluación teórica de los parámetros fisicoquímicos y toxicológicos mediante el uso de herramientas computacionales.

Para el análisis de los parámetros toxicológicos de los antioxidantes precursores y de los sistemas lipofilizados se utilizó el software OSIRIS Data Warrior v.4.4.3 de Actelion Pharmaceuticals Ltd (Ingeniería Thomas Sander Actelion forcefield), este programa permite la visualización y análisis de datos químicos y/o biológicos utilizando una plataforma flexible que contiene una amplia base de datos denominada OSIRIS. Mediante este software los compuestos químicos pueden ser agrupados por sus similitudes estructurales permitiendo la predicción de propiedades fisicoquímicas, toxicológicas y su actividad a partir de estructuras químicas y métodos quimioinformáticos especializados.

Con el programa OSIRIS Data Warrior v.4.4.3 se calcularon los parámetros de cLog P, cLog S, mutagenicidad, tumorigenicidad, efectos sobre la reproducción y efectos irritantes tanto en los antioxidantes precursores como en los sistemas lipofilizados.

8.10 Análisis estadístico

Los datos analizados correspondientes a la actividad antioxidante se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías utilizando la prueba de comparación de medias Tukey y se les realizó una prueba de correlación de Pearson. Las medias y desviaciones estándar de las actividades antioxidantes y gráficas se graficaron utilizando el paquete estadístico SigmaPlot 13.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

9.1 Evaluación de la actividad antioxidante de los antioxidantes precursores.

Se evaluó la actividad antioxidante de los compuestos precursores (ácido ascórbico, ácido linoleico conjugado, carvacrol, quercetina, resveratrol y vainillina) que se utilizaron para cada uno de los diferentes sistemas lipofilizados, mediante los métodos del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•), por el método del análisis del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP) y el método del radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS•); en el Cuadro 3 se observa que el ácido ascórbico presentó una alta actividad antioxidante en los métodos de DPPH• y ABTS• cuyos porcentajes de inhibición fueron 96.70% y 95.27% respectivamente, estos resultados coinciden con lo reportado por Brand-Williams *et al.* (1995), ellos evaluaron la actividad antioxidante del ácido ascórbico obteniendo un porcentaje de inhibición del radical DPPH• del 93%; se obtuvieron resultados similares a lo reportado por Beena *et al.* (2012) donde evaluaron diferentes antioxidantes mediante el método del DPPH• obteniendo valores de porcentaje de inhibición del radical DPPH• para el ácido ascórbico del 95%, este comportamiento se debe a la disposición de los grupos hidroxilos del ácido ascórbico los cuales presentan generalmente una significativa actividad captadora frente a los radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) y 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS•), de esta forma podemos justificar la idoneidad de evaluar la actividad antioxidante del ácido ascórbico mediante los métodos de DPPH• y ABTS• (Brand-Williams *et al.* 1995) .

El carvacrol presentó un porcentaje de inhibición del 79.69% para el radical DPPH• el cual presenta valores más altos que lo reportado por Beena *et al.* (2012), donde el porcentaje de inhibición fue del 40% para el método del DPPH•, este aumento en el porcentaje se debe a la pureza del antioxidante, ya que Beena *et al.* (2012) utilizaron una pureza menor a la que se utilizó en este trabajo que fue del 98% de pureza. La actividad antioxidante del carvacrol se le atribuye al grupo hidroxilo y a los dobles enlaces del anillo aromático que conforman su estructura química,

estos grupos funcionales permiten la incorporación de los radicales libres y la neutralización de estos, permitiendo que puedan ser eliminados (Beena *et al.* 2012).

El porcentaje de inhibición del radical DPPH• en la quercetina fue del 78.96%, observándose valores similares con lo reportado por Chen *et al.* (2008) y Ravichandran *et al.* (2013), presentando valores para la quercetina del 76.6% y 76.33% respectivamente; la adecuada actividad antioxidante que se puede observar en la quercetina es gracias a su estructura química, principalmente de sus grupos hidroxifenólicos ya que estos son los encargados de realizar las reacciones de oxido-reducción ante estos radicales libres (Ravichandran *et al.* 2013).

Los porcentajes de inhibición del radical ABTS• y DPPH• para el resveratrol fueron 95.65% y 80.46% respectivamente. La alta actividad antioxidante del resveratrol se le confiere principalmente a su estructura química, gracias a sus dos anillos fenólicos que están unidos mediante un doble enlace de estireno favoreciendo la incorporación de estos radicales mediante la transferencia de electrones; estos porcentajes coinciden con lo reportado por Gülcin (2008), donde se obtuvo un porcentaje de inhibición del radical DPPH• de 96.6% y para el radical ABTS• un porcentaje de inhibición del 70%; estos valores permiten indicar que estos métodos son idóneos para evaluar la actividad antioxidante del resveratrol. En la vainillina el valor de porcentaje de inhibición del radical ABTS• fue del 90.94% observándose la gran afinidad de la vainillina con el radical ABTS•, ya que este radical interactúa con compuestos tanto hidrosolubles como liposolubles, este porcentaje que se presentó en la vainillina es ligeramente más alto a lo reportado por Shakeel *et al.* (2016), quienes obtuvieron un valor del 60% de inhibición del radical ABTS•. La actividad antioxidante de la vainillina por el método del radical DPPH• presentó un porcentaje de inhibición del 77.53%; Tai *et al.* (2010) estudiaron una concentración menor de vainillina obteniendo un porcentaje de inhibición del 45% para el método del DPPH•, esto se debe a que la afinidad del

radical DPPH• se utiliza en compuestos con una mayor polaridad que la de la vainillina ya que la vainillina presenta una polaridad intermedia, es por eso que el porcentaje disminuye en comparación con la del radical ABTS• (Tai *et al.* 2010).

Los valores más altos en el método de FRAP se presentaron en la quercetina cuyo valor fue de 14066.50 μmol de TROLOX/L, el valor con menor cantidad de μmol de TROLOX/L se presentó en el ácido linoleico conjugado (Cuadro 3) ya que este no tiene una alta capacidad para reducir el Fe^{+3} a Fe^{+2} , esto se debe a que los dobles enlaces de la estructura del ácido linoleico conjugado no son capaces de ceder electrones de manera tan fácil en comparación con los demás antioxidantes (Chin *et al.* 1992)

Cuadro 3. Actividad antioxidante de los compuestos precursores.

Antioxidantes	DPPH• Porcentaje de inhibición	ABTS• Porcentaje de inhibición	FRAP μmol de TROLOX/L
Ácido ascórbico	96.70 \pm 0.95 ^a	95.27 \pm 0.80 ^a	2312.17 \pm 1379.29 ^a
Carvacrol	79.69 \pm 0.70 ^b	93.95 \pm 0.90 ^a	3739.83 \pm 202.26 ^{a,b}
Quercetina	78.96 \pm 0.80 ^{b,c}	98.24 \pm 0.40 ^b	14066.50 \pm 0.001 ^a
Resveratrol	80.46 \pm 0.50 ^b	95.65 \pm 1.00 ^a	13196.50 \pm 13.23 ^{a,b}
Vainillina	77.53 \pm 0.50 ^c	90.94 \pm 0.40 ^c	10263.17 \pm 213.33 ^c
Ácido linoleico conjugado	77.50 \pm 0.02 ^c	68.87 \pm 0.70 ^d	3566.50 \pm 203.36 ^d

Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones \pm la desviación estándar a una concentración de 25 mM. Letras iguales en columnas significa no diferencias significativas.

9.2 Obtención y asignación de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de los antioxidantes precursores.

La determinación de la identidad de las moléculas empleadas como materias primas en este estudio, fue realizada mediante la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), evaluando los desplazamientos químicos correspondientes a cada porción de las moléculas en los espectros de Hidrógeno-1 (^1H) y Carbono-13 (^{13}C). Para la determinación inequívoca de los desplazamientos químicos se utilizaron experimentos como DEPT y DEPT-Q que permitieron diferenciar los metilos ($-\text{CH}_3$) y metinos ($-\text{CH}$) de los metilenos ($-\text{CH}_2$) y carbonos cuaternarios; y experimentos bidimensionales para observar las correlaciones de cada uno de los átomos que se aprecian en cada uno de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (Anexos). Estos espectros de RMN de los antioxidantes precursores sirvieron como referencia para el estudio posterior de los sistemas lipofilizados, los cuales también fueron analizados por esta técnica espectroscópica.

9.3 Lipofilización del ácido ascórbico-ácido linoleico conjugado y evaluación de los espectros de RMN de ^1H .

En las Figuras 15 y 16 se muestran los espectros de RMN de ^1H del ácido ascórbico y del sistema lipofilizado (ácido ascórbico-ácido linoleico conjugado) respectivamente; se realizó la asignación correspondiente de cada una de las señales que se observaron en los espectros, indicando los diferentes átomos de hidrógeno de la molécula del ácido ascórbico, así como del sistema lipofilizado. De acuerdo a los desplazamientos químicos se logró observar en la Figura 15 señales sencillas alrededor de $\delta = 3.3\text{-}3.8$ ppm que corresponden a los hidrógenos de los grupos hidróxilos del ácido ascórbico, en $\delta = 3.9$ ppm se presentó una señal sencilla correspondiente a los hidrógenos del grupo metileno ($-\text{CH}_2$) que se encuentra a campo bajo debido a que se encuentra enlazado con un átomo de oxígeno que lo desplaza a valores más altos en el espectro de RMN de ^1H ; alrededor de $\delta = 4.8$ ppm se observa la señal correspondiente al hidrógeno del grupo metino ($-\text{CH}$) que al estar unido a un átomo de oxígeno se observa en

campo bajo, por último en la Figura 15 se observó una señal sencilla alrededor de $\delta = 5$ ppm que corresponde al hidrógeno del grupo metino (-CH) que se encuentra en el anillo aromático del ácido ascórbico. En la Figura 16 correspondiente al espectro de RMN de ^1H del sistema lipofilizado se observaron señales sencillas alrededor de $\delta = 0.98$ ppm que corresponden a los hidrógenos del grupo metilo (-CH₃) de la cadena hidrocarbonada del ácido linoleico conjugado lipofilizado con el ácido ascórbico, esta señal no se presentó en el espectro de RMN de ^1H del ácido ascórbico (Figura 15) ya que en el ácido ascórbico no hay hidrógenos de grupos metilos; alrededor de $\delta = 1.1-2.3$ ppm en el espectro de RMN de ^1H del sistema lipofilizado (Figura 16) se muestran señales múltiples que corresponden a los hidrógenos de los grupos metilenos (-CH₂) de la cadena hidrocarbonada de la porción correspondiente al ácido linoleico conjugado. Se puede observar que la señal que se encuentra alrededor de $\delta = 4.2$ ppm en el espectro del sistema lipofilizado (Figura 16) corresponde a los hidrógenos del grupo metileno (-CH₂) que está unido a un oxígeno, este grupo metileno puede apreciarse también en el espectro del ácido ascórbico (Figura 15) donde aparece alrededor de $\delta = 3.9$ ppm mostrándose más desplazado a campo alto a diferencia con el metileno del sistema lipofilizado ya que éste se encuentra desplazado a campo bajo por el efecto que ejerce el grupo carbonilo (=CO) y el átomo de oxígeno; esta señal ($\delta = 4.2$ ppm) nos permite observar si el compuesto se encuentra lipofilizado ya que al ser un metileno (-CH₂) unido a un grupo éster (-COO) provoca que tenga una mayor desprotección y a su vez un mayor desplazamiento químico, además que las señales de grupos metilenos unidos a oxígeno de éster aparecen alrededor de $\delta = 4-5$ ppm; también aparecen señales múltiples acopladas alrededor de $\delta = 5.2-6.3$ ppm que corresponden a los hidrógenos de los grupos metinos (-CH) de los enlaces vinílicos conjugados (Figura 16).

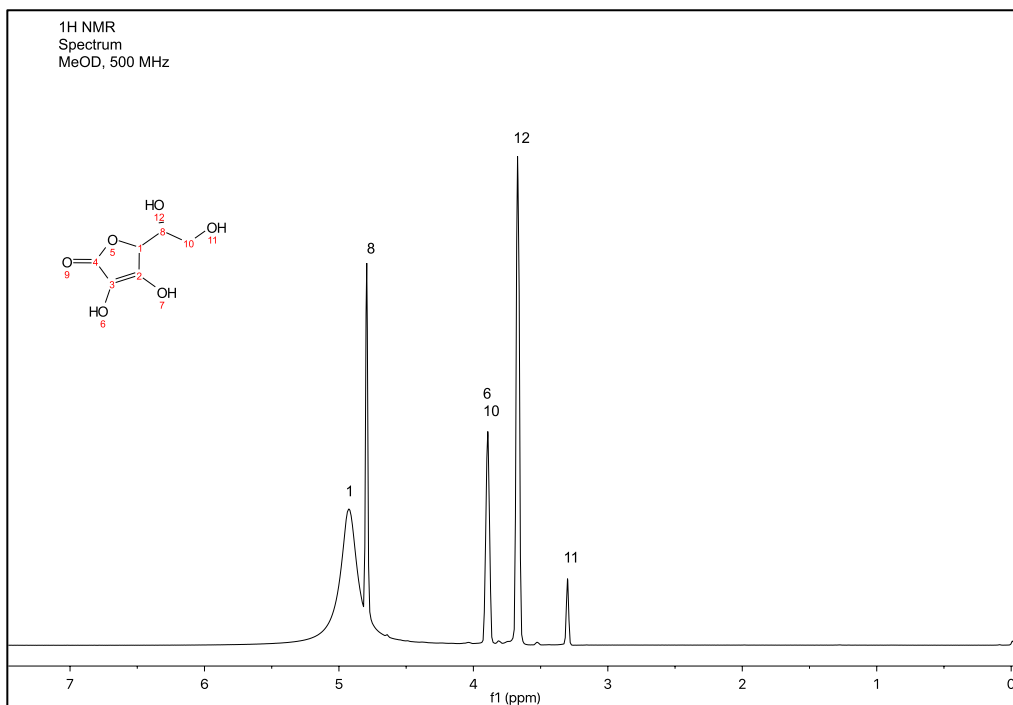


Figura 15. Espectro de RMN ^1H del ácido ascórbico disuelto en metanol deuterado (CD_3OD) a 500 MHz.

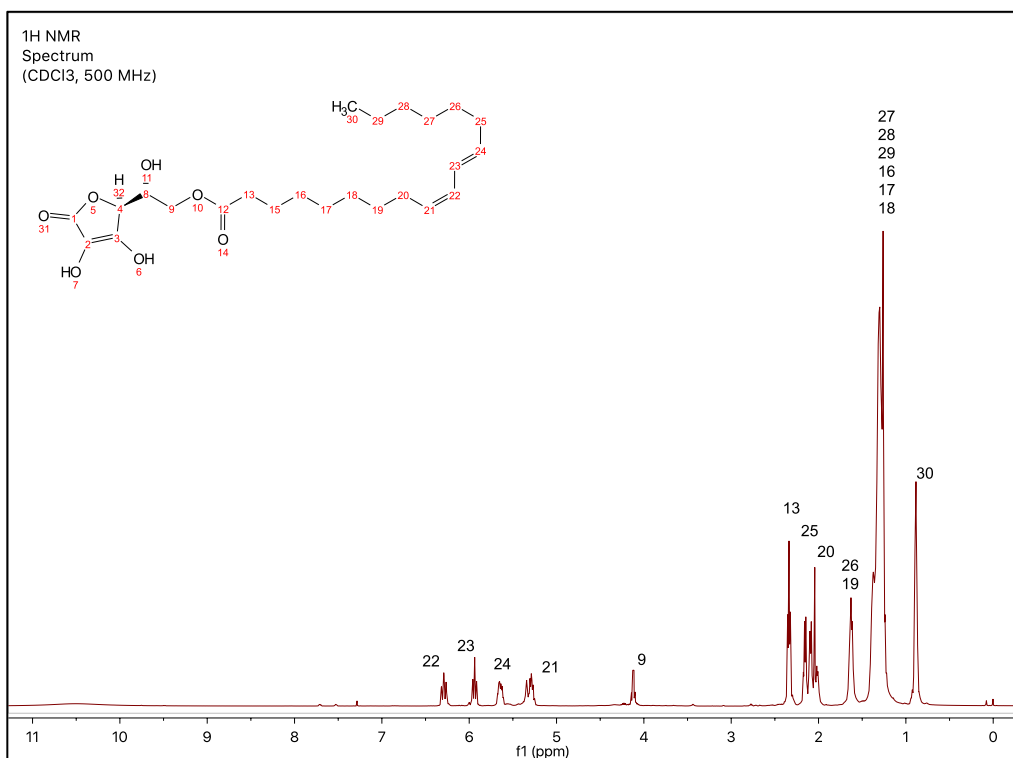


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H del sistema lipofilizado ácido ascórbico-ácido linoleico conjugado disuelto en cloroformo deuterado (CDCl_3) a 500 MHz.

9.3.1. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado ácido ascórbico-ácido linoleico conjugado mediante el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•).

Se evaluó la actividad antioxidante del sistema lipofilizado (ácido ascórbico-ácido linoleico conjugado) mediante el método del DPPH•, se prepararon varias concentraciones del sistema lipofilizado (5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM y 25 mM) y se expresaron los resultados como porcentaje de inhibición del radical DPPH•, los resultados del sistema lipofilizado se compararon con sus antioxidantes precursores; en la Figura 17 se observa que los valores siguen una tendencia concentración dependiente, es decir, que el porcentaje de inhibición es directamente proporcional con la concentración de los antioxidantes precursores y el sistema lipofilizado; el porcentaje de inhibición en el sistema lipofilizado 25 mM fue de 88.40% mostrando que el sistema lipofilizado en comparación con el ácido linoleico conjugado (77.50%) presentó un mayor porcentaje de inhibición pero menor que el ácido ascórbico (96.70%) esto comportamiento se debe a que el ácido ascórbico tiene una mayor disponibilidad de los grupos hidroxilos (-OH) que son los que permiten estabilizar a los radicales libres en comparación con el sistema lipofilizado, los grupos hidroxilo del sistema lipofilizado pueden estar un poco mas impedidos para realizar una mayor estabilidad de los radicales libres, aunque, se observa que la actividad antioxidante del sistema lipofilizado mediante este método es alta gracias a los dobles enlaces de la cadena hidrocarbonada del ácido linoleico conjugado que se encuentra lipofilizado con el ácido ascórbico, es por eso que el sistema lipofilizado presentó una mayor actividad antioxidante que el ácido linoleico conjugado, ya que al estar lipofilizado existe un sinergismo entre los dos antioxidantes. Los valores obtenidos en el método del radical DPPH• coinciden con lo reportado por Sorensen *et al.* (2014) ellos evaluaron el porcentaje de inhibición de un compuesto lipofilizado obtenido de ácidos hidroxycinámicos y diversos alcoholes con cadenas alquílicas diferentes, y obtuvieron valores en el porcentaje de inhibición del radical DPPH• del 73.0-85.0%, observándose la misma tendencia que el sistema lipofilizado.

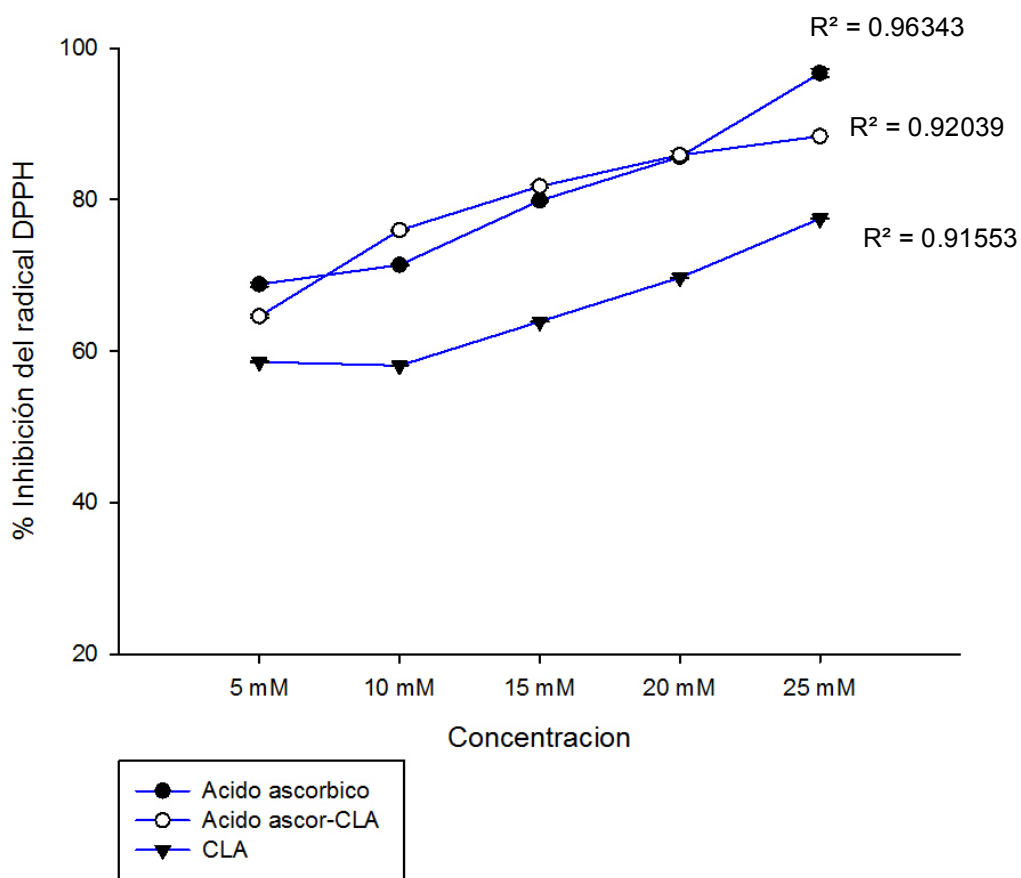


Figura 17. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado ácido ascórbico-CLA mediante el método del radical DPPH.

9.3.2. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado ácido ascórbico-ácido linoleico conjugado mediante el método del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).

En la Figura 18 se muestra el comportamiento de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado (ácido ascórbico-ácido linoleico conjugado) mediante el método de FRAP, se evaluaron diferentes concentraciones del sistema lipofilizado expresándose los resultados como μmol de TROLOX/L. La mayor cantidad de μmol de TROLOX/L se obtuvo en el sistema lipofilizado a 25 mM el cual mostró una cantidad de 9449.50 μmol de TROLOX/L observándose la misma tendencia mostrada anteriormente en las evaluaciones de la actividad antioxidante en donde

la cantidad de μmol de TROLOX/L fue directamente proporcional con la concentración de nuestro sistema lipofilizado. Se realizó la comparación con los antioxidantes precursores observándose la misma tendencia en el método de DPPH, ya que el que presenta una mayor cantidad de μmol de TROLOX/L es el ácido ascórbico (12312.17 μmol de TROLOX/L) seguido del sistema lipofilizado y por último el ácido linoleico conjugado (3566.50 μmol de TROLOX/L).

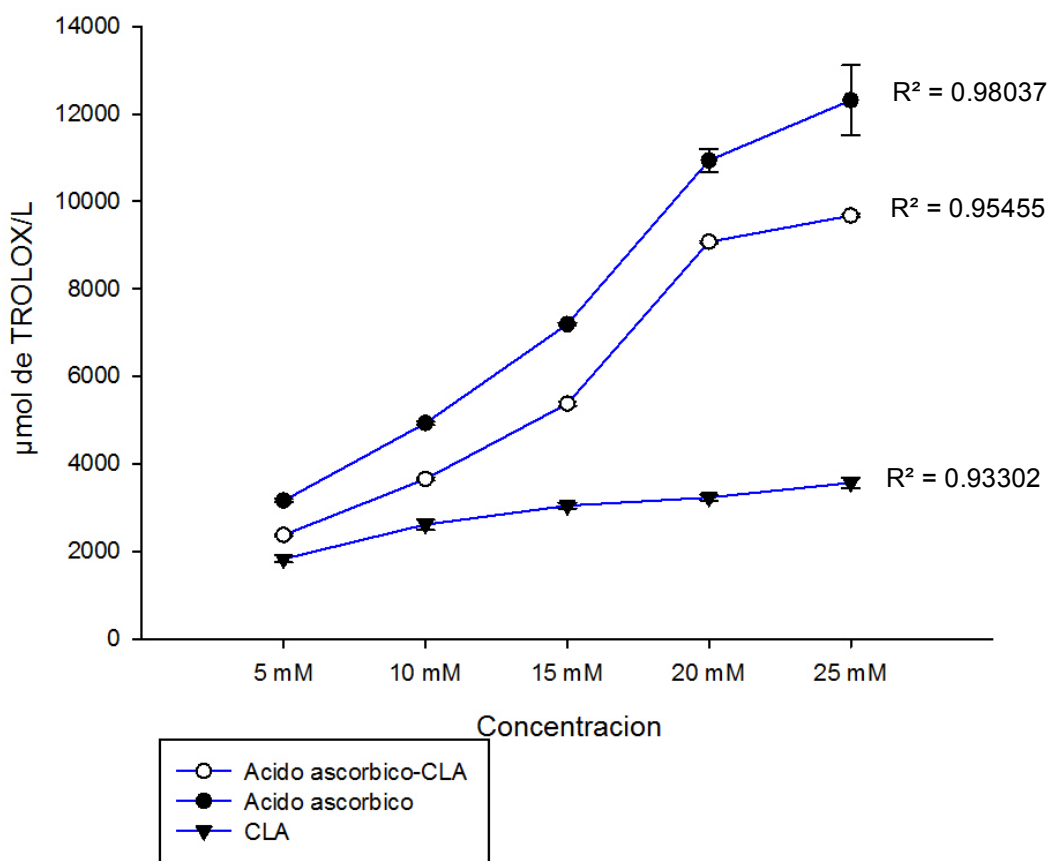


Figura 18. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado ácido ascórbico-CLA mediante el método de FRAP.

9.3.3. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado ácido ascórbico-ácido linoleico conjugado mediante el método del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS•).

El comportamiento en el método del radical ABTS• no cambia con respecto a la del método del radical DPPH• y FRAP, ya que se presentó el mismo

comportamiento de concentración dependiente, en este método los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición del radical ABTS•, mostrando que el que presenta un mayor porcentaje de inhibición en este método es el ácido ascórbico con un 95.27% seguido de el sistema lipofilizado con un 90.87% y posteriormente el ácido linoleico conjugado con un 68.87% (Figura 19). En este método se puede observar que el sistema lipofilizado tiene una mejor actividad antioxidante que el ácido linoleico conjugado que es uno de los antioxidantes precursores, esto se puede deber a que al momento de hacer la lipofilización la molécula incorpora un mayor número de grupos funcionales que permiten hacer una transferencia de electrones mas favorable que el ácido linoleico conjugado, permitiendo así una mayor estabilidad y neutralización en contra del radical ABTS• (Floegel *et al.* 2011)

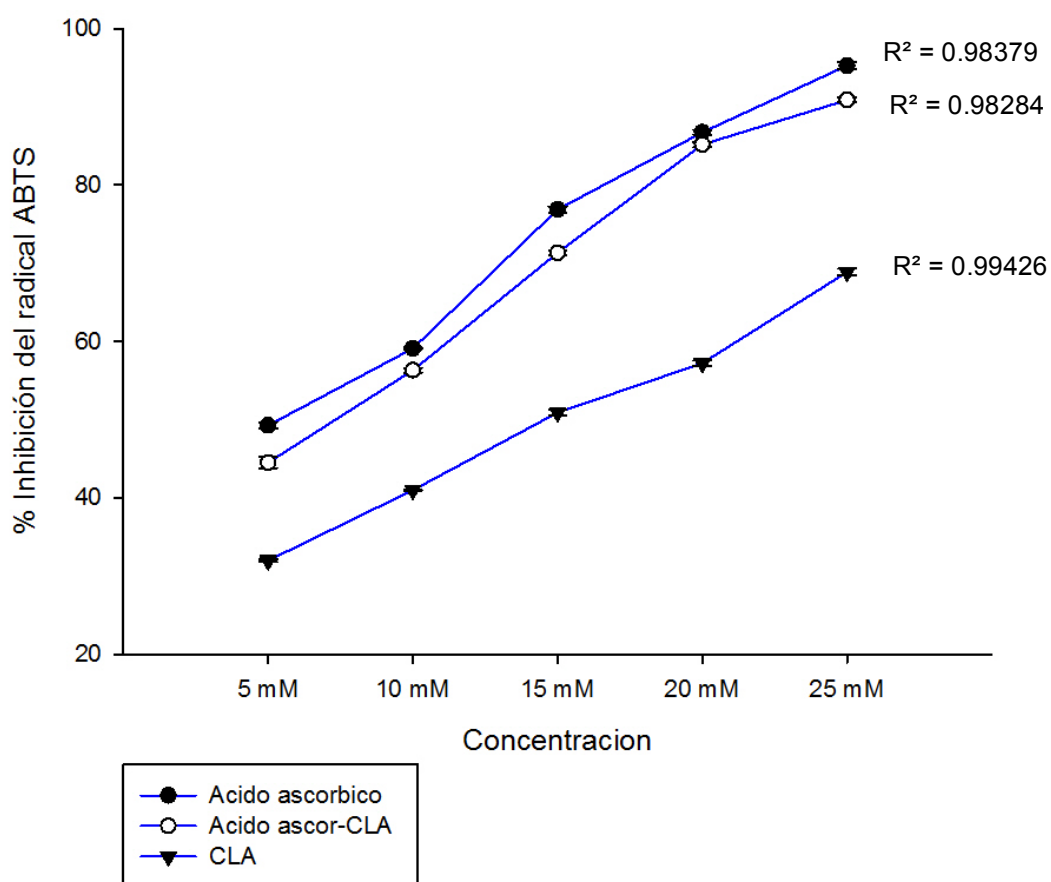


Figura 19. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado ácido ascórbico-CLA mediante el método de ABTS.

9.4 Lipofilización de carvacrol-ácido linoleico conjugado y evaluación de los espectros de RMN de ^1H .

La RMN de ^1H confirma la lipofilización del carvacrol y ácido linoleico conjugado (Figura 21); para la asignación inequívoca de cada una de las señales para éste y todos los demás sistemas lipofilizados se efectuaron experimentos bidimensionales para una mejor asignación de las señales en los espectros (Anexos). En la Figura 20 que corresponde al espectro de RMN ^1H del carvacrol, se pueden observar señales en $\delta = 1.2$ ppm que corresponde a los hidrógenos de los grupos metilos ($-\text{CH}_3$) del isopropilo, se presentaron como señales doble ya que existe un acoplamiento con el grupo metino ($-\text{CH}$); el grupo metino ($-\text{CH}$) presentó señales múltiples alrededor de $\delta = 2.7$ ppm ya que hay acoplamientos con los grupos metilos a los que se encuentra unido; alrededor de $\delta = 5$ ppm se observó una señal sencilla que corresponde al grupo hidroxilo ($-\text{OH}$) que se encuentra en el anillo aromático, por último se presentaron señales alrededor de $\delta = 6.5-7$ ppm que son las señales de los hidrógenos de los grupos metinos ($-\text{CH}$) que forman parte del anillo aromático. En la Figura 21 se muestra el espectro de RMN de ^1H del sistema lipofilizado, donde se aprecian señales más complejas en comparación con el espectro del carvacrol (Figura 20); se observan las señales que corresponden a la porción del carvacrol principalmente las señales de los grupos metilos ($-\text{CH}_3$) que pertenecen al grupo isopropilo ($\delta = 1.1$ ppm), estas señales caen en la zona de los grupos metilenos ($\delta = 1.1-2.3$ ppm) de la cadena hidrocarbonada de la porción del ácido linoleico conjugado; también se observaron señales de los grupos metinos ($-\text{CH}$) que se encuentran formando parte del anillo aromático de la porción del carvacrol ($\delta = 6.6-6.9$ ppm); alrededor de $\delta = 0.98$ ppm se muestran señales correspondientes a los hidrógenos del grupo metilo ($-\text{CH}_3$) de la porción del ácido linoleico conjugado. En la Figura 21 se observó una señal múltiple correspondientes al grupo metino ($-\text{CH}$) del isopropilo alrededor de $\delta = 3.3$ ppm, en el espectro del carvacrol (Figura 20) esta señal se ve como una señal múltiple solamente que aparece a campo alto ($\delta = 2.7$ ppm) encontrándose menos desplazado que en el espectro del sistema lipofilizado. Las señales alrededor de $\delta = 5.2-6.3$ ppm en el sistema lipofilizado (Figura 21) corresponden a los

hidrógenos de los dobles enlaces conjugados que a diferencia del carvacrol esta señales no se aprecian en el espectro (Figura 20) lo cual indicó que claramente el carvacrol se esta lipofilizando con el ácido linoleico conjugado, por último en el espectro de RMN ^1H del sistema lipofilizado se presentaron señales en $\delta = 6.6\text{-}6.9$ ppm que corresponden a los hidrógenos del anillo aromático del carvacrol (Figura 20).

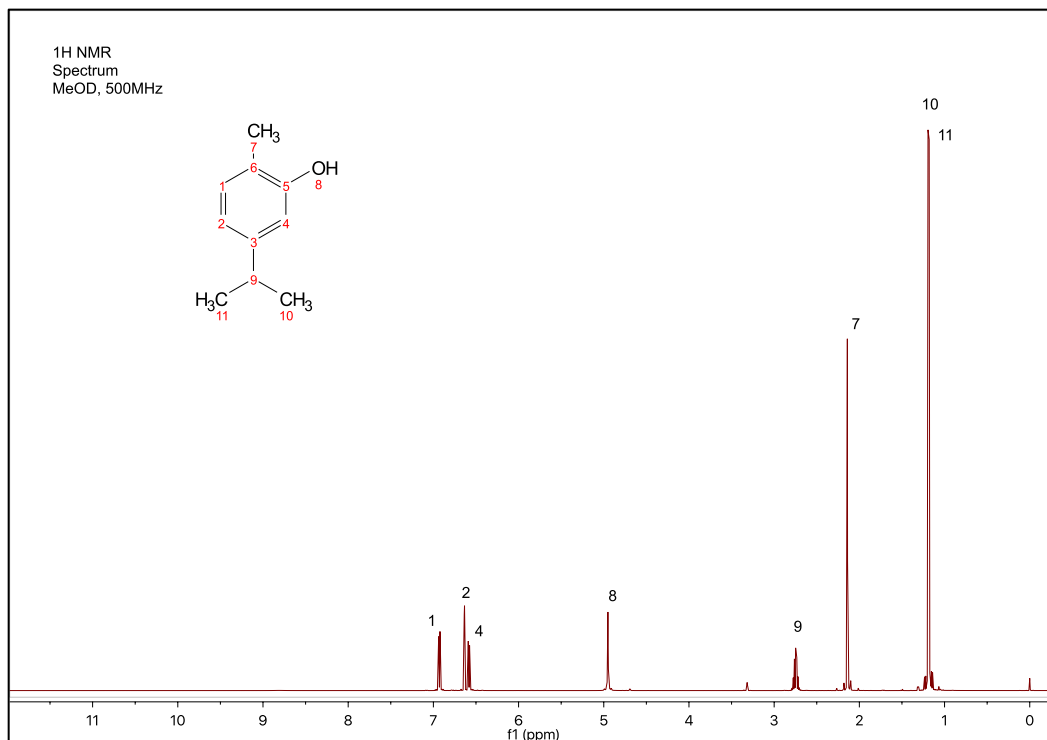


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H del carvacrol disuelto en metanol deuterado (CD_3OD) a 500 MHz.

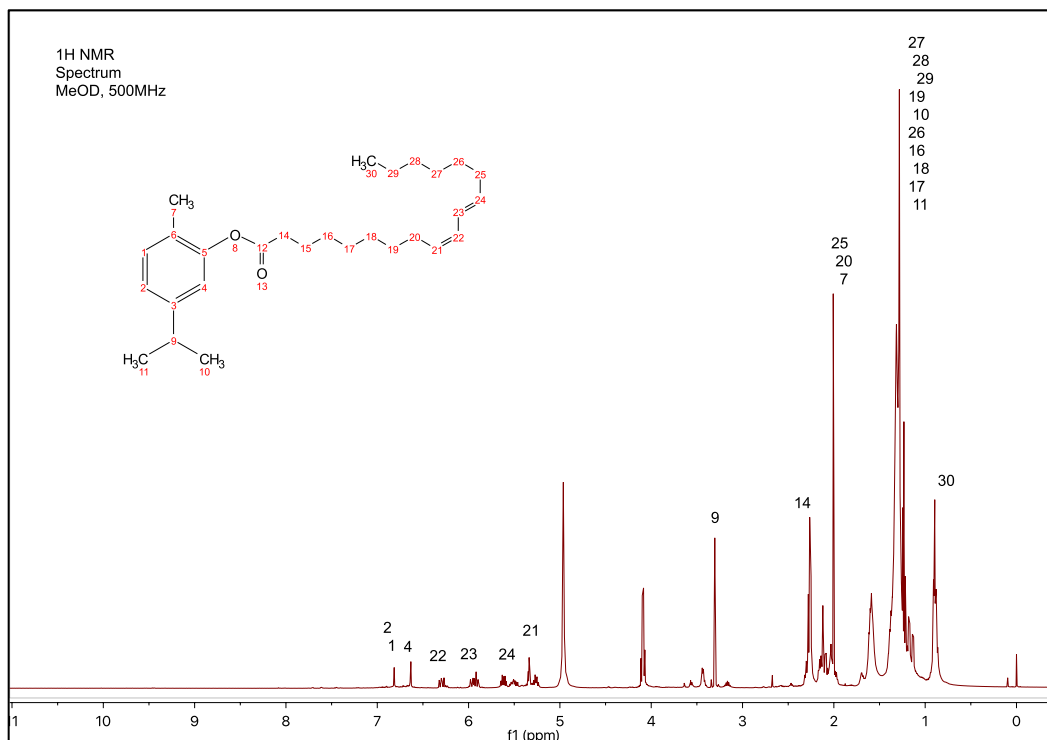


Figura 21. Espectro de RMN ^1H del sistema lipofilizado carvacrol-ácido linoleico conjugado disuelto en metanol deuterado (CD_3OD) a 500 MHz.

9.4.1. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado carvacrol-ácido linoleico conjugado mediante el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•).

La actividad antioxidante del sistema lipofilizado conformado por carvacrol-ácido linoleico conjugado presentó una alta actividad antioxidante mediante este método en comparación con sus antioxidantes precursores, este comportamiento se observa en la Figura 22 donde el sistema lipofilizado presentó un porcentaje de inhibición del radical DPPH• del 87.96% que es mayor que los porcentajes mostrados por los antioxidantes precursores, los cuales fueron de 76.69% para el carvacrol y 77.70% para el ácido linoleico conjugado; claramente se puede observar que la mayor actividad antioxidante para poder neutralizar a este radical es en el sistema lipofilizado, esto posiblemente a la facilidad de donar electrones de esta nueva molécula, ya que al momento de lipofilizar los dos antioxidantes precursores actúan de manera sinérgica causando un efecto de inhibición hacia el radical DPPH•, más alto que los antioxidantes por sí solos, este sinergismo se

debe al efecto de neutralización del doble enlace conjugado de la cadena alquílica de la molécula correspondiente a la parte del ácido linoleico conjugado, y a la incorporación del radical DPPH• al anillo aromático correspondiente al carvacrol, es por eso que la neutralización puede ser más efectiva que los antioxidantes precursores actuando por si solos, además de que la estabilidad de la molécula permite que ejerza un efecto mayoritario en cuanto actividad antioxidante se refiere (Beena *et al.* 2012; Sorensen *et al.* 2014).

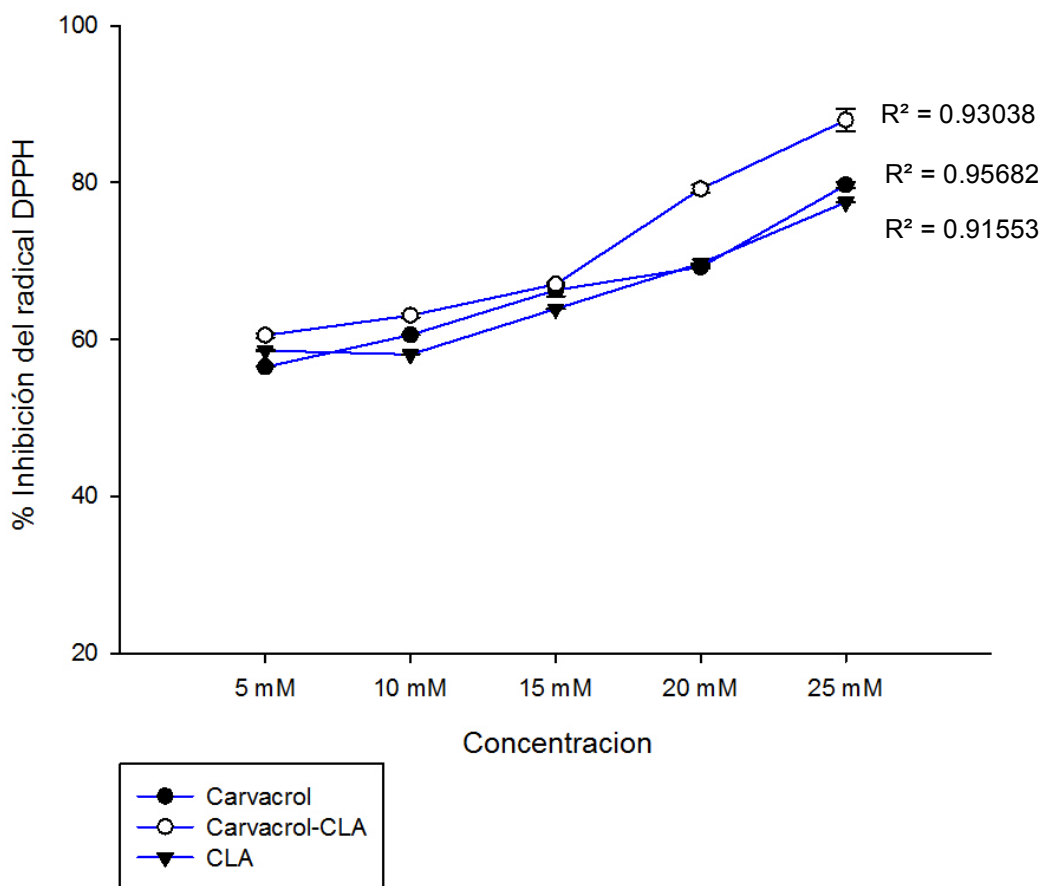


Figura 22. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado carvacrol-CLA mediante el método del radical DPPH.

9.4.2. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado carvacrol-ácido linoleico conjugado mediante el método del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).

La actividad antioxidante mediante el método de FRAP sigue la misma tendencia que por el método del DPPH•, es decir, que el que presenta una mayor actividad antioxidante es el sistema lipofilizado en comparación con los antioxidantes precursores, esto se muestra en la Figura 23 donde la cantidad de μmol de TROLOX/L del sistema lipofilizado a una concentración de 25 mM fue de 16941.0 seguido del carvacrol el cual presentó 13739.83 μmol de TROLOX/L y posteriormente el ácido linoleico conjugado cuyo valor a 25 mM fue de 3566.50. El sistema lipofilizado tiene una mayor capacidad para reducir el Fe^{+3} a Fe^{+2} esto se debe a que la transferencia de electrones que ejerce la molécula hacia el complejo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), que es incoloro, es reducido generando un complejo ferroso colorido (Benzie y Strain 1996). La estructura química del sistema lipofilizado permite que la transferencia de electrones sea mas eficiente que sus antioxidantes precursores, dicha transferencia permite reducir de manera mas idónea al complejo TPTZ, los grupos funcionales del sistema lipofilizado le permiten tener una mayor actividad antioxidante ya que al estar más disponible el grupo hidroxilo (-OH) este actúa de manera sinérgica con los dobles enlaces conjugados permitiendo una mayor captación de este complejo (TPTZ). La cantidad de μmol de TROLOX/L nos permite cuantificar la actividad antioxidante de cada uno de los compuestos y claramente el que presenta la mayor actividad es el sistema lipofilizado observando que los antioxidantes precursores al ser lipofilizados generan una mayor actividad antioxidante gracias a cada uno de los grupos funcionales que llegan a interactuar de una manera mas idónea con dicho complejo.

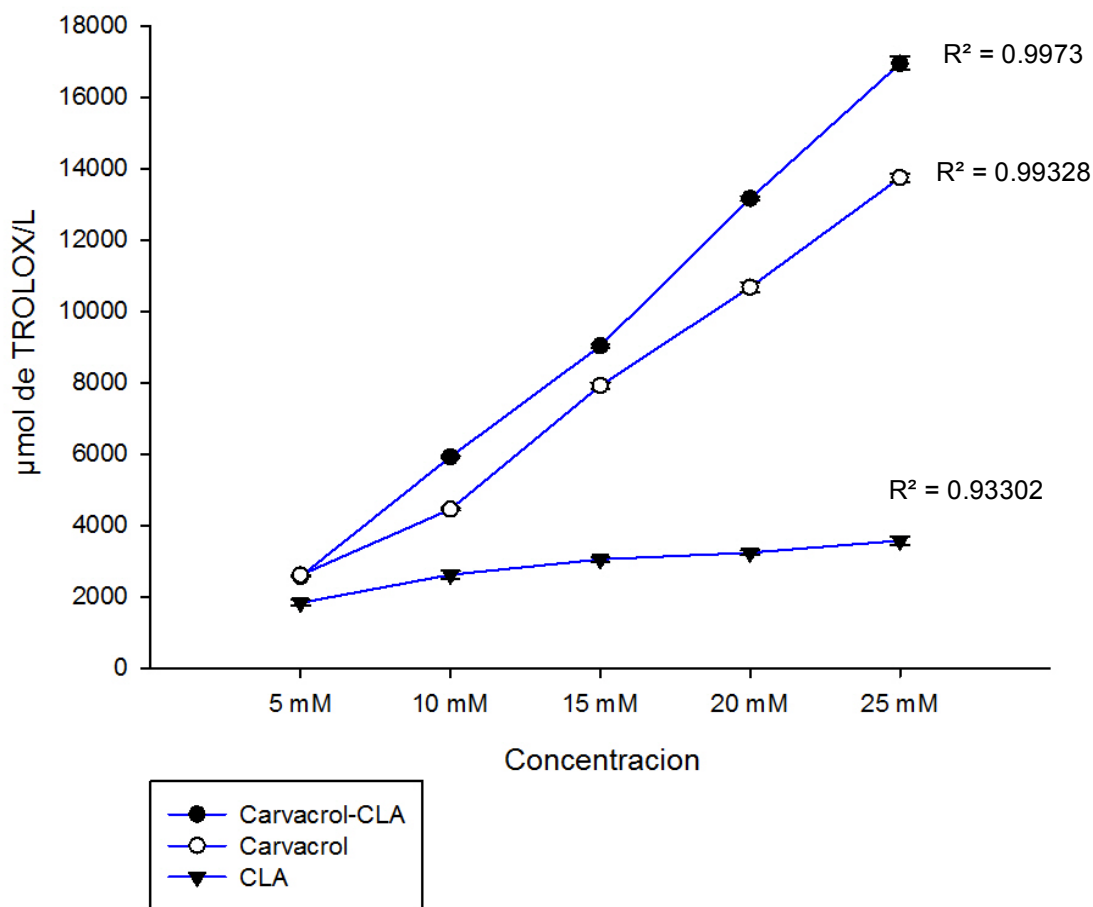


Figura 23. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado carvacrol-CLA mediante el método de FRAP.

9.4.3. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado carvacrol-ácido linoleico conjugado mediante el método del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS•).

La actividad antioxidante por el método del radical ABTS• fue reportado como porcentaje de inhibición, en la Figura 24 se observa que la concentración es directamente proporcional con el porcentaje de inhibición del radical ABTS presentándose la mayor inhibición de dicho radical en la concentración de 25 mM tanto en el sistema lipofilizado como en los antioxidantes precursores; en este método el que presentó un mayor porcentaje de inhibición fue en el sistema lipofilizado carvacrol-ácido linoleico conjugado a una concentración de 25 mM, el

porcentaje de este sistema lipofilizado fue de 96.76%, este resultado fue mayor que los antioxidantes precursores donde se presentaron porcentajes del 93.95% en el carvacrol y 68.87% en el ácido linoleico conjugado. Al igual que en los otros métodos empleados para evaluar la actividad antioxidante, en todos los casos incluyendo este método, el que presentó una mayor actividad antioxidante es el sistema lipofilizado. Como se había mencionado el sistema lipofilizado tiene una mayor disponibilidad de transferir electrones a los radicales lo que permite que el porcentaje de inhibición sea mayor, en el caso del radical ABTS• el sistema lipofilizado logra transferir sus electrones de manera mas eficiente químicamente hablando a dicho radical donde logra la estabilización del radical ABTS. El sistema lipofilizado formado por el carvacrol-ácido linoleico conjugado actúa de manera sinérgica para lograr la estabilización del radical ABTS, demostrando que tiene una mayor actividad al momento de lipofilizarlo que cuando se encuentran en forma separada, este método es idóneo para medir la estabilidad y la actividad antioxidante del sistema lipofilizado y compararlo con sus antioxidantes precursores a diferentes concentraciones.

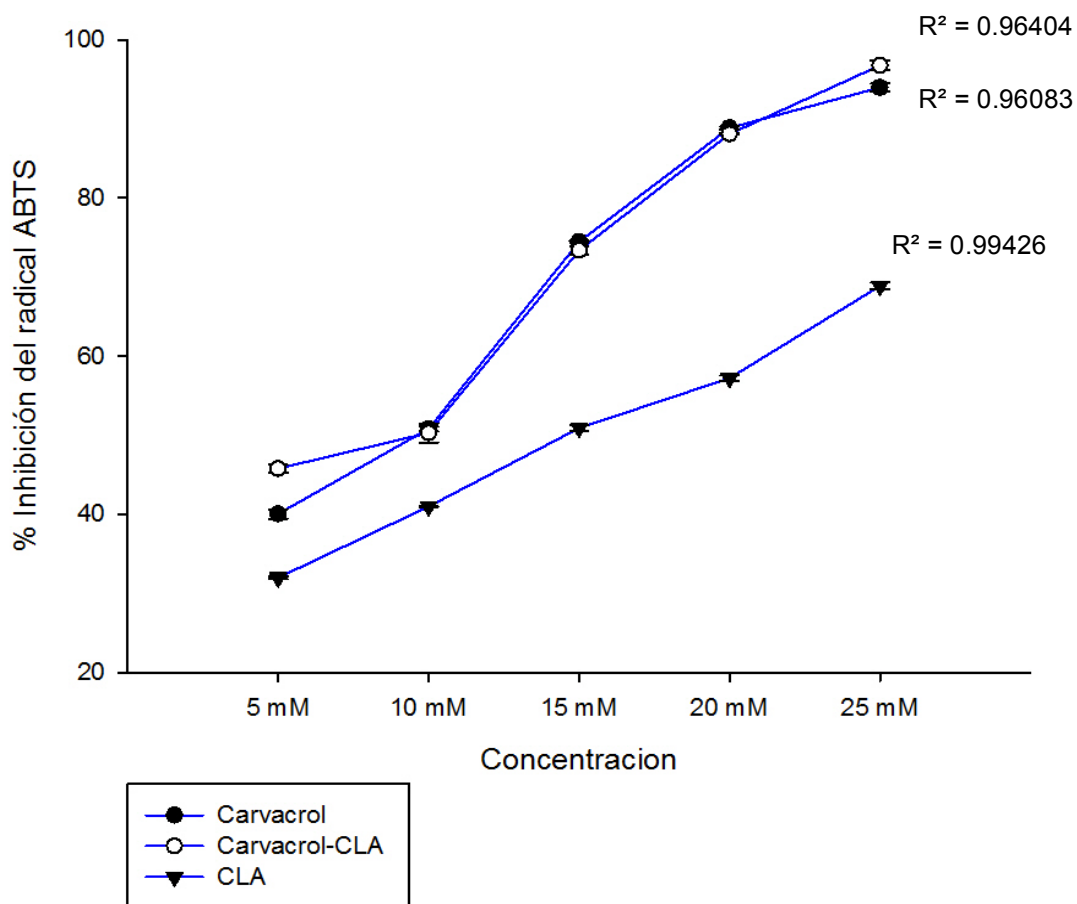


Figura 24. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado carvacrol-CLA mediante el método de ABTS.

9.5 Lipofilización de quercetina-ácido linoleico conjugado y evaluación de los espectros de RMN de ^1H .

Se obtuvieron los espectros de RMN de ^1H de la quercetina y del sistema lipofilizado (quercetina-ácido linoleico conjugado) con el objetivo de observar si se realizó la lipofilización de manera adecuada. En el espectro de RMN de ^1H de la quercetina (Figura 25) se observan señales ($\delta = 3.3\text{-}6.1$ ppm) que corresponden a los grupos hidroxilos (-OH), alrededor de $\delta = 6.4\text{-}7.5$ ppm se mostraron los hidrógenos de los grupos metinos (-CH) de los anillos aromáticos de la quercetina. En el espectro de RMN de ^1H del sistema lipofilizado (Figura 26) se muestran señales alrededor de $\delta = 1.0$ ppm que corresponden a los hidrógenos del grupo

metilo (-CH₃) de la porción del ácido linoleico conjugado, estas señales no se presentaron en el espectro de RMN de ¹H de la quercetina (Figura 25) ya que en su estructura química no hay hidrógenos correspondientes al grupo metilo; se presentaron señales (δ= 1.2-2.3 ppm) correspondientes a los metilenos (-CH₂) de la cadena hidrocarbonada de la porción del ácido linoleico conjugado las cuales no se observaron en el espectro de RMN de ¹H de la quercetina (Figura 25). Las señales alrededor de δ= 5.2-6.3 ppm corresponden a los hidrógenos de los dobles enlaces conjugados de la cadena hidrocarbonada de la porción del ácido linoleico conjugado lipofilizado (Figura 26), en δ= 6.9 ppm corresponde a la señal del hidrógeno del grupo metino (-CH) que se encuentra formando parte de uno de los anillos aromáticos de la quercetina y por último las señales que se encuentra alrededor de δ= 7.6-7.9 ppm corresponden a los grupos metinos (-CH) de los anillos aromáticos de la quercetina (Figura 26). Comparando los espectros de RMN de ¹H se observan más señales en el espectro correspondiente al sistema lipofilizado en comparación con el de la quercetina, además de que aparecen las señales correspondientes a los hidrógenos de la porción del ácido linoleico conjugado mostrando la lipofilización de la quercetina con el ácido linoleico conjugado. Para la asignación inequívoca se utilizaron experimentos de RMN de dos dimensiones los cuales nos muestran las correlaciones tanto homonucleares (¹H/¹H) como heteronucleares (¹H/¹³C) (Anexos).

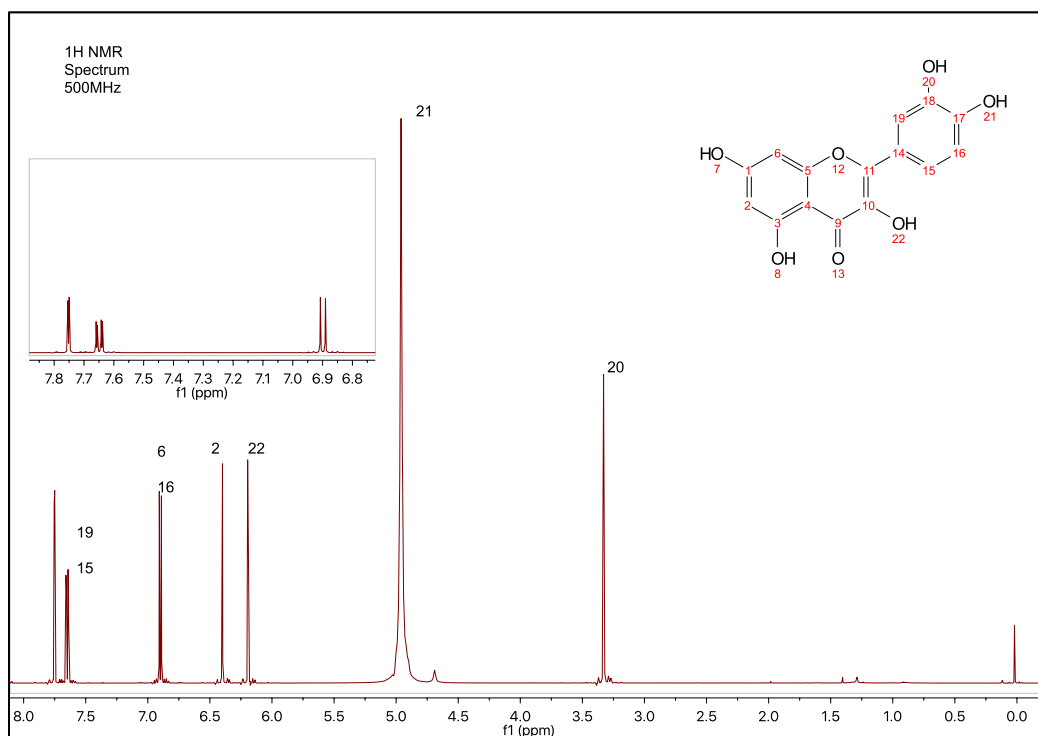


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H de la quercetina disuelto en metanol deuterado (CD_3OD) a 500 MHz.

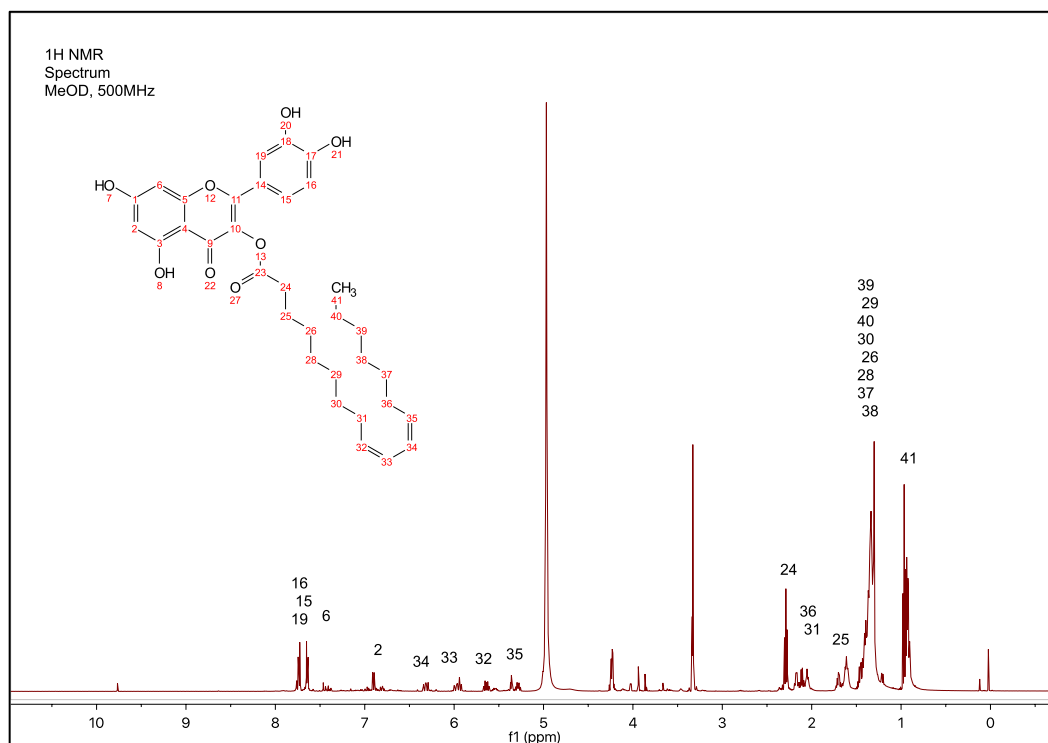


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H del sistema lipofilizado (quercetina-ácido linoleico conjugado) disuelto en metanol deuterado (CD_3OD) a 500 MHz.

9.5.1. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado quercetina-ácido linoleico conjugado mediante el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•).

La actividad antioxidante mediante el método del radical DPPH• nos muestra que los valores del sistema lipofilizado son ligeramente más altos que la de los antioxidantes precursores pero no se observan diferencias significativas entre los tres, ya que el porcentaje de inhibición del sistema lipofilizado fue de 80.45% observándose un ligero incremento del porcentaje en comparación con los antioxidantes precursores cuyos porcentajes fueron de 78.96% y 77.7% en la quercetina y el ácido linoleico conjugado respectivamente (Figura 27). La quercetina al estar lipofilizada con el ácido linoleico presentó un sinergismo al momento de inhibir al radical DPPH, aunque como se observa, el comportamiento que se presentó en el sistema lipofilizado es muy similar a la de sus antioxidantes precursores, la transferencia de electrones en el sistema lipofilizado se ve favorecido gracias a los grupos hidroxifenólicos y a los dobles enlaces conjugados de la cadena hidrocarbonada; estos grupos funcionales permiten inhibir y remover a los radicales libres en este caso al radical DPPH (Chen *et al.* 2009).

9.5.2. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado quercetina-ácido linoleico conjugado mediante el método del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).

La actividad antioxidante del sistema lipofilizado (quercetina-ácido linoleico conjugado) se evaluó mediante el método del poder reductor ferrico (FRAP) donde los valores obtenidos fueron reportados como μmol de TROLOX/L; a diferencia del método de DPPH• donde los valores más altos se muestran en el sistema lipofilizado, en este método el que presenta una mayor actividad antioxidante es la quercetina con 14066.50 μmol de TROLOX/L lo cual se debe a los grupos hidroxilos (-OH) que ejercen un efecto reductor gracias a la gran capacidad para transferir electrones, aunque los valores más altos se observan en la quercetina se puede observar que la tendencia del sistema lipofilizado es muy similar a la de la quercetina observándose valores de 13308.77 μmol de TROLOX/L que es relativamente más bajo al valor que se observa en la

quercetina, pero se puede observar que el comportamiento en el sistema lipofilizado nos indica que tiene una gran tendencia a transferir electrones gracias a los grupos funcionales que conforman a dicho sistema, el sistema lipofilizado presentó valores más bajos que la quercetina ya que los grupos hidroxilo (-OH) que se encuentran en los anillos aromáticos de la quercetina están ligeramente mas impedidos al momento de lipofilizarlos con el ácido linoleico conjugado, pero siguen presentando una buena transferencia de electrones logrando reducir al complejo TPTZ. El sistema lipofilizado presentó valores más altos en todas las concentraciones evaluadas en comparación con los valores del ácido linoleico conjugado cuyo valor más alto para este método fue de 3566.50 μmol de TROLOX/L (Figura 28).

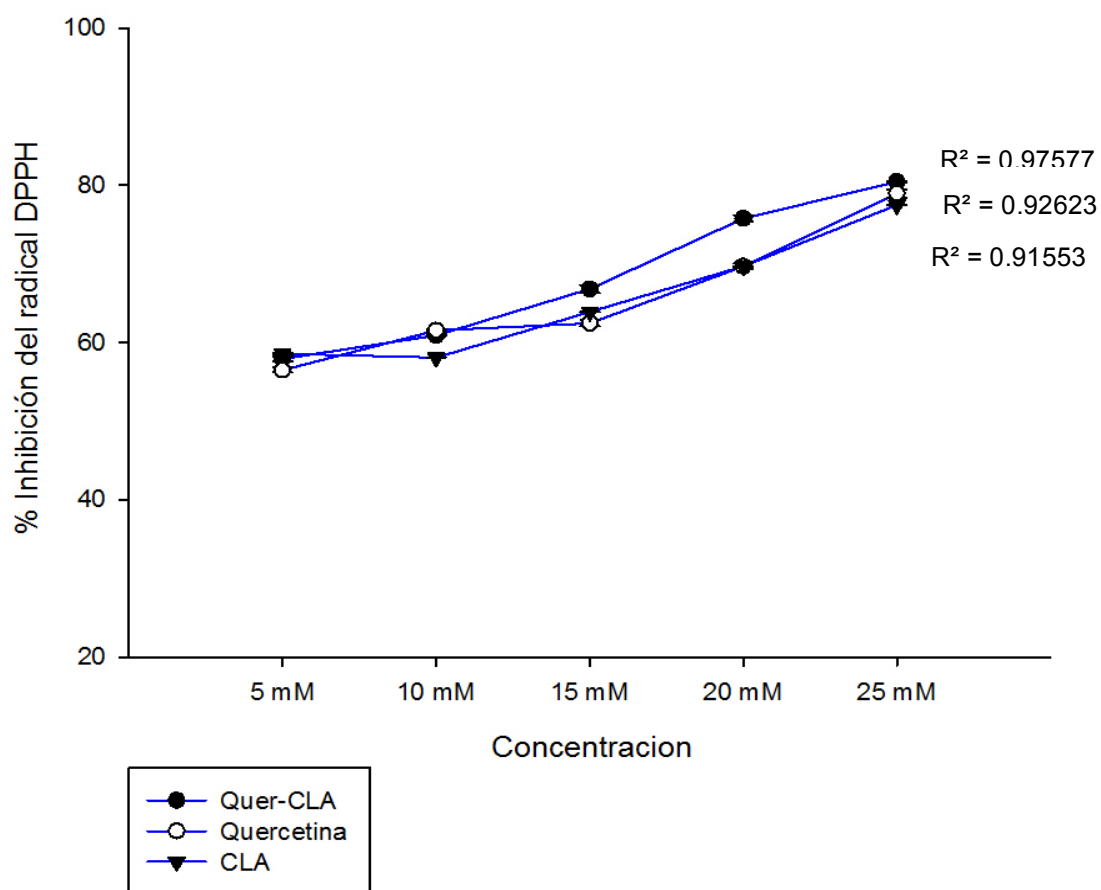


Figura 27. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado quercetina-CLA mediante el método del radical DPPH.

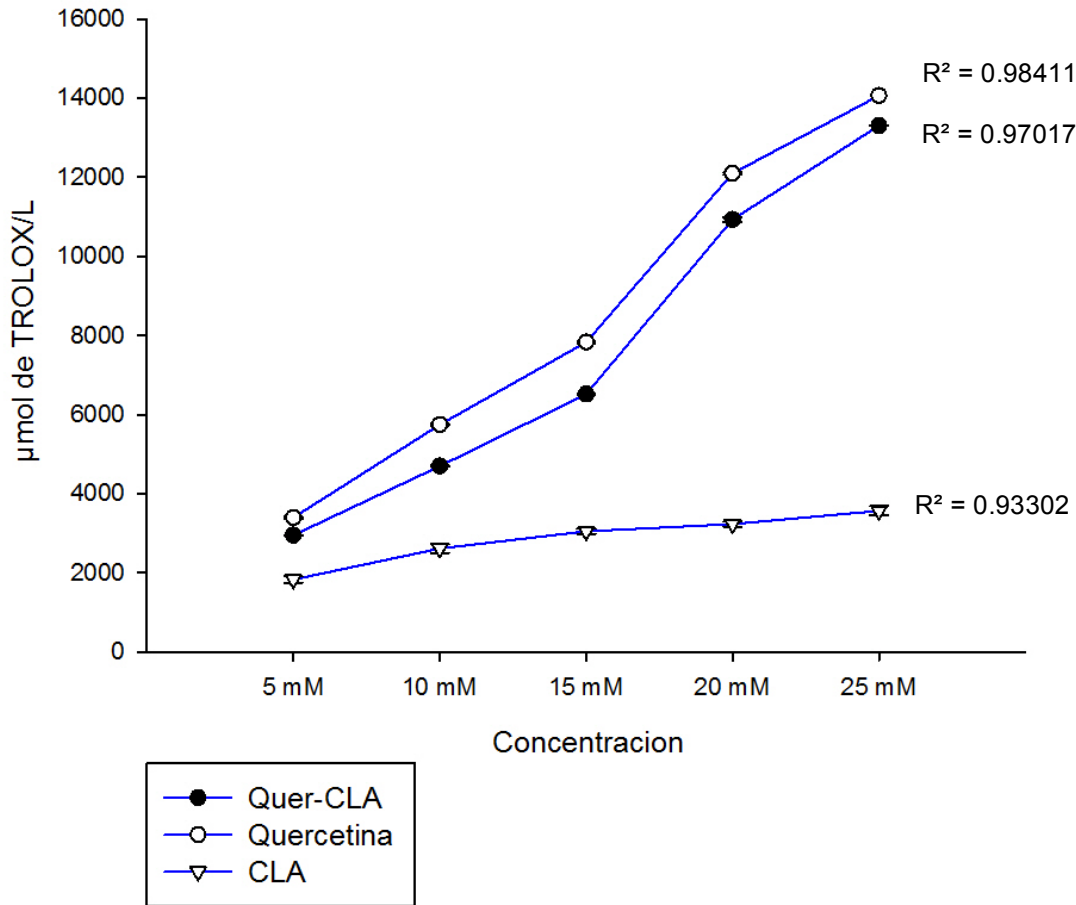


Figura 28. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado quercetina-CLA mediante el método de FRAP.

9.5.3. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado quercetina-ácido linoleico conjugado mediante el método del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS•).

La actividad antioxidante mediante el método del ABTS• no presenta diferencias significativas entre la quercetina y el sistema lipofilizado, ya que la tendencia que se observa en todas las concentraciones presentan valores similares con respecto al porcentaje de inhibición del radical ABTS•; los valores más altos en porcentaje de inhibición fueron a la concentración de 25 mM en todos los compuestos a evaluar, teniendo valores de 98.24% para la quercetina, 97.38% para el sistema

lipofilizado (quercetina-ácido linoleico conjugado) y 68.87% para el ácido linoleico conjugado. Los valores ya mencionados demuestran que la actividad antioxidante del sistema lipofilizado mediante este método presenta valores mayores que el ácido linoleico conjugado y valores muy similares al de la quercetina (Figura 29).

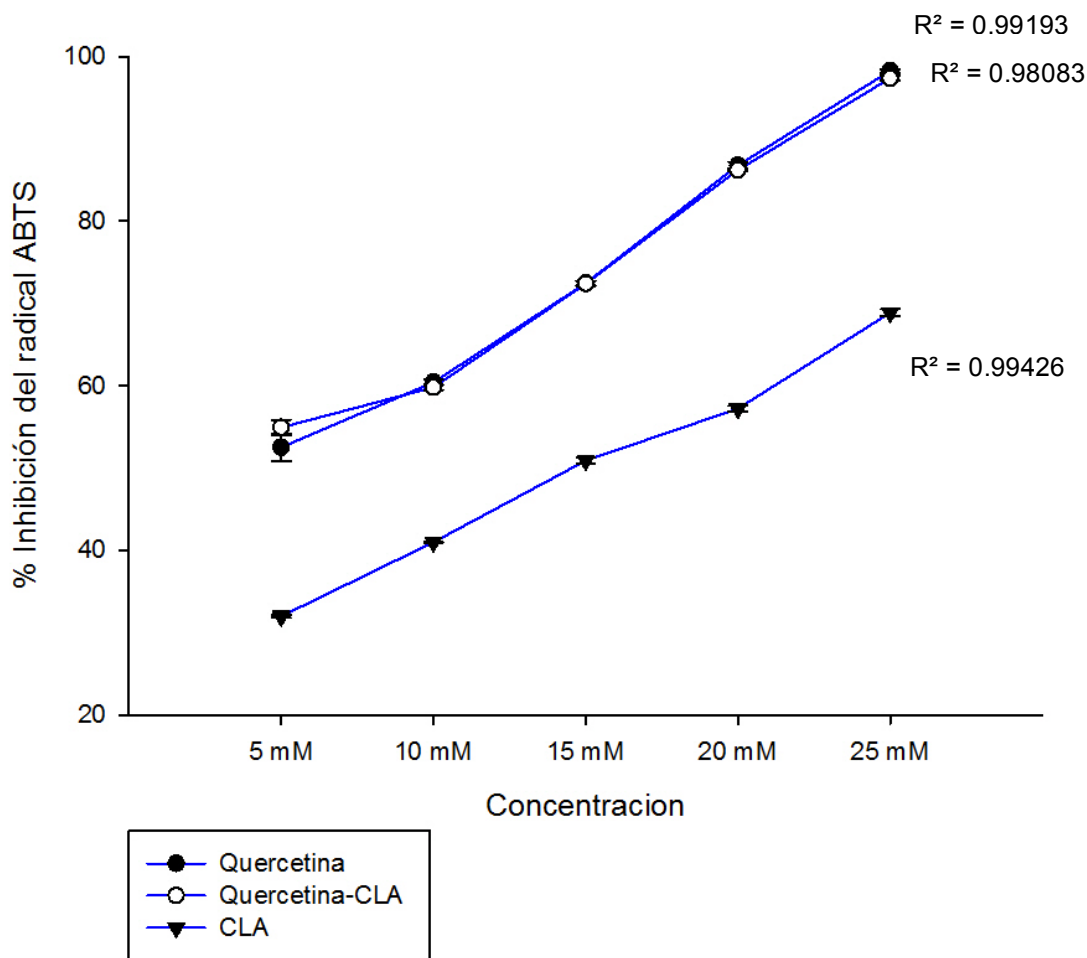


Figura 29. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado quercetina-CLA mediante el método de ABTS.

9.6 Lipofilización de resveratrol-ácido linoleico conjugado y evaluación de los espectros de RMN de ^1H .

Se llevó a cabo la lipofilización del resveratrol con el ácido linoleico conjugado, este sistema mostró una descomposición muy rápida, observándose que una vez purificado se generaban productos de descomposición, los cuales se observaron en capa fina y en los espectros de RMN tanto de ^1H y de ^{13}C , por lo que estos no se presentan. Con el fin de probar si el nuevo producto presentaba alguna actividad antioxidante, se decidió llevar a cabo las determinaciones correspondientes, las cuales se presentan a continuación.

9.6.1. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado resveratrol-ácido linoleico conjugado mediante el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•).

La actividad antioxidante mediante el método del DPPH• mostró valores muy similares en cuanto a porcentaje de inhibición de dicho radical, los valores obtenidos para el sistema lipofilizado fueron de 77.58% observándose valores muy similares en los antioxidantes precursores resveratrol y ácido linoleico conjugado los cuales presentaron 80.46% y 77.70% respectivamente (Figura 30). Se puede observar que el sistema lipofilizado a concentraciones bajas (5 mM y 10 mM) presenta valores de porcentaje de inhibición bajos en comparación con los antioxidante precursores, esto se debe a que la disponibilidad del sistema lipofilizado para poder neutralizar el radical DPPH• es menor cuando este se encuentra a concentraciones más bajas debido a que cuando hay una menor concentración la cantidad de moléculas disminuye por lo tanto hay una menor superficie de contacto para que se lleve a cabo la neutralización de dicho radical. Se puede concluir que el sistema lipofilizado presenta valores muy similares en el porcentaje de inhibición del radical DPPH•. La actividad antioxidante del sistema lipofilizado se le confiere a los grupos hidroxifenólicos de la parte del resveratrol así como también al doble enlace de estireno lo cual permite la incorporación de radicales libres; y de la parte del ácido linoleico conjugado principalmente al doble

enlace conjugado de la cadena hidrocarbonada lo cual permite la incorporación de radicales libres (Acerson *et al.* 2013).

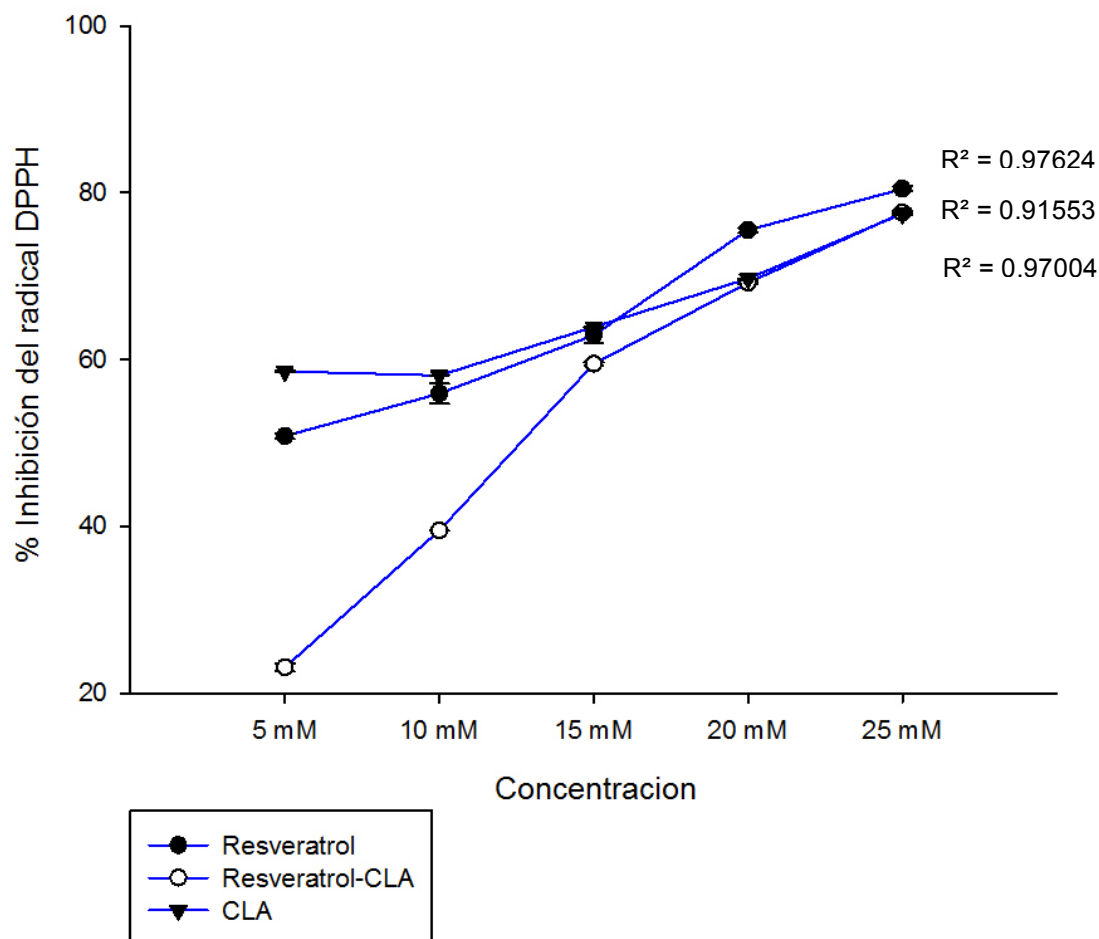


Figura 30. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado resveratrol-CLA mediante el método del radical DPPH.

9.6.2. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado resveratrol-ácido linoleico conjugado mediante el método del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).

La tendencia que se observa en la Figura 31 para este sistema es concentración dependiente, se muestran los valores de cada uno de los antioxidantes precursores y del sistema lipofilizado expresados en μmol de TROLOX/L. Los valores más altos a una concentración de 25 mM se observaron en el resveratrol el cual presentó 13196.50 μmol de TROLOX/L, seguido del sistema lipofilizado con

12668.16 μmol de TROLOX/L y por último el ácido linoleico conjugado con 3566.50 μmol de TROLOX/L. El sistema lipofilizado presenta la misma tendencia que en el DPPH• en donde se empieza a observar una mejor actividad en concentraciones más altas (20 mM y 25 mM), pero comparándola con el antioxidante precursor (Resveratrol) presenta una menor actividad antioxidante en los dos métodos ya mencionados, teniendo una mejor actividad antioxidante que el ácido linoleico conjugado.

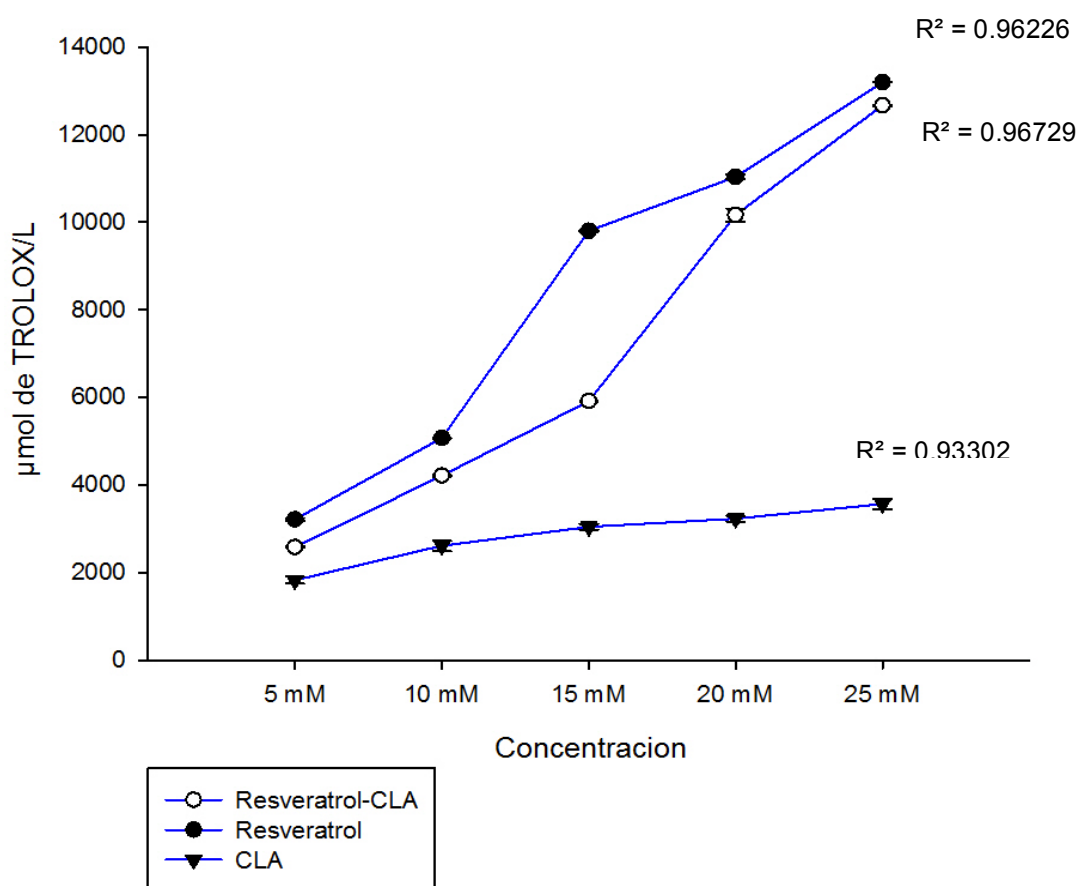


Figura 31. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado resveratrol-CLA mediante el método de FRAP.

9.6.3. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado resveratrol-ácido linoleico conjugado mediante el método del ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS•).

El sistema lipofilizado presentó valores diferentes a sus antioxidantes precursores, los valores fueron reportados como porcentaje de inhibición del radical ABTS•, obteniendo un porcentaje de inhibición para el sistema lipofilizado de un 73.91%, este valor indica que el sistema lipofilizado presentó una actividad antioxidante más alta que el ácido linoleico conjugado el cual obtuvo un porcentaje del 68.87%. El sistema lipofilizado presenta una actividad menor en comparación con el resveratrol el cual presentó un porcentaje de inhibición del 95.65% donde se puede observar que existen diferencias significativas en comparación con este antioxidante precursor, esto se debe a que el impedimento estérico que puede estar sufriendo la molécula es alto ya que al momento de lipofilizarlo con el ácido linoleico conjugado no permite que actúe de una mejor manera que como su antioxidante precursor, aunque claramente se puede observar que el sistema lipofilizado si es capaz de transferir electrones para reducir al radical ABTS tal vez por que la molécula logra estabilizarse y es lo máximo que puede transferir para seguir de manera estable (Figura 32) (Acerson *et al.* 2013).

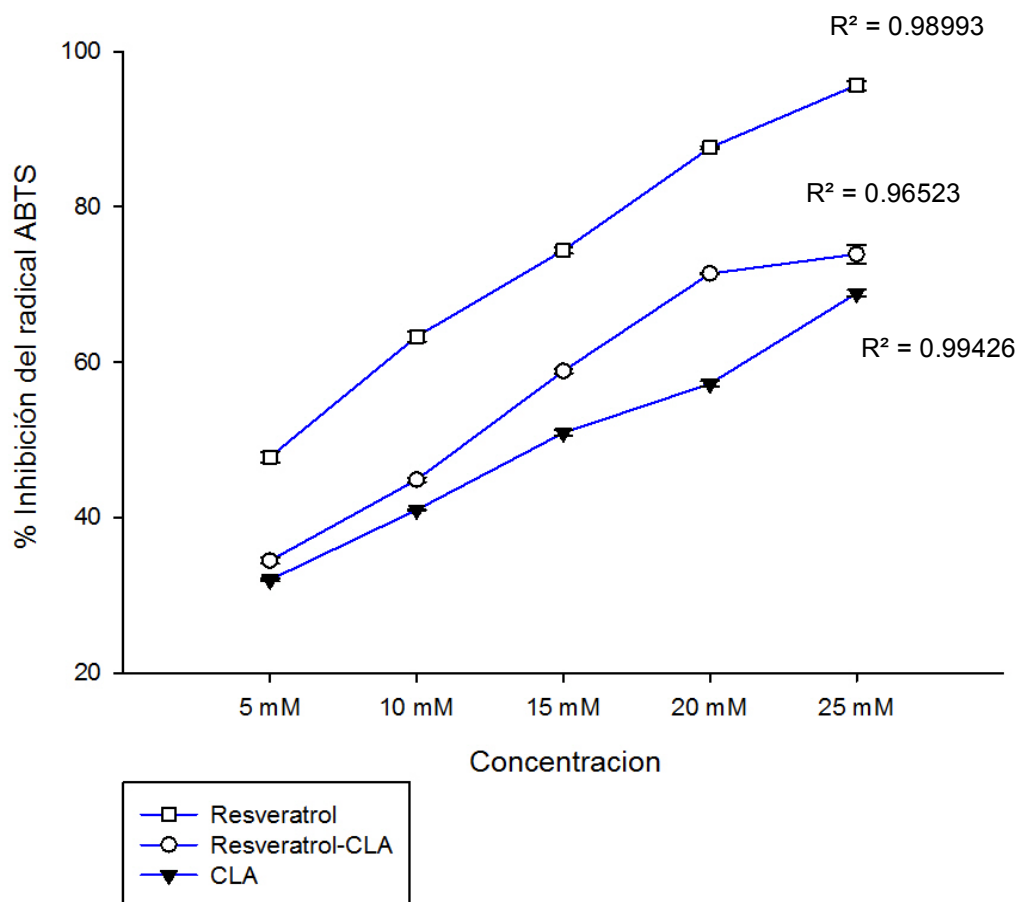


Figura 32. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado resveratrol-CLA mediante el método de ABTS.

9.7 Lipofilización de vainillina-ácido linoleico conjugado y evaluación de los espectros de RMN de ^1H .

Se obtuvieron los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de la vainillina y del sistema lipofilizado (vainillina-ácido linoleico conjugado), para corroborar que se haya formado el compuesto lipofilizado, se asignaron las señales de acuerdo al desplazamiento químico de cada uno de los hidrógenos de la molécula lipofilizada y se compararon con los espectros de los antioxidantes precursores; se utilizaron experimentos de RMN bidimensional los cuales muestran las correlaciones tanto heteronucleares ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) y homonucleares ($^1\text{H}/^1\text{H}$) (Anexos), para una asignación inequívoca de las señales. En la Figura 33 se muestra el espectro de RMN ^1H de la vainillina donde se observan señales que corresponden a los hidrógenos del

grupo metilo (-CH₃), la cual aparece como una señal sencilla alrededor de $\delta = 4$ ppm debido a que el átomo de oxígeno desplaza a campo bajo a estos hidrógenos; los hidrógenos de la parte aromática de la vainillina se observaron como señales sencillas alrededor de $\delta = 6.8-7.5$ ppm; por último se presentó una señal sencilla en $\delta = 9.8$ ppm que corresponde al hidrógeno del grupo aldehído encontrándose altamente desplazado por el grupo carbonilo. En el espectro de RMN de ¹H del sistema lipofilizado (Figura 34) se presentaron señales alrededor de $\delta = 0.98$ ppm correspondientes al hidrógeno del grupo metilo (-CH₃) de la molécula lipofilizada, principalmente de la porción del ácido linoleico conjugado, esta señal no se observó en el espectro de la vainillina (Figura 33) debido a que el metilo (-CH₃) que tiene la vainillina en su estructura química corresponde a un metilo de tipo metoxilo (-O-CH₃) cuya señal aparece más a campo bajo ($\delta = 4$ ppm). Las señales que se muestran alrededor de $\delta = 1.1-2.4$ ppm corresponden a los grupos metilenos (-CH₂) de la cadena hidrocarbonada de la porción del ácido linoleico conjugado las cuales se presentaron como señales múltiples por el acoplamiento de todos los hidrógenos vecinos (Figura 34). En $\delta = 3.9$ ppm se muestra la señal que corresponde al grupo metoxilo (-O-CH₃) unido al anillo aromático, esta señal se observa tanto en el sistema lipofilizado como en la vainillina; alrededor de $\delta = 5.2-6.4$ ppm se muestran las señales de los hidrógenos de los grupos metinos (-CH) que pertenecen a los enlaces vinílicos de la cadena hidrocarbonada; en $\delta = 7.0-7.4$ ppm se muestran las señales correspondientes a los grupos metinos (-CH) de los dobles enlaces del anillo aromático de la molécula lipofilizada que también aparecen en el espectro de la vainillina (Figura 33) y por último alrededor de $\delta = 9.8$ ppm aparecen señales del hidrógeno del grupo aldehído (-CHO) de la molécula lipofilizada (Figura 34) que también se llega a observar en el espectro de RMN de ¹H de la vainillina (Figura 33).

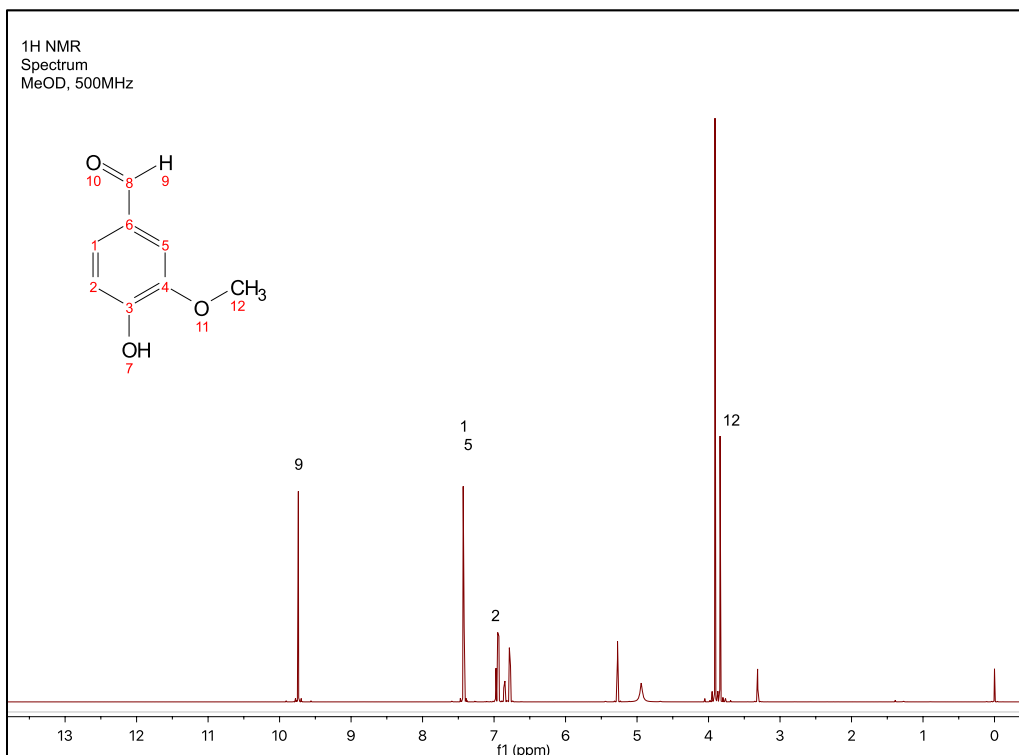


Figura 33. Espectro de RMN de ^1H de la vainillina disuelto en metanol deuterado (CD_3OD) a 500 MHz.

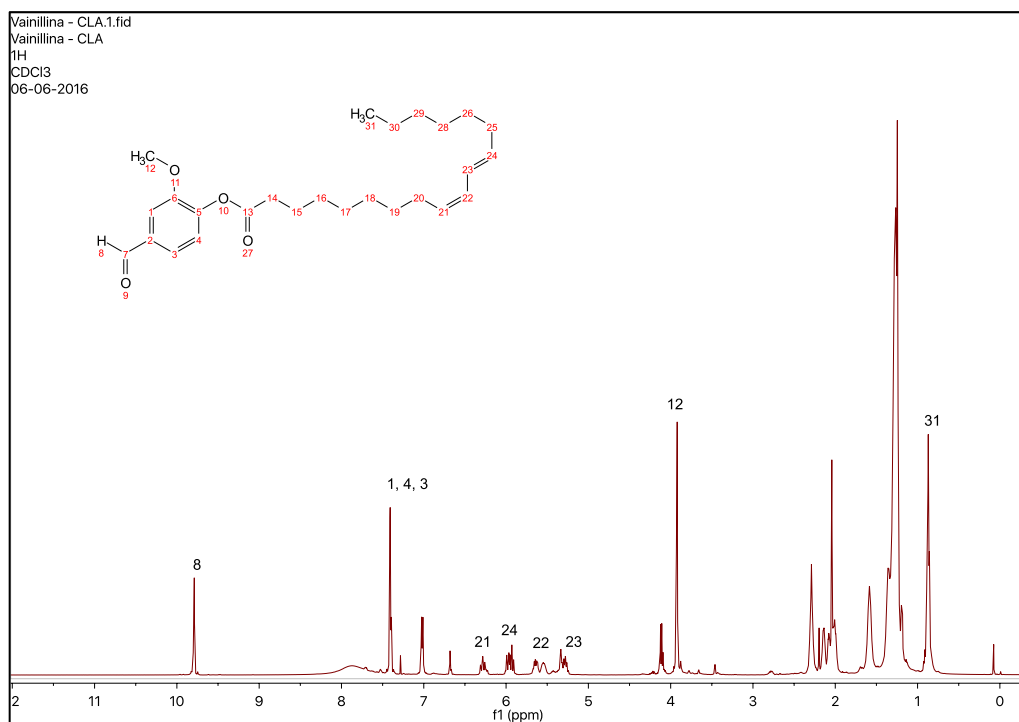


Figura 34. Espectro de RMN de ^1H del sistema lipofilizado vainillina-ácido linoleico conjugado disuelto en cloroformo deuterado (CDCl_3) a 500 MHz.

9.7.1. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado vainillina-ácido linoleico conjugado mediante el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•).

El sistema lipofilizado presentó una actividad antioxidante mayor a la de sus antioxidantes precursores mediante el método del radical DPPH•, los resultados fueron reportados como porcentaje de inhibición del radical y se observa que el sistema lipofilizado obtuvo un porcentaje de inhibición de 85.21%, esto se debe a que la capacidad para transferir electrones es mucho más factible químicamente hablando en el sistema lipofilizado gracias a la estructura química que presenta la molécula ya que las dos partes de los antioxidantes precursores al estar lipofilizados ejercen un efecto mayoritario cuando están lipofilizados que cuando están por separado, esto se puede observar en la Figura 35 donde el que presenta una mayor actividad antioxidante es el sistema lipofilizado seguido del ácido linoleico conjugado cuyo valor en porcentaje de inhibición fue de 77.70% y con valores muy similares se observa que la vainillina obtuvo un porcentaje de inhibición de 77.53%. Este método permitió evaluar la actividad antioxidante de los tres compuestos, observando que el sistema lipofilizado tiene una gran actividad para inhibir al radical DPPH• mediante la transferencia de electrones gracias al grupo metoxilo (-OCH₃) que permite la incorporación del radical DPPH mediante la transferencia de electrones así como también al grupo aldehído y al doble enlace conjugado de la cadena hidrocarbonada la cual permite la captura de este radical (Tai *et al.* 2011).

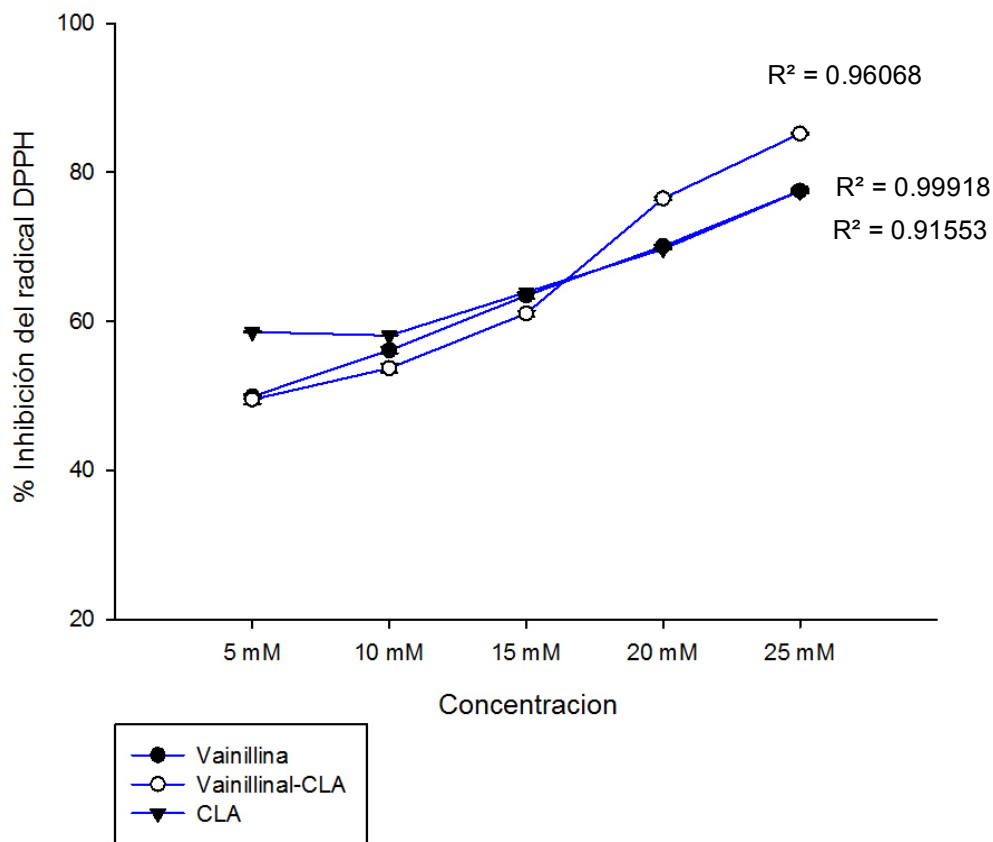


Figura 35. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado vainillina-CLA mediante el método del radical DPPH.

9.7.2. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado vainillina-ácido linoleico conjugado mediante el método del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).

Al igual que en el método del radical DPPH• se observa que el que presentó una mayor actividad antioxidante es el sistema lipofilizado en comparación con sus antioxidantes precursores, el sistema lipofilizado (vainillina-ácido linoleico conjugado) presentó una mayor cantidad de μmol de TROLOX/L cuyo valor fue de 12914.83 μmol de TROLOX/L a diferencia de sus antioxidantes precursores los cuales presentaron valores de 10263.17 μmol de TROLOX/L para la vainillina y 3566.50 μmol de TROLOX/L para el ácido linoleico conjugado, claramente se observa en la Figura 36 que el sistema lipofilizado en todas las concentraciones presenta una mayor cantidad de μmol de TROLOX/L en comparación con sus

antioxidantes precursores, esto se debe a que la capacidad reductora del sistema lipofilizado al tener unido a los dos antioxidantes mediante la esterificación presenta un mayor efecto para reducir el Fe^{+3} a Fe^{+2} en el complejo que se forma en este método el cual nos indica la actividad antioxidante y la capacidad reductora de algún compuesto.

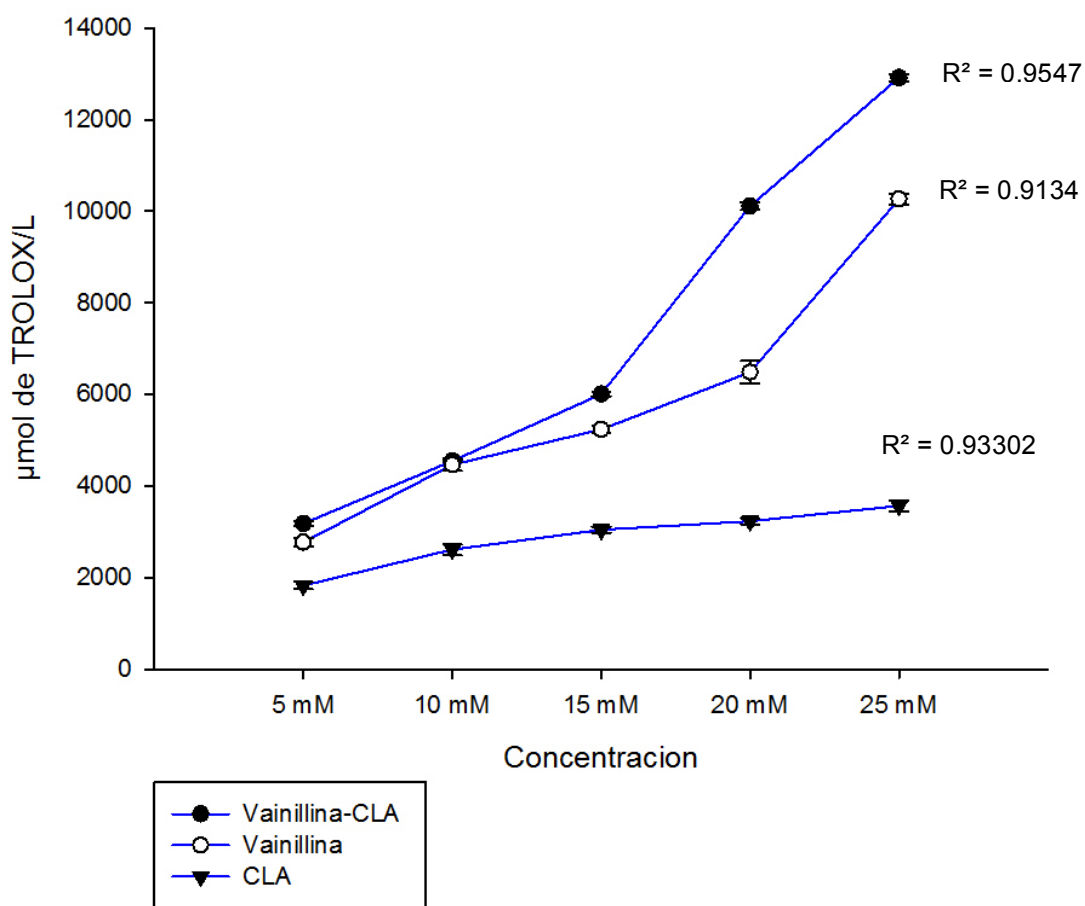


Figura 36. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado vainillina-CLA mediante el método de FRAP.

9.7.3. Evaluación de la actividad antioxidante del sistema lipofilizado vainillina-ácido linoleico conjugado mediante el método del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS•).

La actividad antioxidante mediante el método del ABTS• presenta una tendencia muy similar entre el sistema lipofilizado y la vainillina teniendo valores mas altos

en la vainillina, aunque sus valores a diferentes concentraciones son muy similares; los valores más altos en cada uno de los compuestos se observó a 25 mM en donde podemos observar que el porcentaje de inhibición del radical ABTS• para el sistema lipofilizado fue de 90.94%, para la vainillina fue de 94.27% y por último para el ácido linoleico conjugado presentó un porcentaje de 68.87%. En la Figura 37 se puede observar la tendencia que hemos mencionado entre la vainillina y el sistema lipofilizado que claramente son muy similares en cada una de las reacciones, y que estos dos compuestos presentan una mayor actividad antioxidante en comparación con el ácido linoleico conjugado.

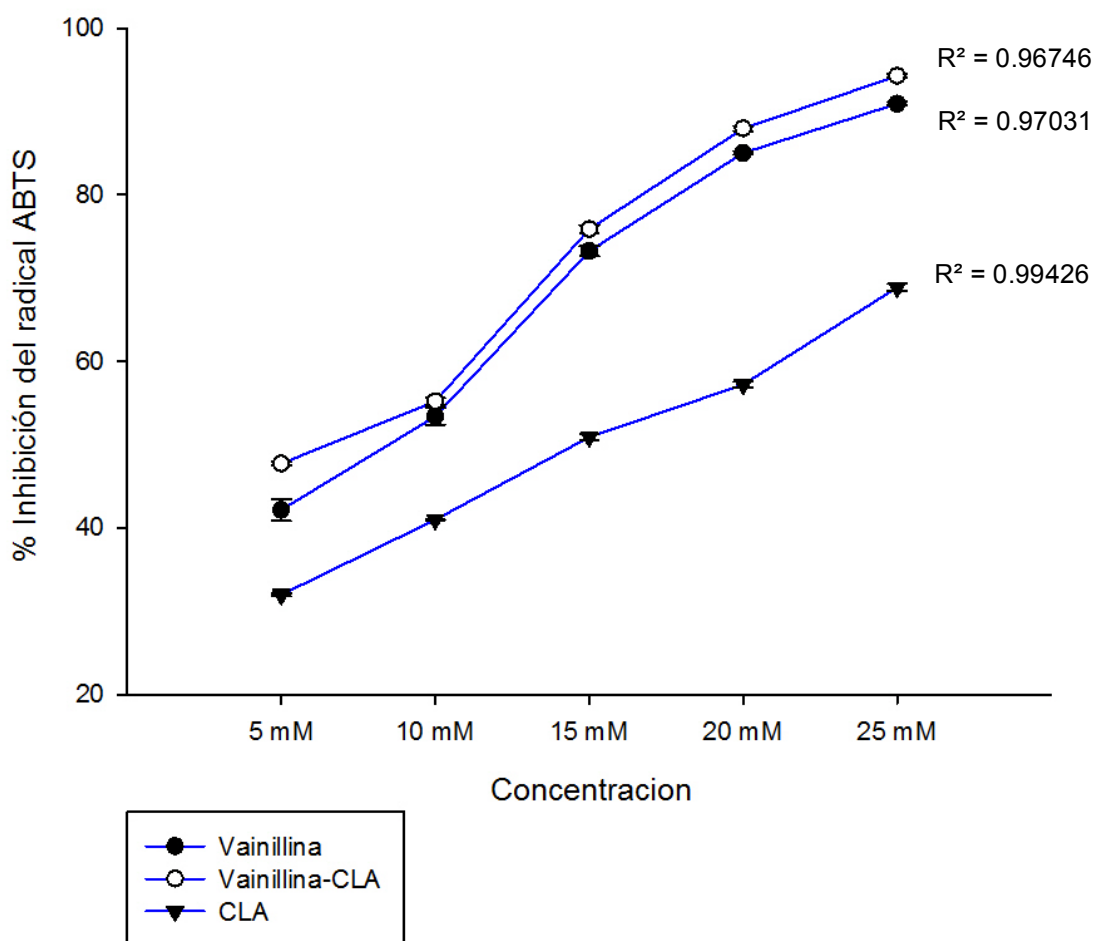


Figura 37. Actividad antioxidante del sistema lipofilizado vainillina-CLA mediante el método de ABTS.

9.8 Comparación de los sistemas lipofilizados mediante el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•).

En la Figura 38 se observa la comparación de todos los sistemas lipofilizados que se realizaron en este trabajo de investigación, observando que los sistemas lipofilizados que presentan un mayor porcentaje de inhibición ante el radical DPPH• son el carvacrol-CLA, ácido ascórbico-CLA y la vainillina-CLA observándose diferencias significativas entre el sistema conformado por ácido ascórbico-CLA y vainillina-CLA. El sistema conformado por carvacrol-CLA no presenta diferencias significativas con los sistemas ácido ascórbico-CLA y vainillina-CLA. El sistema conformado por carvacrol-CLA es el que presenta un mayor porcentaje de inhibición en comparación con todos los sistemas lipofilizados.

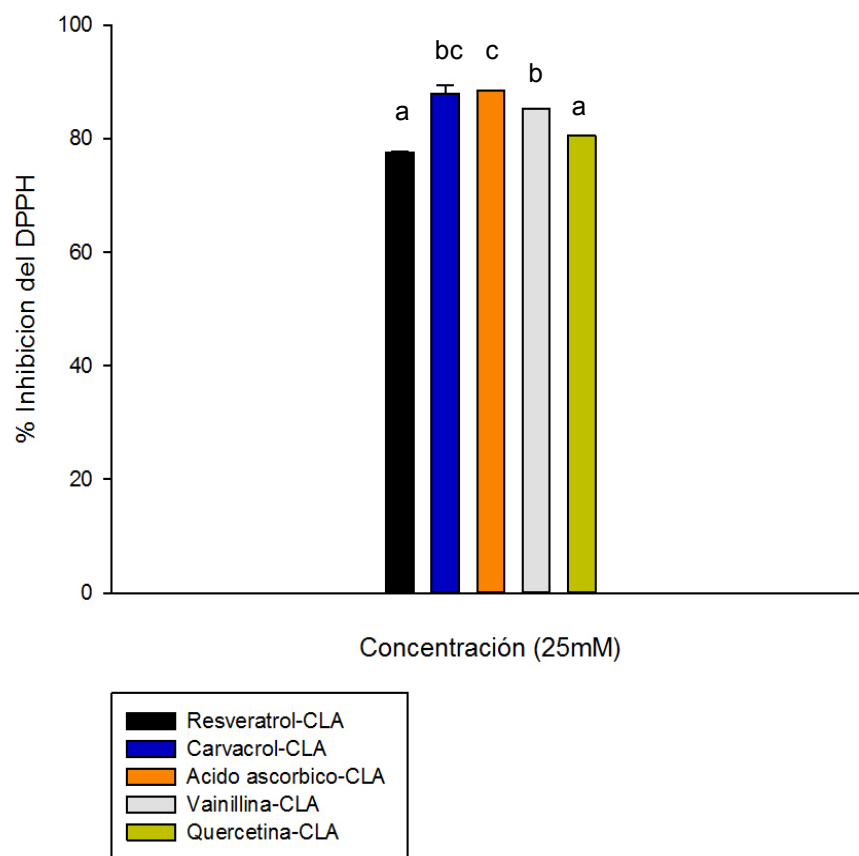


Figura 38. Actividad antioxidante de los sistemas lipofilizados mediante el método de DPPH.

9.9 Comparación de los sistemas lipofilizados mediante el método del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).

Se realizó la comparación de la actividad antioxidante mediante el método de FRAP de cada uno de los sistemas lipofilizados realizados en este trabajo de investigación, en la Figura 39 se observa claramente que el sistema lipofilizado que presenta una mejor actividad antioxidante mediante el método de FRAP es el sistema carvacrol-CLA, el cual es el que presentó una mayor cantidad de μmol de TROLOX/L y es el que presenta diferencias significativas con cada uno de los sistemas lipofilizados; también se puede observar que los sistemas quercetina-CLA y vainillina-CLA no presentan diferencias significativas siendo los sistemas con una mayor actividad antioxidante mediante este método.

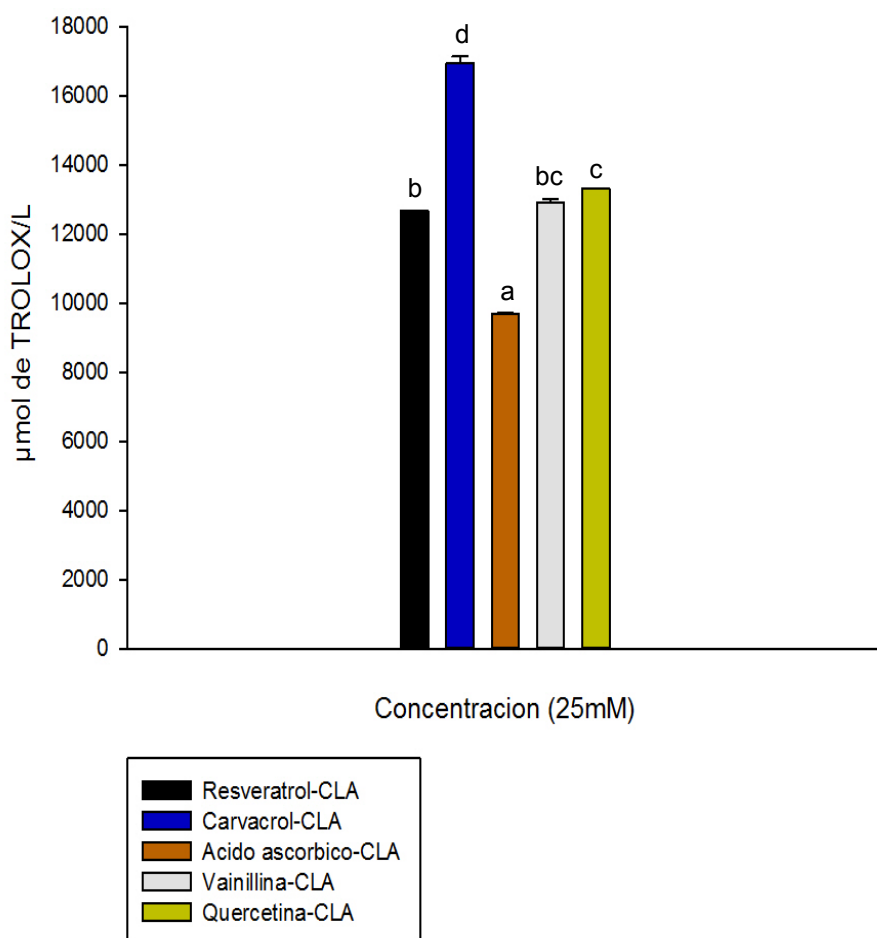


Figura 39. Actividad antioxidante de los sistemas lipofilizados mediante el método de FRAP.

9.10 Comparación de los sistemas lipofilizados mediante el método del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS•).

En la Figura 40 se representa la actividad antioxidante mediante el método del radical ABTS• donde se observa el comportamiento y la comparación de cada uno de los sistemas lipofilizados realizados en este trabajo de investigación. Los sistemas lipofilizados que presenta un mayor porcentaje de inhibición son el carvacrol-CLA y el sistema quercetina-CLA los cuales no presentan diferencias significativas, el siguiente sistema lipofilizado que presenta una buena actividad antioxidante es el sistema vainillina-CLA el cual presenta diferencias significativas entre los sistemas ya mencionados (carvacrol-CLA y quercetina-CLA). El que presentó porcentajes de inhibición más bajos fue el sistema resveratrol-CLA que presenta diferencias significativas con todos los sistemas lipofilizados.

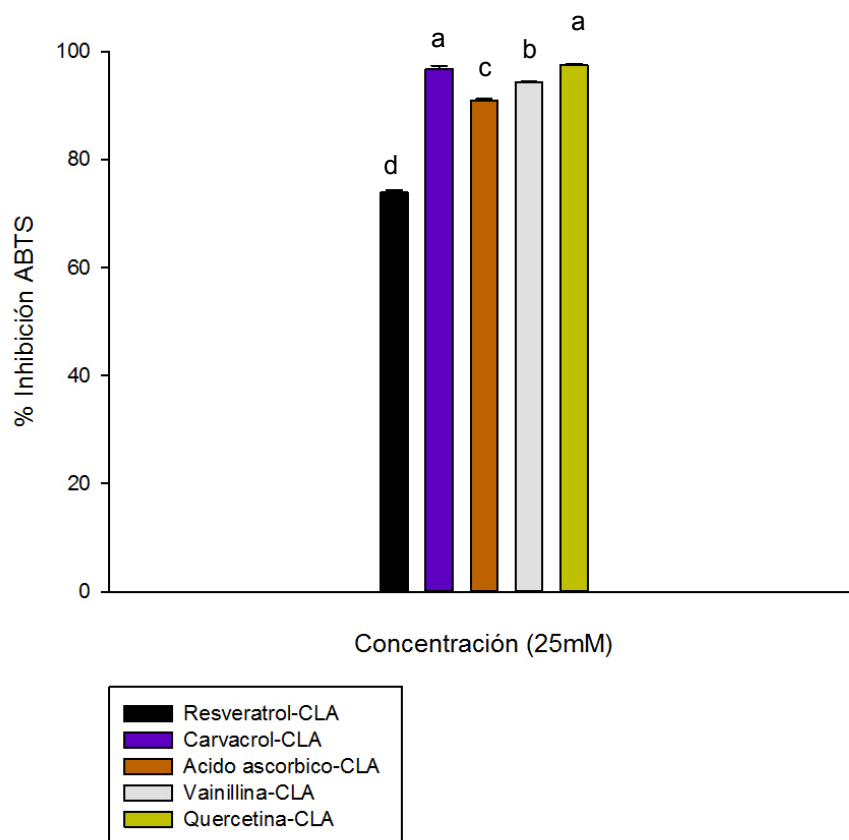


Figura 40. Actividad antioxidante de los sistemas lipofilizados mediante el método de ABTS.

9.11 Correlación de Pearson de los sistemas lipofilizados en los métodos de DPPH, FRAP y ABTS.

Se realizó el análisis de correlación de Pearson en cada una de las variables para observar la relación entre cada una de ellas en los métodos utilizados para medir su actividad antioxidante (DPPH, FRAP y ABTS), con el objetivo de medir el grado de covariación de las diferentes variables y determinar si existe una relación lineal entre las mismas. En el método del radical ABTS se encontró una correlación positiva en la actividad antioxidante de cada uno de los antioxidantes que se evaluaron, se observa que existe también una correlación positiva entre los sistemas lipofilizados y cada uno de los antioxidantes precursores, ya que el índice de correlación es alto tanto en los sistemas lipofilizados como en todos los antioxidantes que se evaluaron (Cuadro 4); este comportamiento se debe a la tendencia lineal en la actividad antioxidante de los sistemas lipofilizados y los antioxidantes precursores, es decir, conforme va aumentando la concentración en los antioxidantes y sistemas lipofilizados mayor es la actividad antioxidante en el método del radical ABTS.

En los métodos FRAP y DPPH se obtuvieron correlaciones positivas tanto en los sistemas lipofilizados como en los antioxidantes precursores; en el método del radical DPPH los sistemas lipofilizados están altamente relacionados con sus antioxidantes precursores ya que la actividad antioxidante en cada uno de los casos fue aumentando conforme aumentaba la concentración (Cuadro 5), aunque en el método del radical DPPH se obtuvieron valores diferentes en el ácido linoleico conjugado con respecto a los antioxidantes precursores y los sistemas lipofilizados, existe una alta correlación con dichos compuestos (Cuadro 5) ya que la tendencia es lineal. De igual forma, en el método del radical FRAP las correlaciones son perfectamente positivas estadísticamente hablando, ya que el mismo comportamiento que se observó en los métodos ABTS y DPPH se presenta en el método de FRAP; los valores del coeficiente de correlación en los antioxidantes y sistemas lipofilizados son positivos (Cuadro 6), la tendencia de igual manera es lineal y conforme aumenta la concentración aumenta la actividad antioxidante por el método de FRAP, observándose que en los tres métodos para

medir la actividad antioxidante (ABTS, FRAP y DPPH) las correlaciones que se muestran son perfectamente positivas ya que no hay una covariación entre los antioxidantes precursores y los sistemas lipofilizados así como también la tendencia que se presenta en cada uno de los métodos es una tendencia lineal.

Cuadro 4. Valores del coeficiente de correlación de la actividad antioxidante por el método del radical ABTS de los antioxidantes precursores y sistemas lipofilizados.

	CL	Q-CL	Q	R-CL	R	C-CL	C	A-CL	A	V-CL	V
CL	1	0.985	0.991	0.971	0.988	0.975	0.971	0.982	0.988	0.976	0.978
Q-CL		1	0.999	0.971	0.976	0.989	0.973	0.981	0.982	0.981	0.974
Q			1	0.977	0.986	0.987	0.977	0.987	0.987	0.983	0.979
R-CL				1	0.991	0.986	0.997	0.998	0.993	0.994	0.998
R					1	0.975	0.984	0.996	0.991	0.983	0.989
C-CL						1	0.993	0.989	0.993	0.997	0.991
C							1	0.996	0.996	0.999	0.999
A-CL								1	0.997	0.995	0.997
A									1	0.997	0.998
V-CL										1	0.998
V											1

CL= ácido linoleico conjugado; Q-CL=sistema lipofilizado quercetina-CLA; Q=quercetina; R-CL=sistema lipofilizado resveratrol-CLA; R=resveratrol; C-CL=sistema lipofilizado carvacrol-CLA; C= carvacrol; A-CL=sistema lipofilizado ácido ascórbico-CLA; A=ácido ascórbico; V-CL=sistema lipofilizado vainillina-CLA; V=vainillina

Cuadro 5. Valores del coeficiente de correlación de la actividad antioxidante por el método del radical DPPH de los antioxidantes precursores y sistemas lipofilizados.

	CL	Q-CL	Q	R-CL	R	C-CL	C	A-CL	A	V-CL	V
CL	1	0.977	0.967	0.906	0.965	0.987	0.974	0.837	0.991	0.983	0.964
Q-CL		1	0.962	0.96	0.999	0.986	0.963	0.917	0.982	0.997	0.989
Q			1	0.902	0.958	0.984	0.977	0.871	0.973	0.974	0.964
R-CL				1	0.964	0.909	0.942	0.984	0.946	0.94	0.983
R					1	0.982	0.954	0.927	0.973	0.995	0.988
C-CL						1	0.963	0.858	0.979	0.995	0.968
C							1	0.902	0.993	0.963	0.982
A-CL								1	0.893	0.894	0.952
A									1	0.982	0.986
V-CL										1	0.982
V											1

CL= ácido linoleico conjugado; Q-CL=sistema lipofilizado quercetina-CLA; Q=quercetina; R-CL=sistema lipofilizado resveratrol-CLA; R=resveratrol; C-CL=sistema lipofilizado carvacrol-CLA; C= carvacrol; A-CL=sistema lipofilizado ácido ascórbico-CLA; A=ácido ascórbico; V-CL=sistema lipofilizado vainillina-CLA; V=vainillina

Cuadro 6. Valores del coeficiente de correlación de la actividad antioxidante por el método del radical FRAP de los antioxidantes precursores y sistemas lipofilizados.

	CL	Q-CL	Q	R-CL	R	C-CL	C	A-CL	A	V-CL	V
CL	1	0.913	0.937	0.908	0.964	0.953	0.947	0.914	0.935	0.893	0.896
Q-CL		1	0.997	0.99	0.946	0.992	0.987	0.991	0.994	0.998	0.951
Q			1	0.996	0.96	0.995	0.99	0.994	0.999	0.99	0.942
R-CL				1	0.942	0.991	0.986	0.988	0.992	0.999	0.956
R					1	0.972	0.983	0.95	0.966	0.931	0.905
C-CL						1	0.996	0.981	0.992	0.987	0.963
C							1	0.978	0.99	0.981	0.956
A-CL								1	0.997	0.98	0.904
A									1	0.985	0.928
V-CL										1	0.962
V											1

CL= ácido linoleico conjugado; Q-CL=sistema lipofilizado quercetina-CLA; Q=quercetina; R-CL=sistema lipofilizado resveratrol-CLA; R=resveratrol; C-CL=sistema lipofilizado carvacrol-CLA; C= carvacrol; A-CL=sistema lipofilizado ácido ascórbico-CLA; A=ácido ascórbico; V-CL=sistema lipofilizado vainillina-CLA; V=vainillina

9.12 Evaluación teórica y análisis de los parámetros toxicológicos de los antioxidantes precursores y los sistemas lipofilizados.

Se determinaron teóricamente los parámetros toxicológicos (mutagenicidad, tumorigenicidad, efectos sobre reproducción e irritación) de los antioxidantes precursores y los sistemas lipofilizados mediante el programa OSIRIS Data Warrior v.4.4.3. De los antioxidantes precursores el único que no presentó alguna propiedad toxicológica es el ácido ascórbico ya que por ser una vitamina hidrosoluble puede ser eliminada por la orina, aunque el valor de cLog P es bajo lo cual conlleva a que no sea fácilmente absorbido y su difusión por las membranas sea baja (Cuadro 7). En el cuadro 7 se observa que la quercetina, resveratrol y la vainillina presentaron características mutagénicas, esto puede deberse a que estas moléculas no son capaces de atravesar por completo las membranas biológicas; impidiendo su completa absorción, por tal motivo estos antioxidantes en presencia de algunos iones (principalmente de cobre) presentan propiedades prooxidantes, lo que conlleva a que presenten propiedades mutagénicas (Ahmad *et al.* 2005, Vrijisen *et al.* 1990, Utesch *et al.* 2008). Este comportamiento no se observa en los sistemas lipofilizados (Cuadro 8) ya que por su carácter lipofílico podrían tener una mayor absorción y una menor toxicidad que los compuestos precursores.

En el cuadro 8 se observa que ninguno de los sistemas lipofilizados presentó características mutagénicas y tumorígenas, debido a que al aumentar la liposolubilidad de los antioxidantes precursores al momento de lipofilizarlos aumenta la absorción, disminuyendo la posibilidad de que se vuelvan prooxidantes y provoquen alteraciones en el organismo (Ahmad *et al.* 2005, Vrijisen *et al.* 1990, Utesch *et al.* 2008). El sistema vainillina-CLA presentó mejores características que su antioxidante precursor, ya que se llega a observar que el sistema lipofilizado no presenta propiedades mutagénicas y sobre efectos en la reproducción, observándose una mejora en las propiedades toxicológicas en los sistemas lipofilizados en comparación con los antioxidantes precursores.

Cuadro 7. Parámetros toxicológicos de los antioxidantes precursores.

Antioxidantes	Mutagénico	Tumorigeno	Efec. reprod.	Irritante
Ácido ascórbico	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Carvacrol	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Alto
Quercetina	Alto	Alto	Ninguna	Ninguna
Resveratrol	Alto	Ninguna	Alto	Ninguna
Vainillina	Alto	Ninguna	Alto	Alto
Ácido linoleico conjugado	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna

Cuadro 8. Parámetros toxicológicos de los sistemas lipofilizados.

Antioxidantes	Mutagénico	Tumorigeno	Efec. reprod.	Irritante
Ácido ascórbico-CLA	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Carvacrol-CLA	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Alto
Quercetina-CLA	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Resveratrol-CLA	Ninguna	Ninguna	Alto	Ninguna
Vainillina-CLA	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Alto

9.13 Determinación del valor de HLB (Balance hidrofílico-lipofílico) de los antioxidantes precursores y los sistemas lipofilizados.

Se calculó el valor de HLB (Balance hidrofílico-lipofílico) mediante el método de Davies (1957) de los antioxidantes precursores así como el de los sistemas lipofilizados para observar los valores entre los sistemas lipofilizados en comparación con la de sus antioxidantes precursores. Los valores de los antioxidantes precursores se muestran en el Cuadro 7 donde se observa que el ácido ascórbico y la quercetina presentaron valores muy similares en el HLB teniendo valores de 15.57 para el ácido ascórbico y 15.42 para la quercetina, esto se debe a que presentan grupos funcionales muy similares en su estructura química además de que son moléculas altamente polares. Los valores de HLB de cada uno de los antioxidantes precursores y de los sistemas lipofilizados se determinaron asignando los valores correspondientes de cada uno de los grupos funcionales que contienen en su estructura química.

Cuadro 9. Cálculo de HLB por el método de Davies de los antioxidantes precursores.

Antioxidantes	HLB	Porcentaje de hidrofiliidad (%)
Ácido linoleico conjugado	1.025	
Ácido ascórbico	15.575	100
Carvacrol	5.570	100
Resveratrol	8.425	100
Quercetina	15.425	100
Vainillina	7.825	100

Griffin (1954) determinó que valores de HLB de 20 corresponden a moléculas o agentes tensioactivos altamente hidrofílicos, y valores cercanos a 0 corresponden a moléculas altamente hidrófobas (lipofílicas); en los antioxidantes precursores que se muestran en el Cuadro 7 la tendencia de los valores es mas hidrofílica que

lipofílica aunque se pueden observar que el carvacrol, la vainillina y el resveratrol presentan valores mas bajos en comparación con los valores del ácido ascórbico y la quercetina, esto se debe a que la polaridad del carvacrol, resveratrol y la vainillina es intermedia lo que conduce a que presenten valores de HLB entre 5.57-8.42.

Cuadro 10. Cálculo de HLB por el método de Davies de los sistemas lipofilizados.

Antioxidantes	HLB	Porcentaje de lipofilización (%)
Ácido ascórbico-CLA	8	48.64
Carvacrol-CLA	0.001	99.98
Resveratrol-CLA	0.850	89.91
Quercetina-CLA	7.850	49.11
Vainillina-CLA	0.250	99.68

En el Cuadro 8 se muestran los valores de HLB obtenidos mediante el método de Davies (1957) para los sistemas lipofilizados, en este cuadro se observa que con el valor de HLB se pudo calcular el porcentaje de lipofilización en cada uno de los sistemas, obteniendo los mayores porcentajes en los sistemas carvacrol-CLA, vainillina-CLA y quercetina-CLA. Estos cálculos nos permiten identificar de acuerdo a la estructura química de cada uno de los sistemas, cuales son los que tuvieron una mejor lipofilización, lo cual concuerda con lo realizado en este trabajo de investigación ya que en todas las pruebas antioxidantes los que tuvieron mejores resultados son los que presentan una favorable lipofilización de acuerdo a su HLB y el porcentaje de lipofilización. Los valores de HLB nos muestran que los sistemas lipofilizados, al estar más cercanos a valores de 0 son mas hidrofóbicos (lipofílicos) demostrándose que las reacciones de esterificación para llevar a cabo la lipofilización tuvieron un buen rendimiento, ya que el valor de HLB nos indica que la lipofilización se realizó de manera idónea, estos datos concuerdan con lo reportado por Finch y Zhang (2014) quienes observaron que entre mayor es la

cadena alquílica en los polipropilenglicoles que ellos evaluaron menor era el valor del HLB calculado por el método de Davies (1957). De igual forma Guo *et al.* (2006), calcularon los valores de HLB de diferentes ésteres de alquilo mediante el método de Davies (1957), observándose el mismo comportamiento, es decir, conforme aumentaba la cadena de alquilo del éster menor era la polaridad de la molécula y menor era el valor de HLB, presentándose el mismo comportamiento en los sistemas lipofilizados y antioxidantes precursores.

9.14 Evaluación teórica de los parámetros fisicoquímicos cLog P y cLog S para los antioxidantes precursores y los sistemas lipofilizados.

Mediante el programa OSIRIS Data Warrior v.4.4.3 se determinaron los parámetros fisicoquímicos (cLog P y cLog S) de los compuestos precursores y los sistemas lipofilizados. El valor de cLog P de un compuesto es el logaritmo del coeficiente de partición, el cual es un parámetro fisicoquímico que permite determinar de modo cuantitativo el grado de lipofilia (también denominada hidrofobicidad) de una molécula, permitiendo inferir cómo se comportará en el entorno de los fluidos biológicos del organismo y como será su paso mediante difusión pasiva a través de membranas biológicas, es decir; entre mayor sea el valor de cLog P más lipofílico será la molécula (Cambridge MedChem Consulting). En los cuadros 11 y 12 se observa que el valor del cLog P aumentó en los compuestos lipofilizados en comparación con sus antioxidantes precursores, esto debido al aumento de las propiedades lipofílicas en los sistemas lipofilizados en comparación con sus antioxidantes precursores, estos valores concuerdan con los valores de cLog S que permiten evaluar la solubilidad en agua de cada una de las moléculas y en los valores de HLB el cuál nos indica el balance hidrofílico/lipofílico donde se observan valores más bajos de HLB infiriendo que hay propiedades lipofílicas (Cuadro 9 y 10). En el caso de los valores de cLog S se observó que cuando disminuye el cLog S, menor será su solubilidad en agua; los compuestos que presentaron valores menores de cLog S fueron los sistemas lipofilizados debido al aumento de su carácter lipofílico en comparación con los antioxidantes precursores (Novamass).

Cuadro 11. Parámetros fisicoquímicos (cLog P y cLog S) de los antioxidantes precursores.

Antioxidantes	cLog P	cLog S
Ácido ascórbico	-2.4646	-0.349
Carvacrol	2.8448	-2.535
Quercetina	1.4902	-2.491
Resveratrol	2.8295	-2.864
Vainillina	1.7772	-1.662
Ácido linoleico conjugado	6.4669	-4.323

Cuadro 12. Parámetros fisicoquímicos (cLog P y cLog S) de los sistemas lipofilizados.

Antioxidantes	cLog P	cLog S
Ácido ascórbico-CLA	4.786	-4.623
Carvacrol-CLA	9.943	-6.995
Quercetina-CLA	8.740	-6.765
Resveratrol-CLA	9.927	-7.324
Vainillina-CLA	8.275	-6.122

10. CONCLUSIONES.

La actividad antioxidante en todos los compuestos estudiados en este trabajo de investigación presentaron una tendencia concentración dependiente en todos los métodos empleados para evaluar la actividad antioxidante. El sistema lipofilizado ácido ascórbico-CLA presentó una mayor actividad antioxidante en todos los métodos de evaluación que su antioxidante precursor (ácido linoleico conjugado), esto se debe al efecto que proporcionan los grupos hidroxilo del ácido ascórbico a diferencia del ácido linoleico conjugado que presenta una doble saturación que se encuentra conjugada.

La actividad antioxidante del sistema carvacrol-CLA presenta una mayor actividad en comparación con sus antioxidantes precursores en cada uno de los métodos que se evaluaron.

El sistema lipofilizado resveratrol-CLA presenta una actividad antioxidante más alta que el ácido linoleico pero mas baja que el resveratrol por sí sólo. La actividad antioxidante de los sistemas lipofilizados Carvacrol-CLA y Vainillina-CLA fueron más altos que los antioxidantes precursores en cada uno de los métodos de actividad antioxidante.

Los sistemas lipofilizados Carvacrol-CLA, Ácido ascórbico-CLA y Vainillina-CLA son los que presentan valores de porcentaje de inhibición del radical DPPH más altos en comparación con los demás sistemas lipofilizados.

La actividad antioxidante mediante el método de FRAP se presentó más alto en el sistema Carvacrol-CLA en comparación con cada uno de los sistemas lipofilizados. Los sistemas que presentaron mejores actividades antioxidantes en cada uno de los métodos fueron Carvacrol-CLA, Vainillina-CLA.

Mediante la RMN de ^1H y ^{13}C se pudieron determinar la formación de los sistemas lipofilizados en cada uno de los antioxidantes que se evaluaron observándose cada una de las señales pertinentes de los sistemas lipofilizados.

Los sistemas lipofilizados mostraron mejor comportamiento en la actividad antioxidante en comparación con sus compuestos precursores, siendo los sistemas con mejor actividad antioxidante el Carvacrol-CLA y Vainillina-CLA, observándose que los sistemas lipofilizados son mejores que su forma individual.

Los sistemas lipofilizados presentaron mejores características toxicológicas que los antioxidantes precursores, siendo los sistemas ácido ascórbico-CLA y quercetina-CLA los que no presentaron ninguna propiedad toxicológica.

Los sistemas lipofilizados presentaron valores altos de cLog P, generándose moléculas con un alto carácter lipofílico. Este comportamiento es muy importante en el área de los alimentos ya que podría causar un aumento en la disponibilidad e incorporación en matrices alimentarias más complejas y donde no se habían logrado incorporar, esto gracias a la modificación química de los antioxidantes precursores.

BIBLIOGRAFÍA

Abdulmajed, K., McGuigan, C., y Heard, C. (2005). Topical delivery of retinyl ascorbate: Comparative antioxidant activity towards DPPH. *Free Radical Research*, 39, 491-498.

Acerson, M. J., Fabick, K. M., Wong, Y., Blake, C., Lephart, E. D., y Andrus, M. B. (2013). A new synthesis of 4'-resveratrol esters and evaluation of the potential for anti-depressant activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2941-2944.

Ahmad, A., Asad Syed, F., Singh, S., Hadi, S.M. (2005). Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: Mutagenicity in plasmid DNA. *Toxicology Letters*, 1-12.

Akita, E., y Nakai, S. (1990). Lipophilization of β -lactoglobulin: Effect on allergenicity and digestibility. *Journal Food Science*, 6, 718-723.

Al-Malaika, S., Czeckaj, T., Scott, G., y Tillekeratne, M. K. (1989). Mechanism of antioxidant action: The photo-antioxidant behaviour of nitroalkanes. *Polymer Degradation and Stability*, 375-384.

Aoki, H., Taneyama, O., y Orimo, N. (1981). Effect of lipophilization of soy protein on its emulsion properties. *Journal Food Science*.

Ayres, G. (2001). *Analisis quimico cuantitativo*. Mexico: HARLA.

Badui, S. (1999). *Química de alimentos*. Mexico: Addison Wesley Longman.

Bancroft, W. D. (1913). Theory of emulsification. *Journal of Physical Chemistry*, 501-519.

Beena, K. D., y Rawat, D. S. (2013). Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 641-645.

Benzie, I. F., y Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 70-76.

Bernhaus, A., Fritzer-Szekeres, M., Grusch, M., Saiko, P., Krupitza, G., Venkateswarlu, S., y otros. (2009). Digalloylresveratrol, a new phenolic acid

derivative induces apoptosis and cell cycle arrest in human HT-29 colon cancer cells. *Cancer letters*, 299-304.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 25-30.

Britton , G., y Hornero-Méndez, D. (1997). Carotenoids and colour in fruit and vegetables. *Proceedings of the phytochemical society of Europe*, 11-27.

Buettner, G. R., y Moseley, P. L. (1993). EPR spin trapping of free radicals produced by bleomycin and ascorbate. *Free Radical Research Communications*, 19, 89-93.

Bukhari, S. B., Memon, S., Mahroof-Tahir, M., y Bhangar, M. I. (2009). Synthesis, characterization and antioxidant activity copper-quercetin complex. *Spectrochimica*, 1901-1906.

Caddeo, C., Manconi, M., Fadda, A. M., Lai, F., Lampis, S., Diez-Sales, O., y otros. (2013). Nanocarriers for antioxidant resveratrol: Formulation approach, vesicle self-assembly and stability evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 327-332.

Cahn, A., y Lynn, J. L. (1983). *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (3a ed. ed.). New York: Wiley-Interscience.

Cambridge MedChem Consulting.
<http://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/physiochem/logD.html>
Consultada el 19, Octubre, 2016.

Cemeli, E., Baumgartner, A., y Anderson, D. (2009). Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research*, 51-67.

Chen, W., Sun, S., Cao, W., Liang, Y., y Song, J. (2009). Antioxidant property of quercetin-Cr(III) complex: The role of Cr(III) ion. *Journal of Molecular Structure*, 194-197.

Chin , S. F., Liu, W., Storkson, J. M., Ha, Y. L., y Pariza, M. W. (1992). Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *Journal of Food Composition and Analysis*, 185-197.

- Chipault, J. R. (1962). Antioxidants for use in food. *Autoxidation and antioxidants*, 477-542.
- Dadoly, J. (2007). The Merck Manual. 18th ed. *Medical Reference Services Quarterly*. 113-114
- Das, J., Pany, S., y Majhi, A. (2011). Chemical modifications of resveratrol for improved protein kinase C alpha activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 5321-5333.
- Davies, J. T. (1957). Gas/liquid and liquid/liquid interfaces. *In: Pro, 2nd Int. Congress on Surface Activity Butterworths*, 426-438.
- Davis, J. K. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium*, 1-31.
- Domingo, X. A. (1995). *Guide to the surfactants World* (1a ed. ed.). Barcelona: Proa.
- Dueñas, M., González-Manzano, S., González-Paramás, A., y Santos-Buelga, C. (2010). Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 443-449.
- Esin, S. C., Özyürek, M., Güc, K., y Lü, R. (2010). Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. *Talanta*, 1300-1309.
- Floegel, A., kim, D., Chung, S., Koo, S. I., y Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1043-1048.
- Fagali, N., y Catalá, A. (2008). Antioxidant activity of conjugated linoleic acid isomers, linoleic acid and its methyl ester determined by photoemission and DPPH techniques. *Biophysical Chemistry*, 56-62.
- Figuroa-Espinoza, M. C., y Villeneuve, P. (2005). Phenolic acids enzymatic lipophilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 79-87.
- Finch, J. A., y Zhang, W. (2014). Frother function-structure relationship: Dependence of CCC95 on HLB and the H-ratio. *Minerals Engineering*, 1-8.
- Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., y Kinsella, J. E. (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*, 1103-1104.

- Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science* , 875-880.
- Gülcin, I. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 210-218.
- Godic, A., Polisak, B., Adamic, M., y Dahmane, R. (2014). The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Gordon, M. H. (1990). The mechanism of antioxidant action in vivo. *Elsevier*, 1-18.
- Griffin, W. C. (1949). Classification of surface-active agents by HLB. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 311-326.
- Gülcin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, 345-391.
- Guo, X., Rong, Z., y Yin, X. (2006). Calculation of hydrophile-lipophile balance for polyethoxylated surfactants by group contribution method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 441-450.
- Guyot, B., Gueule, D., Pina, M., Graille, J., Farines, V., y Farines, M. (2000). Enzymatic synthesis of fatty esters in 5-caffeoyl quinic acid. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 93-96.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 33-50.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 1147-1150.
- Halliwell, B., y Gutteridge, J. M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 125-126.
- Ha, Y. L., Grimm, N. K., y Pariza, M. W. (1987). Anticarcinogens from fried ground beef: Heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, 1881-1887.
- Haque, Z., y Kito, M. (1983). Lipophilization of alfa-Casein. Purification and physicochemical properties of novel amphipathic fatty acyl peptides. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1392-1397.

Horwitt, M. K. (1986). Interpretations of requirements for thiamin, riboflavin, niacin, tryptophan, and vitamin E plus comments on balance studies and vitamin B-6. *Am. J. Clin. Nutr.* , 973-985.

Huang, D., Ou, B., y Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1841-1856.

Jiang, Y. L. (2008). Design, synthesis and spectroscopic studies of resveratrol aliphatic acid ligands of human serum albumin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 6406-6414.

Kamimura, J. A., Santos, E. H., Hill, L. E., y Gomes, C. L. (2014). Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *LWT-Food Science and Technology*, 701-709.

Katalinic, V., Modun, D., Music, I., y Bodan , M. (2005). Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline 6- sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power FRAP assays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 47-52.

Keaney, J. F., y Frei, B. (1995). *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*. San Diego: Academic Press.

Koga, T., y Terao, J. (1994). Antioxidant activity of a novel phosphatidyl derivative of vitamin E in lard and its model system. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1291-1294.

Kohen, R. y Nyska, A. (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 620-650.

Lacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., y Sebastiani, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 589-598.

Laguerre, M., Lopez Giraldo, L. J., Lecomte, J., Figueroa Espinoza, M. C., Barea, B., Weiss, J., y otros. (2010). Relationship between hydrophobicity and antioxidant ability of phenolipids in emulsion: a parabolic effect of the chain length of rosmarinate esters. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2869-2876.

Lucas-Abellán, C., Mercader-Ros, M. T., Zafrilla, M. P., Gabaldón, J. A., y Nuñez-Delicado, E. (2011). Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins. *Food and Chemical Toxicology*, 1255-1260.

Machlin, L. J. (1991). *Vitamin E: Handbook of vitamins* (2nd ed.). New York: Marcel-Decker.

Mahmood, U., Kaul, V. K., Acharya, R., y Jirovetz, L. (2003). p-Coumaric acid esters from *Tanacetum longifolium*. *Phytochemistry*, 851-853.

Mancini, R. A., y Hunt, M. C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 100-121.

Maxwell, S. R. (1995). Prospects for the use antioxidant therapies. *Drugs*, 345-361.

Miller, N. J., y Rice-Evans, C. A. (1995). Antioxidant activity of resveratrol in red wine. *Clinical Chemistry*, 1789.

Namiki, M. (1990). Antioxidants/antimutagens in food. *Food Science Nutrition*, 273-300.

Nihei, K., Nihei, A., y Kubo, I. (2004). Molecular design of multifunctional food additives: Antioxidative antifungal agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5011-5020.

Nishikimi, M., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N., y Yagi, K. (1994). Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for l-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for l-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *Journal Biological Chemistry*, 13685-13688.

Novamass. <http://www.sbw.fi/lead-optimization/experimental-logp-logd-logs-pka-analysis/> Consultada el 19, Octubre, 2016.

Pariza, M. W., Park, Y., y Cook, M. E. (2000). Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: Evidence and speculation. *Experimental Biology & Medicine*, 8-13.

Pellegrini, N., Del Rio, D., Colombi, B., Bianchi, M., y Brighenti, F. (2003). Application of the 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Radical cation assay to a flow injection system for the evaluation of antioxidant activity of

some pure compounds and beverages. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 260-264.

Pisoschi, A.M. y Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medical Chemistry*, 55-74.

Poljsak, B., Suput, D. y Milisav, I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

Prior, R. L. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4290-4302.

Pulido, R., Bravo, L., y Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 3396-3402.

Ramos, M., Beltrán, A., Peltzer, M., Valente, A. J., y Garrigós, M. d. (2014). Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *LWT-Food Science and Technology*, 470-477.

Ravichandran, R., Rajendran, M., y Devapiriam, D. (2014). Antioxidant study of quercetin and their metal complex and determination of stability constant by spectrophotometry method. *Food Chemistry*, 472-478.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., y Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compound. *Trends Plants Science*, 152-159.

Roginsky, V., y Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 235-254.

Rumsey, S. C., y Levine, M. (1998). Absorption transport and disposition of ascorbic acid in humans. *Nutrition Biochemistry*, 116-130.

Selvaraj, S., Mohan, A., Narayanan, S., Sethuraman, S. y Krishnan, U. (2013). Dose-dependent interaction of trans-resveratrol with biomembranes: Effects on antioxidant property. *Journal of Medical Chemistry*, 970-981.

Shahidi, F., y Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 1-25.

Shakeel, F., Haq, N., Raish, M., Siddiqui, N. A., Alanazi, F. K., y Alsarra, I. A. (2016). Antioxidant and cytotoxic effects of vanillin via eucalyptus oil containing self-nanoemulsifying delivery system. *Journal of Molecular Liquids*, 233-239.

Shantha, N. C., Decker, E. A., y Ustunol, Z. (1992). Conjugated linoleic acid concentration in processed cheese. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 425-428.

Shaw, D. J. (1980). *Introduction o colloid and surface chemistry*. (3a ed. ed.). Londres : Butterworths.

Simoni, D., Roberti, M., Invidiata, F. P., Aiello, E., Aiello, S., Marchetti, P., y otros. (2006). Stilbene-based anticancer agents: Resveratrol analogues active toward HL60 leukemic cells with a non-specific phase mechanism. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 3245-3248.

Smirnoff, N. (2000). Ascorbic acid: Metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr. Opin. Plant. Biol*, 229-235.

Sorensen, A.-D. M., de Diego, S., Petersen, L. K., Nielsen, N. S., Yang, Z., Xu, X., y otros. (2010). In effect of lipophilization of dihydrocaffeic acid on its antioxidative properties in fish oil enriched emulsion. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 134-145.

Sorensen, A.-D. M., Durand, E., Laguerre, M., Bayrasy, C., Lecomte, J., Villeneuve, P., y otros. (2014). Antioxidant properties and efficacies of synthesized alkyl caffeates, ferulates, and coumarates. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 12553-12562.

Sunderam, R. S., Mazumdar, U. K., y Gomathi, P. (2004). Antioxidant and antimicrobial activities of Bauhinia racemosa L. *Braz J Med Biol Res*, 1015-1024.

Suzuki, C., Ohnishi-Kameyama, M., Sasaki, K., Murata, T., y Yoshida, M. (2006). Behavior of glucosinolates in pickling Cruciferous Vegetables. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 9430-9436.

Tai, A., Sawano, T., Yazama, F., y Ito, H. (2011). Evaluation of antioxidant activity of vainillin by using multiple antioxidant assays. *Biochimica et Biophysica*, 170-177.

Taurozzi, P., y Bregni, C. (2008). Some considerations about the hydrophilic-lipophilic balance system. *International Journal of Pharmaceutics*, 44-51.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., y Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 669-675.

Tian, X., y Schaich, K. M. (2013). Effects of molecular structure on kinetics and dynamics of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity assay with ABTS. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 5511-5519.

Tsao, R., y Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, 85-99.

Utesh, D., Feige, K., Dasenbrock, J., Broschard, T.H., Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B. y Lines, T.C. (2008). Evaluation of the potential in vivo genotoxicity of quercetin. *Mutation Research*, 38-44.

Van Gossum, A., Shariff, R., Lemoyne, M., Kurian, R., y Jeejeebhoy, K. (1988). Increased lipid peroxidation after lipid infusion as measured by breath pentane output. *Am. Journal Clin. Nutr.*, 1394-1399.

Vrijssen, R., Michotte, Y. y Boeye, A. (1990). Metabolic activation of quercetin mutagenicity. *Mutation Research*, 243-248.

Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M. H., Oatis, J. E., y Walle, U. K. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 1377-1382.

Walker, R. B., y Everette, J. D. (2009). Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1156-1161.

Walton, N. J., Mayer, M. J., y Narbad, A. (2003). Vanillin. *Phytochemistry*, 505-515.

Watson, R. R., y Leonard, T. K. (1986). Selenium and vitamins A, E and C: nutrients with cancer prevention properties. *Journal Am. Diet. Assoc.*, 505-510.

Wheeler, G. L., Jones, M. A., y Smirnoff, N. (2000). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 365-369.

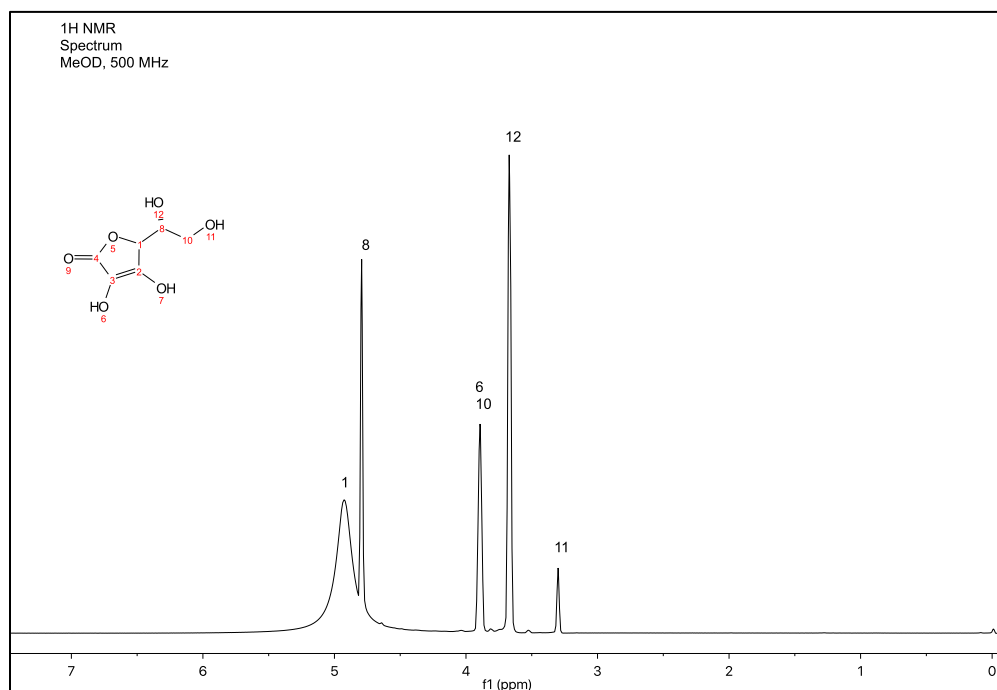
Winkler, B. S., Orseli, S. M., y Rex, T. S. (1994). The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. *Free Radic. Biol. Med.*, 333-349.

Wong, Y., Osmond, G., Brewer, K. I., Tyler, D. S., y Andrus, M. B. (2010). Synthesis of 4'-ester analogs of resveratrol and their evaluation in malignant melanoma and pancreatic cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1198-1201.

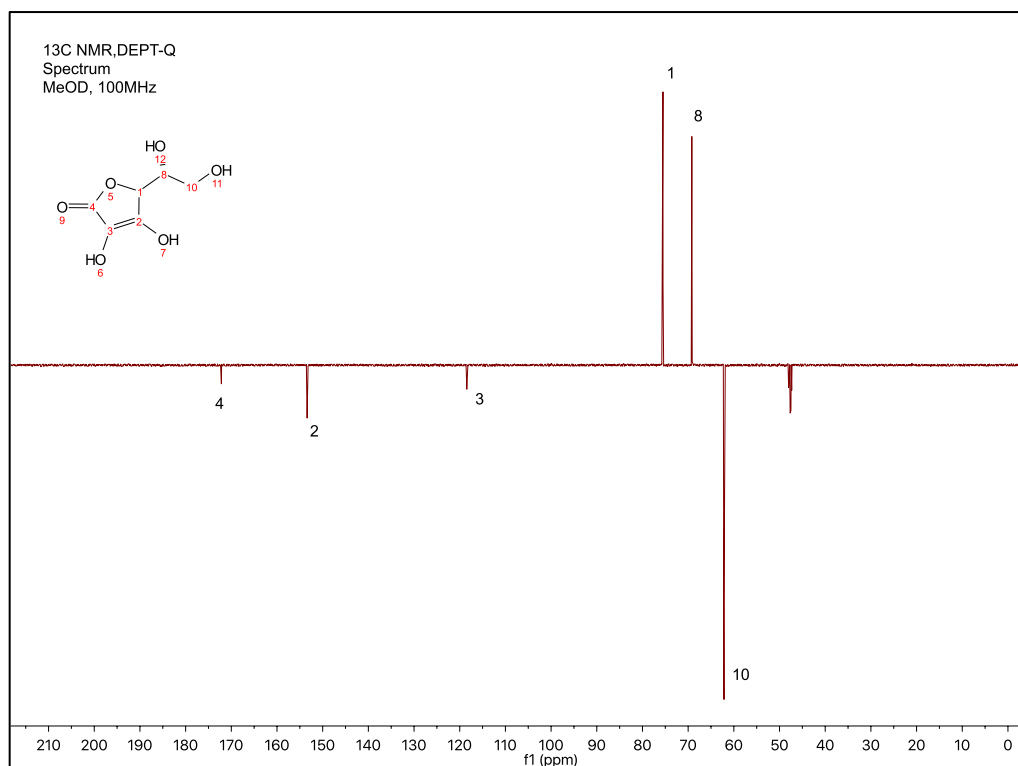
Zhang, Y., Shen, Y., Zhu, Y., y Xu, Z. (2015). Assessment of the correlations between reducing power, scavenging DPPH activity and anti-lipid oxidation capability of phenolic antioxidants. *LWT-Food Science and Technology*, 569-574.

ANEXOS

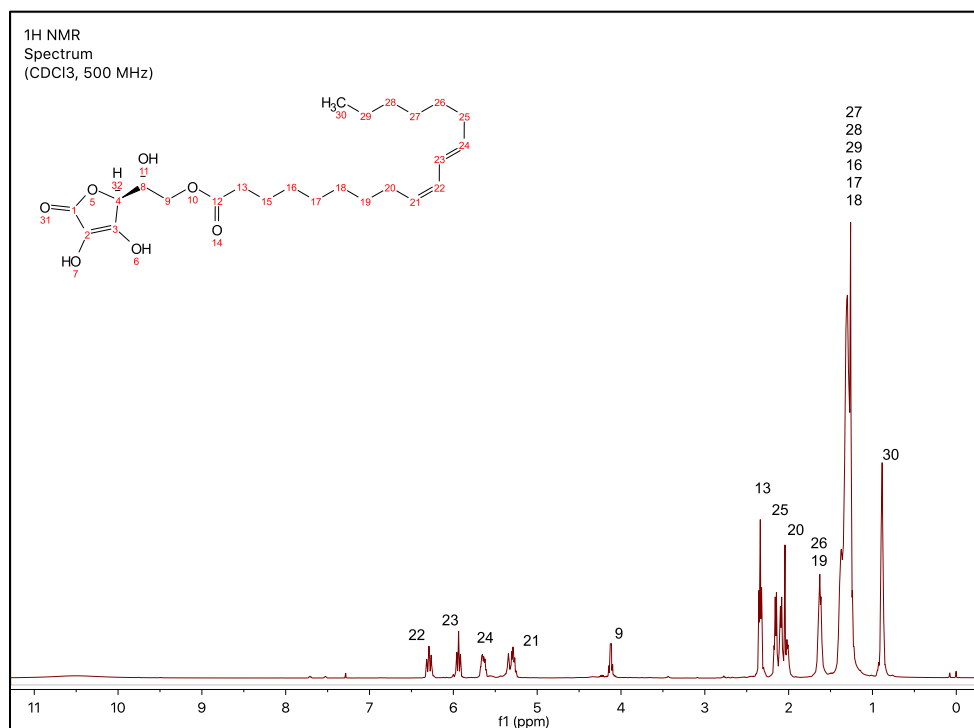
Espectro 1. Espectro de RMN ^1H del ácido ascórbico a 500 MHz .



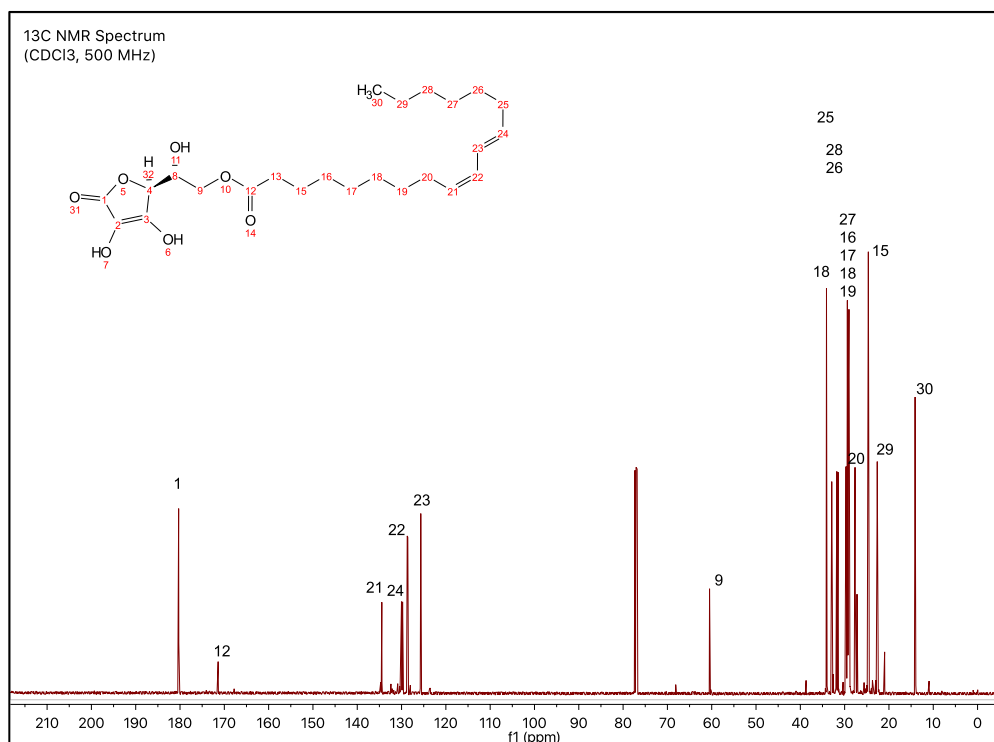
Espectro 2. Espectro de RMN ^{13}C (DEPT-Q) del ácido ascórbico a 100 MHz.



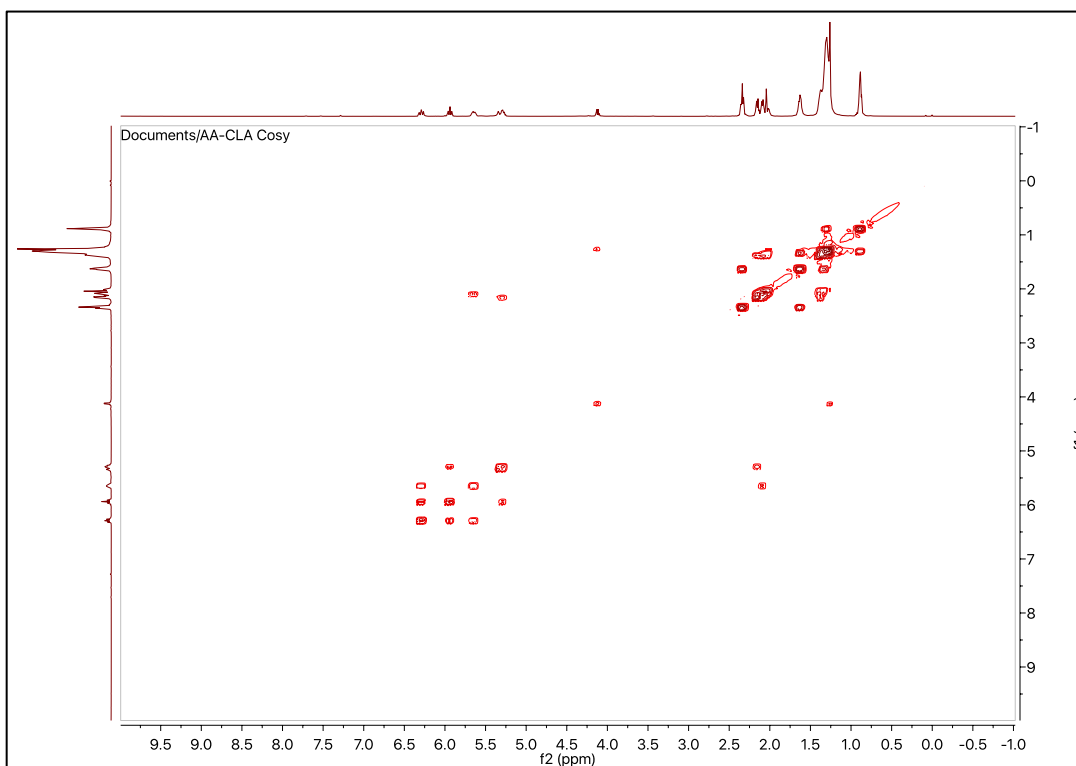
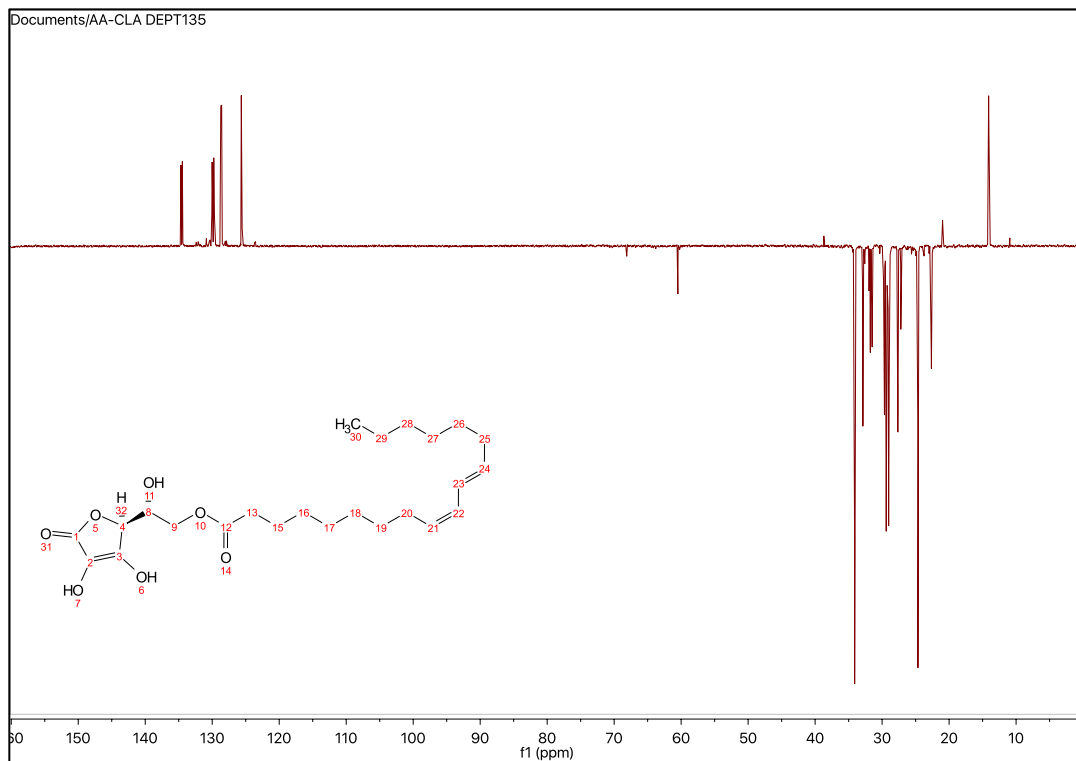
Espectro 3. Espectro de RMN del sistema lipofilizado ácido ascórbico-CLA a 500 MHz.

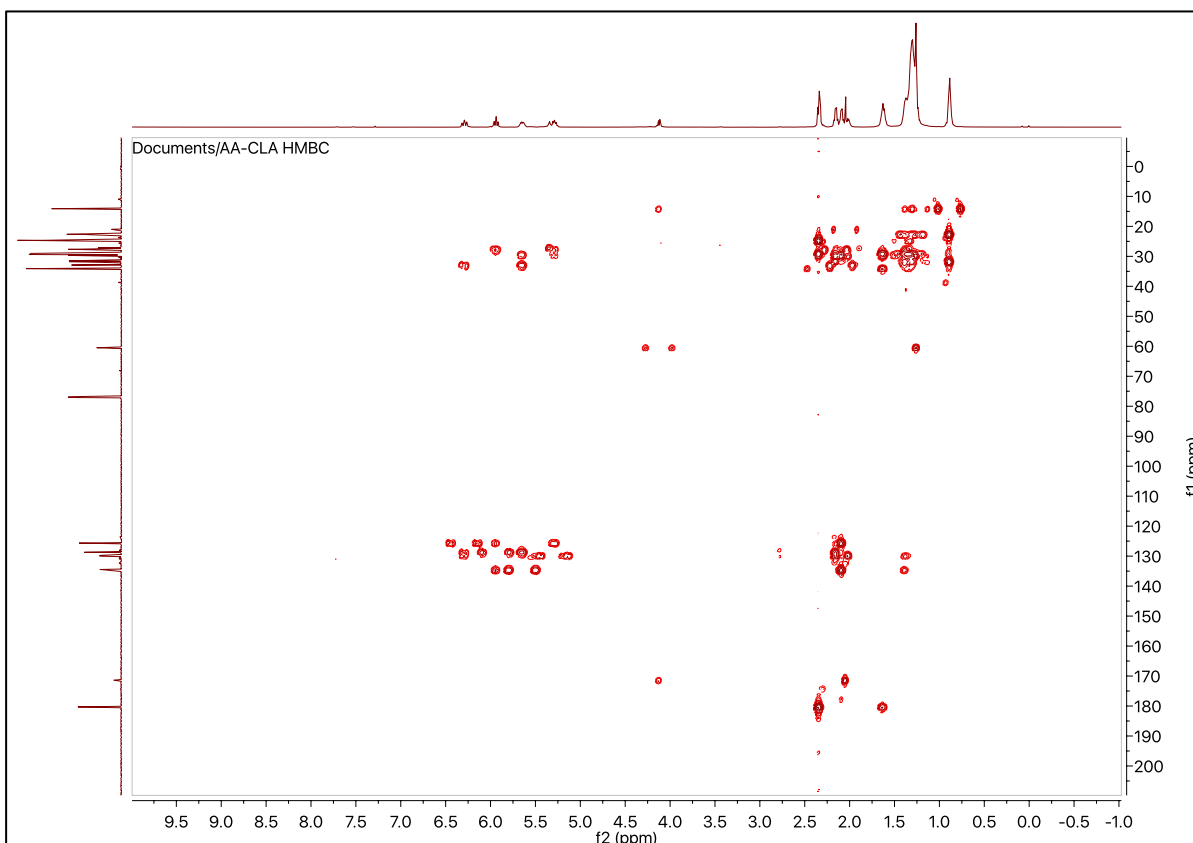
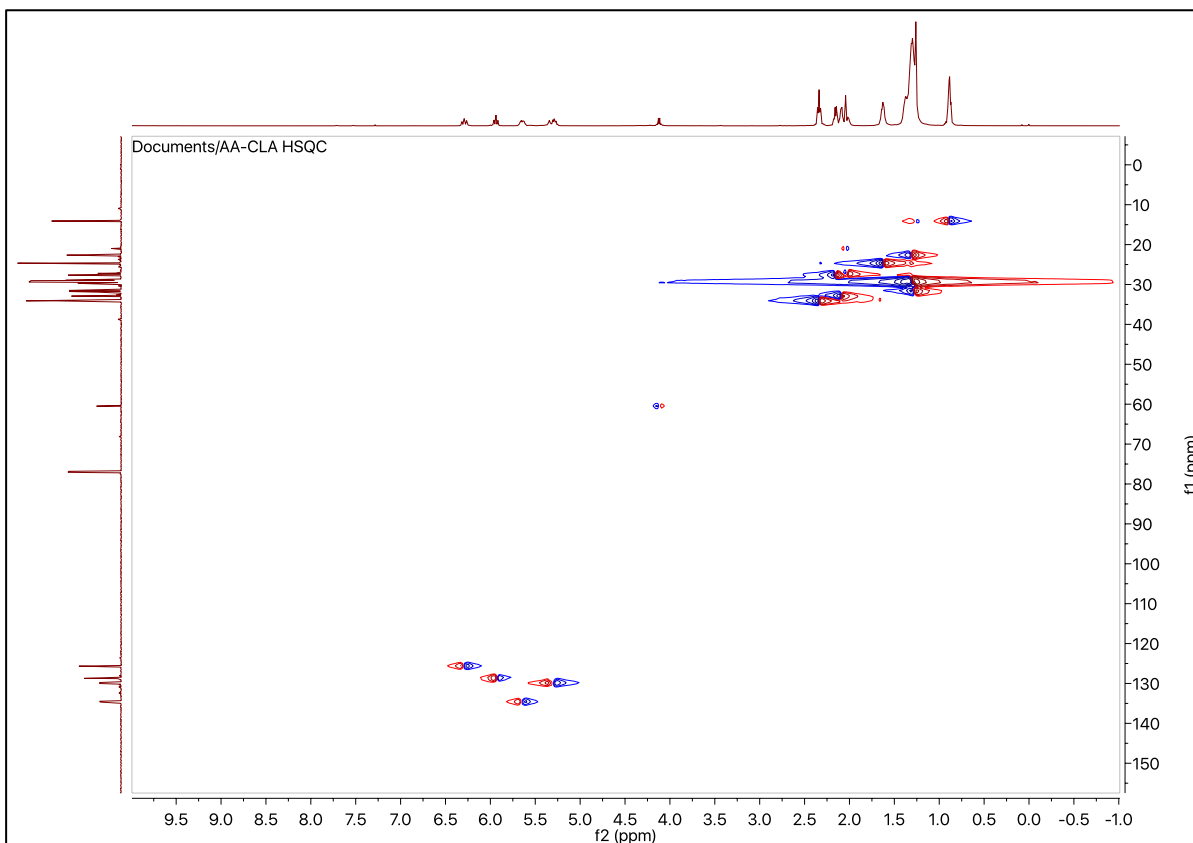


Espectro 4. Espectro de RMN ¹³C del sistema lipofilizado ácido ascórbico-CLA a 100 MHz.

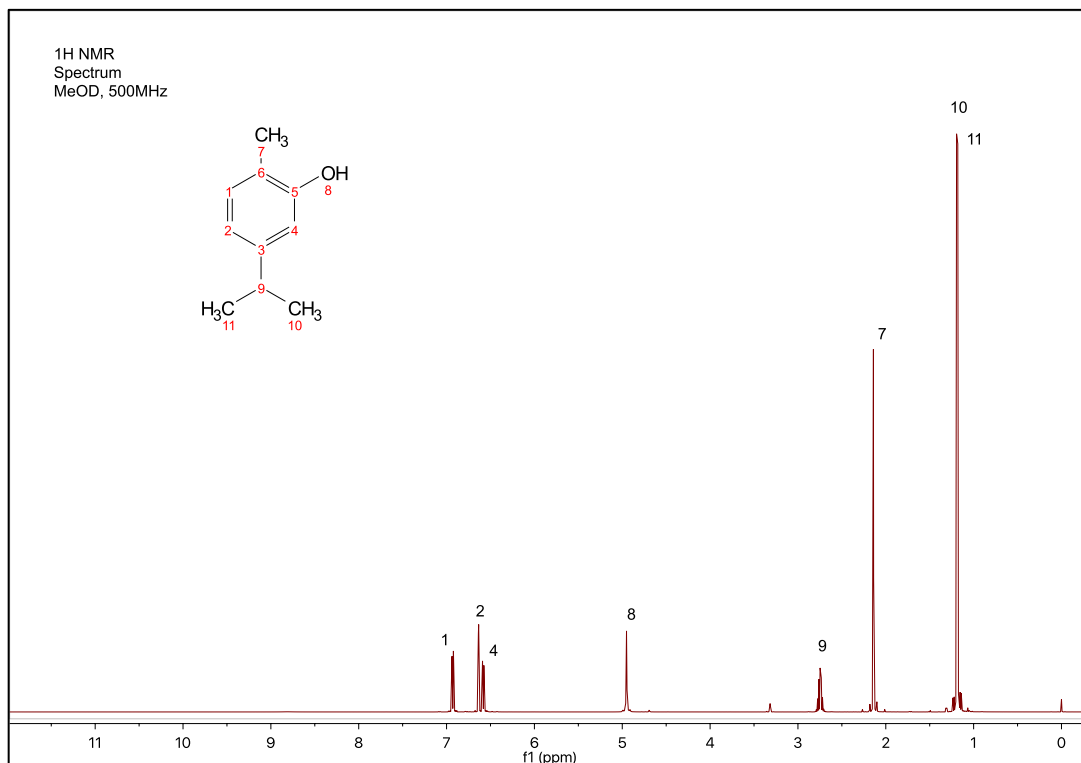


Espectro 5. Espectro de RMN ^{13}C (DEPT-135), COSY, HSQC y HMBC del sistema lipofilizado ácido ascórbico-CLA.

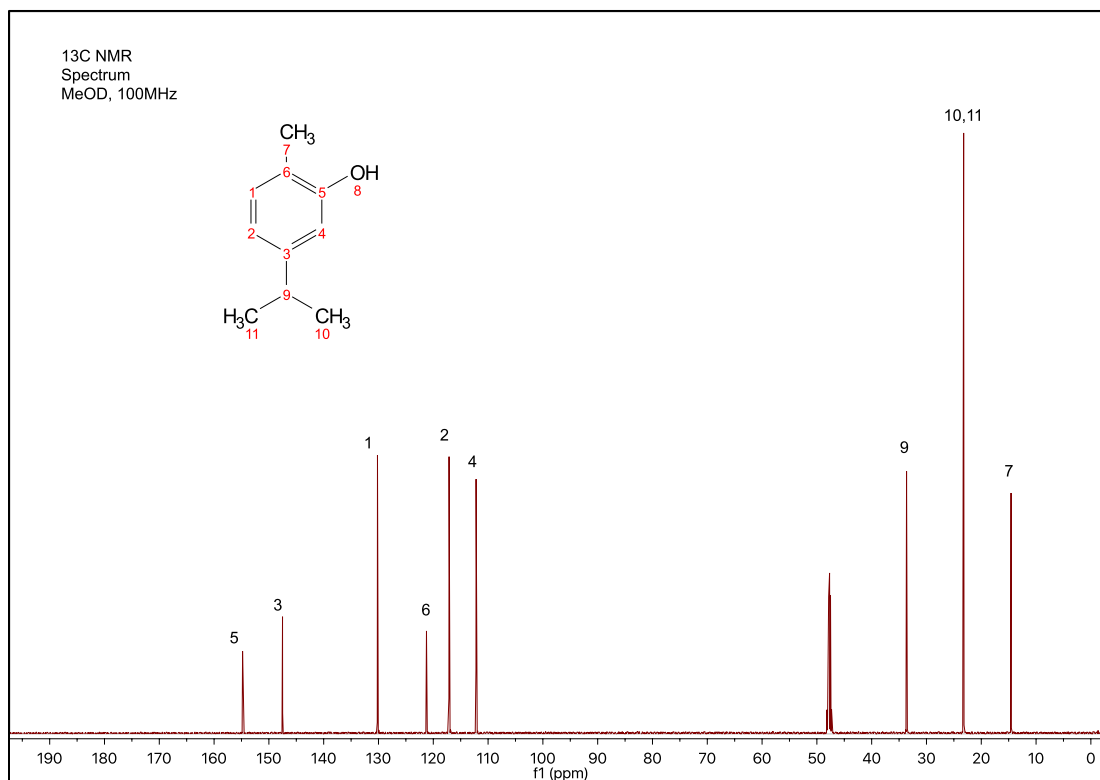




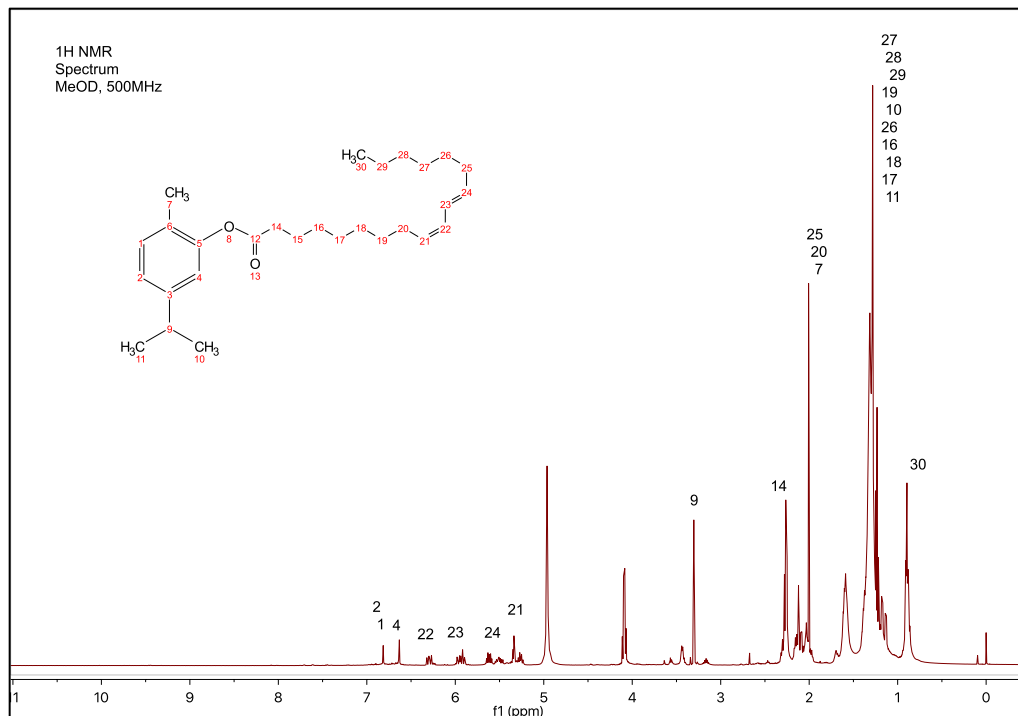
Espectro 6. Espectro de RMN ^1H del carvacrol a 500 MHz.



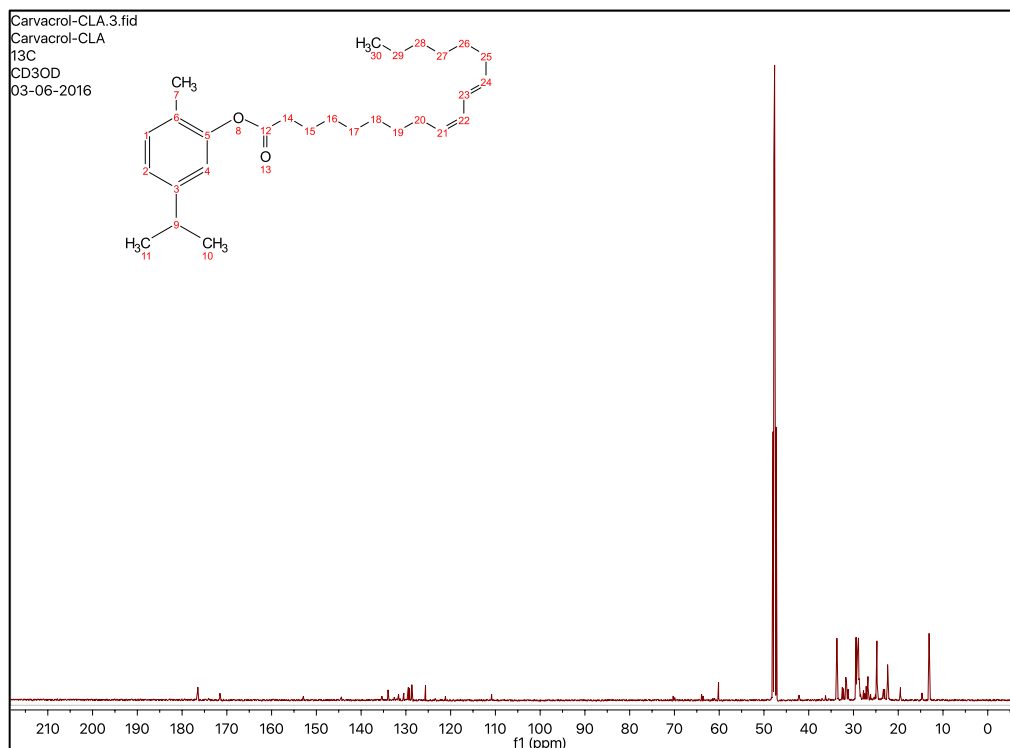
Espectro 7. Espectro de RMN ^{13}C del carvacrol a 100 MHz.



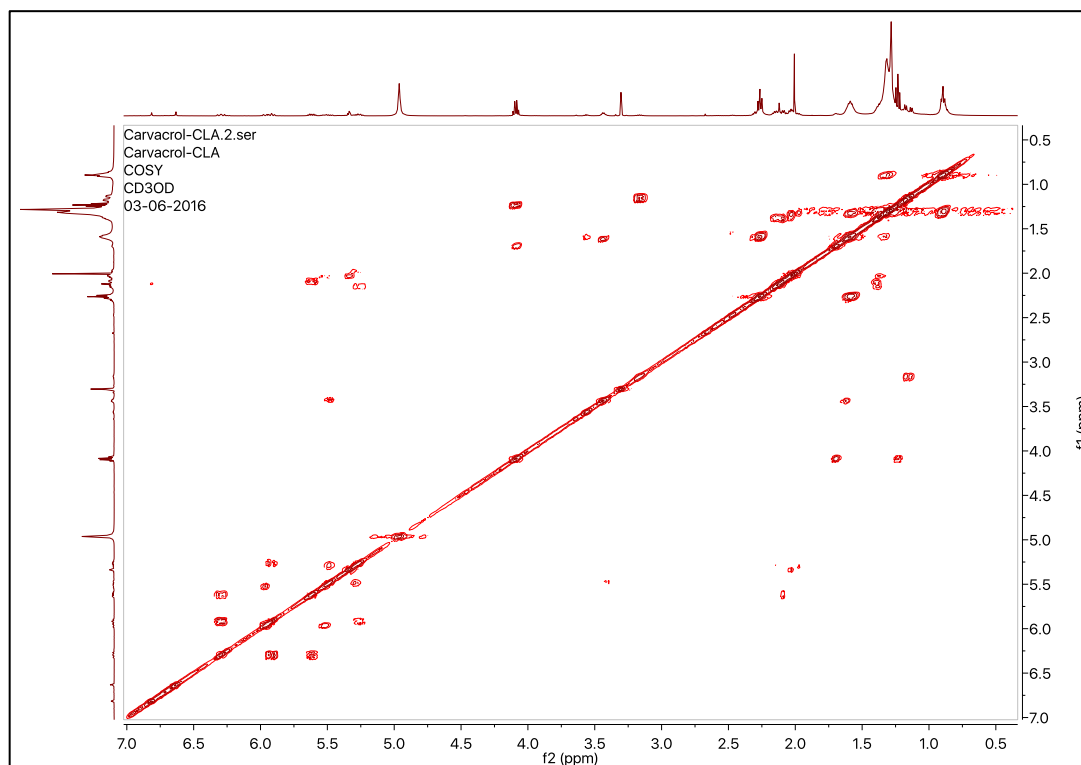
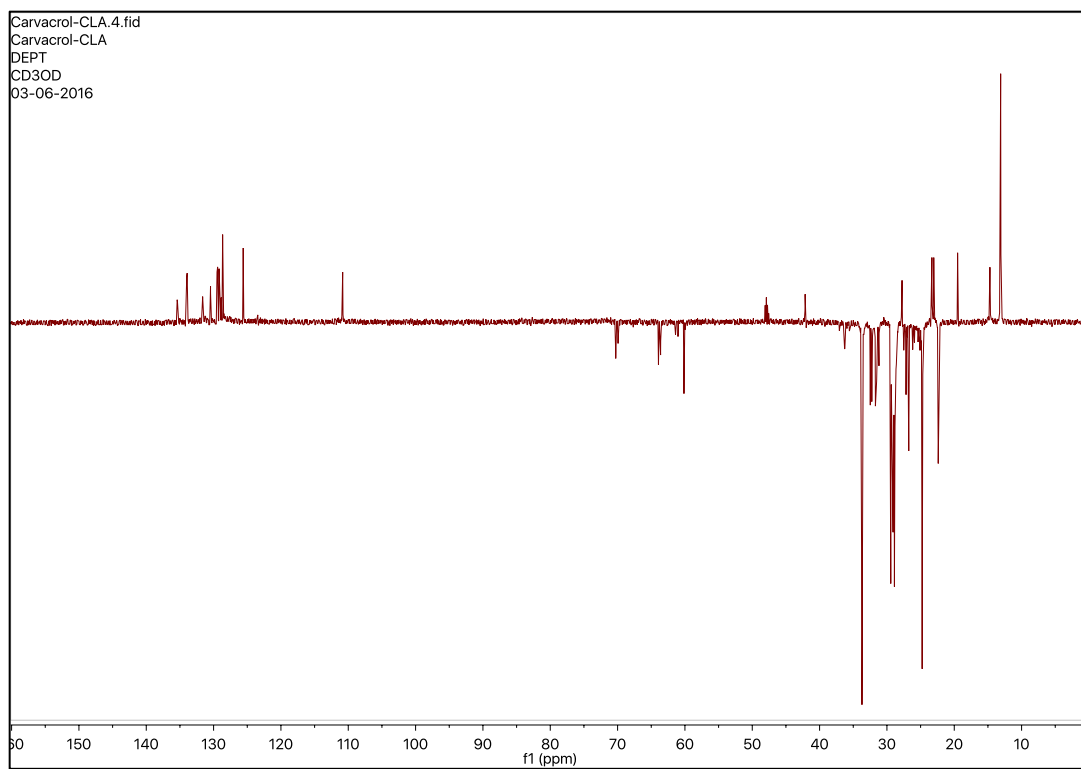
Espectro 8. Espectro de RMN ^1H del sistema lipofilizado carvacrol-CLA a 500 MHz.

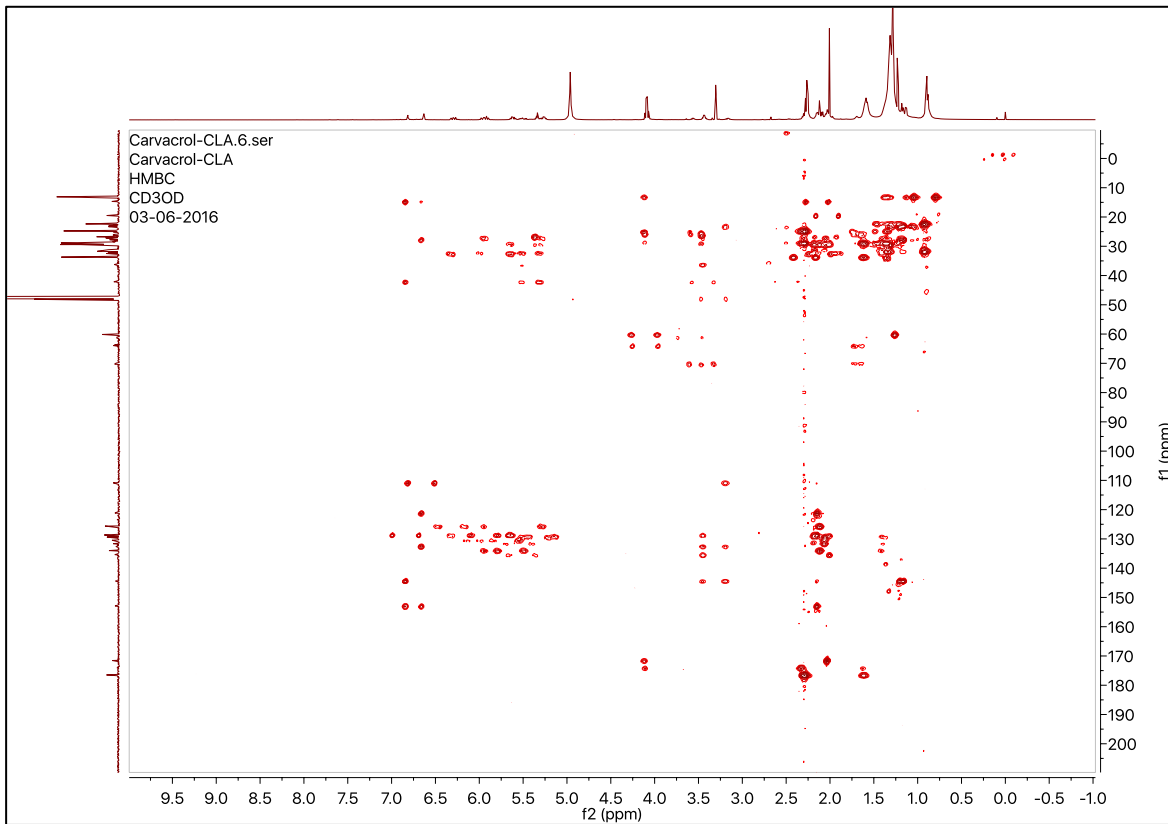
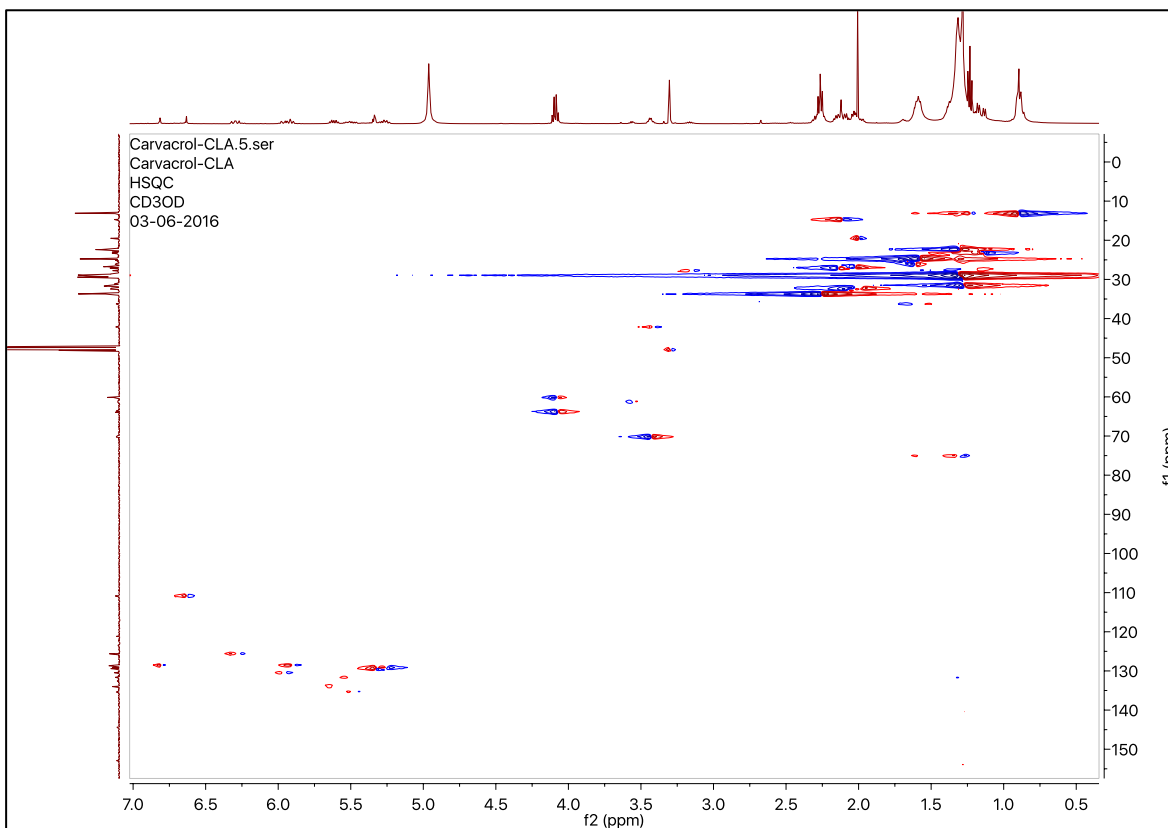


Espectro 9. Espectro de RMN de ^{13}C del sistema lipofilizado carvacrol-CLA a 100 MHz.

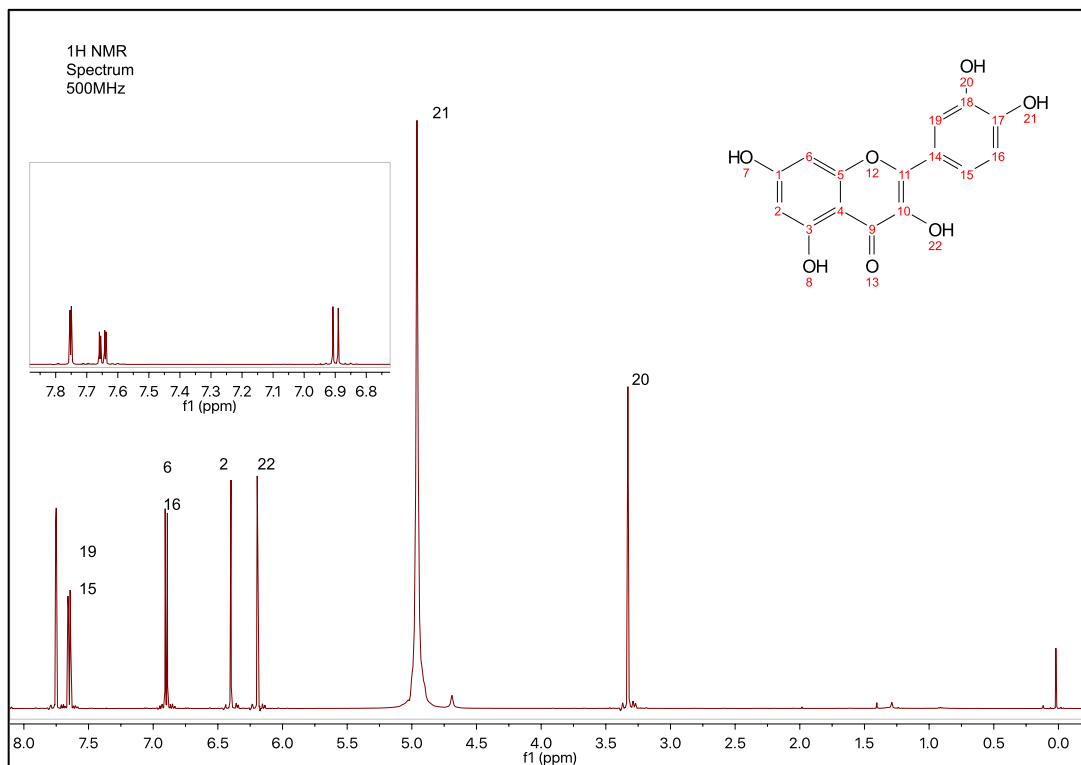


Espectro 10. Espectro de RMN ^{13}C (DEPT), COSY, HSQC y HMBC del sistema lipofilizado carvacrol-CLA.

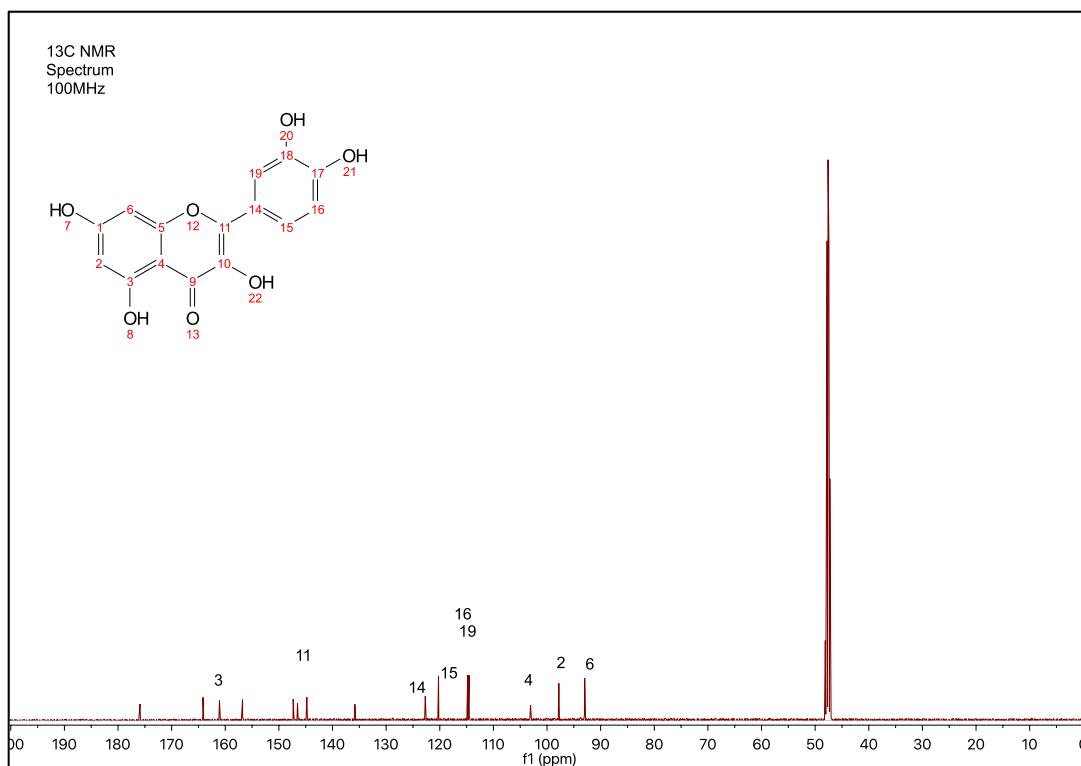




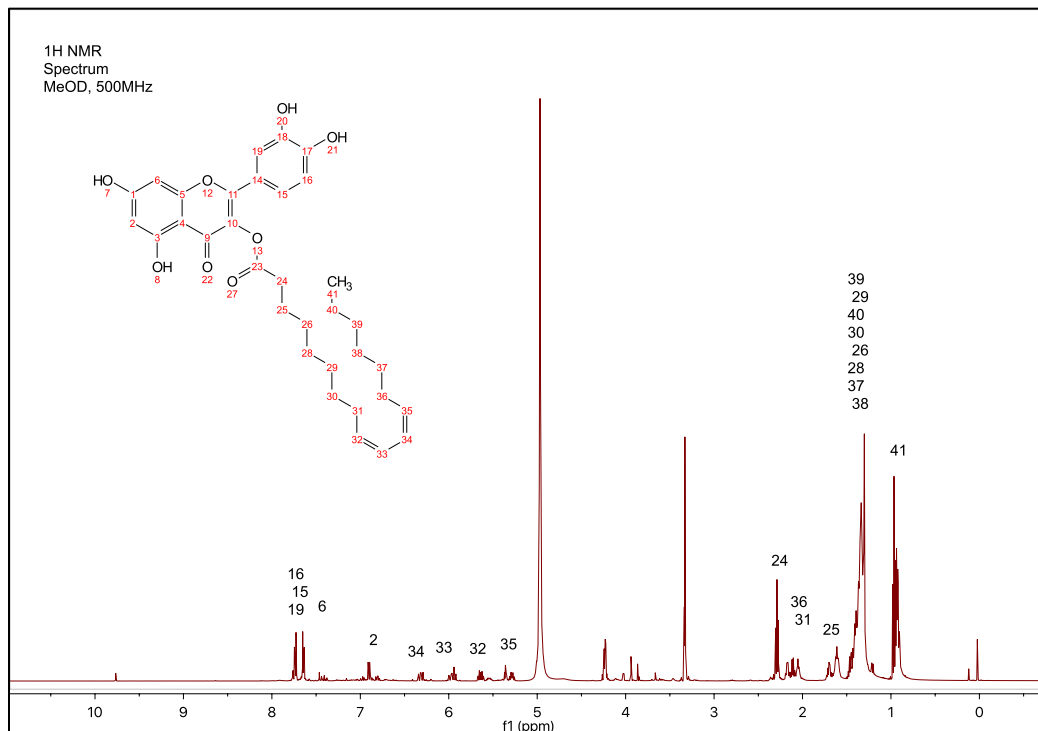
Espectro 11. Espectro de RMN ^1H de la quercetina a 500 MHz.



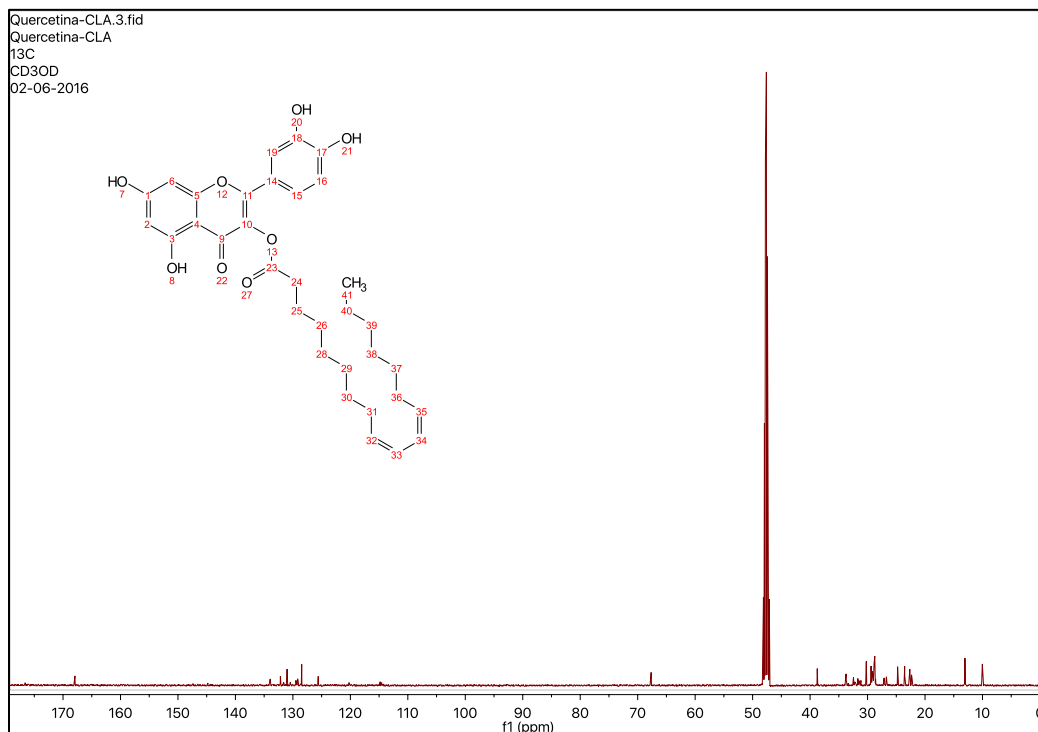
Espectro 12. Espectro de RMN ^{13}C de la quercetina a 100 MHz.



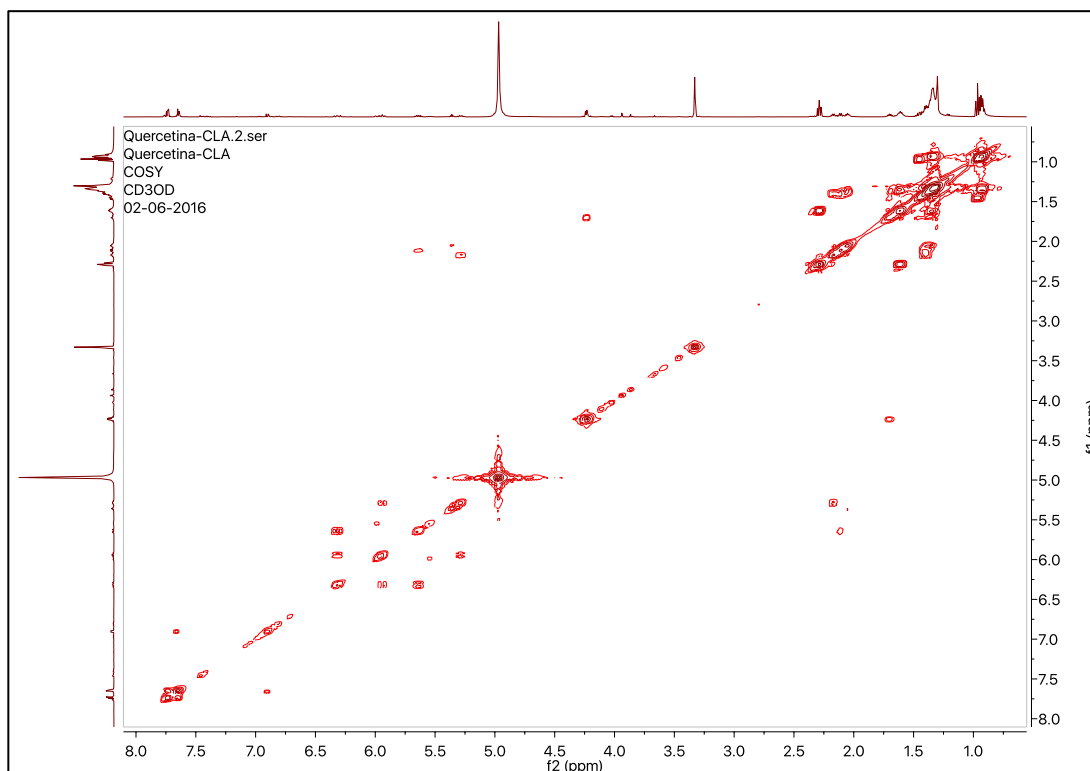
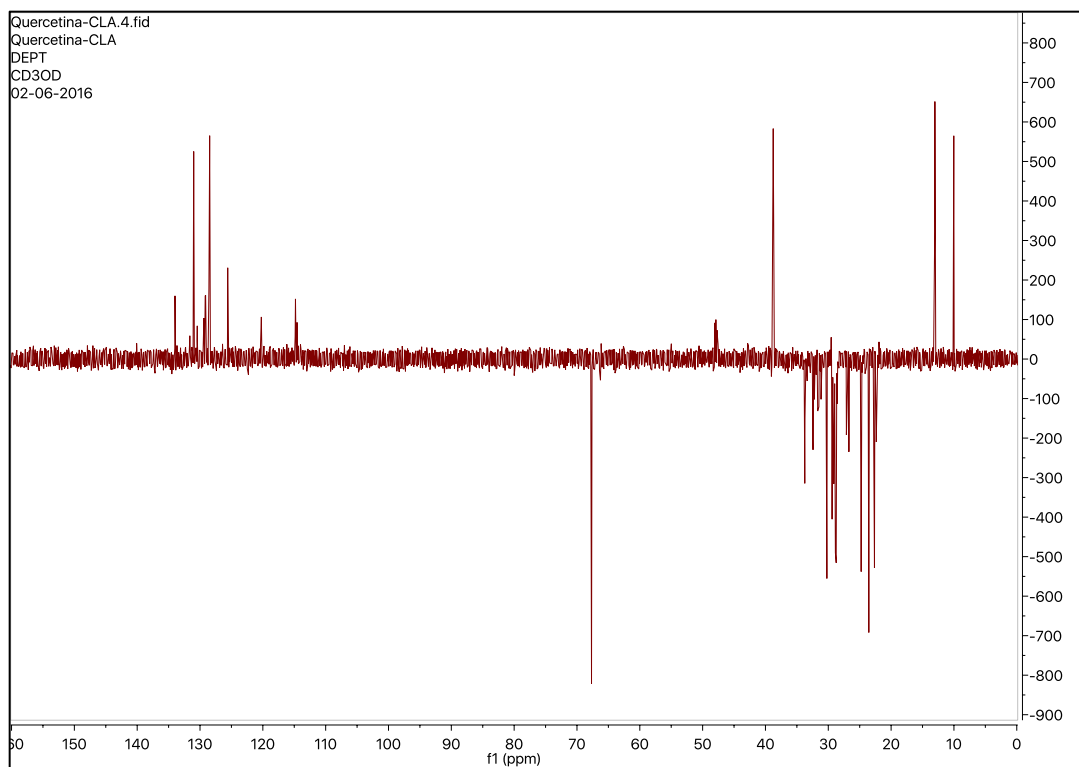
Espectro 13. Espectro de RMN ^1H del sistema lipofilizado quercetina-CLA a 500 MHz.

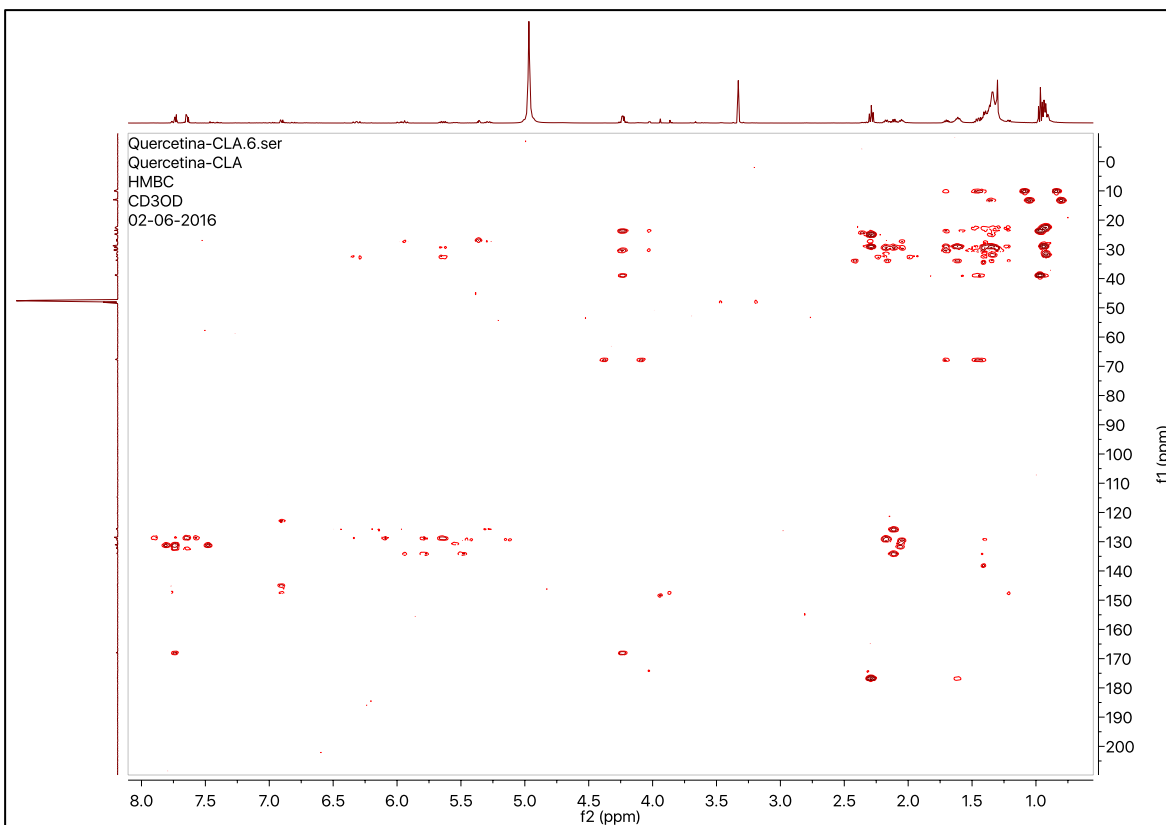
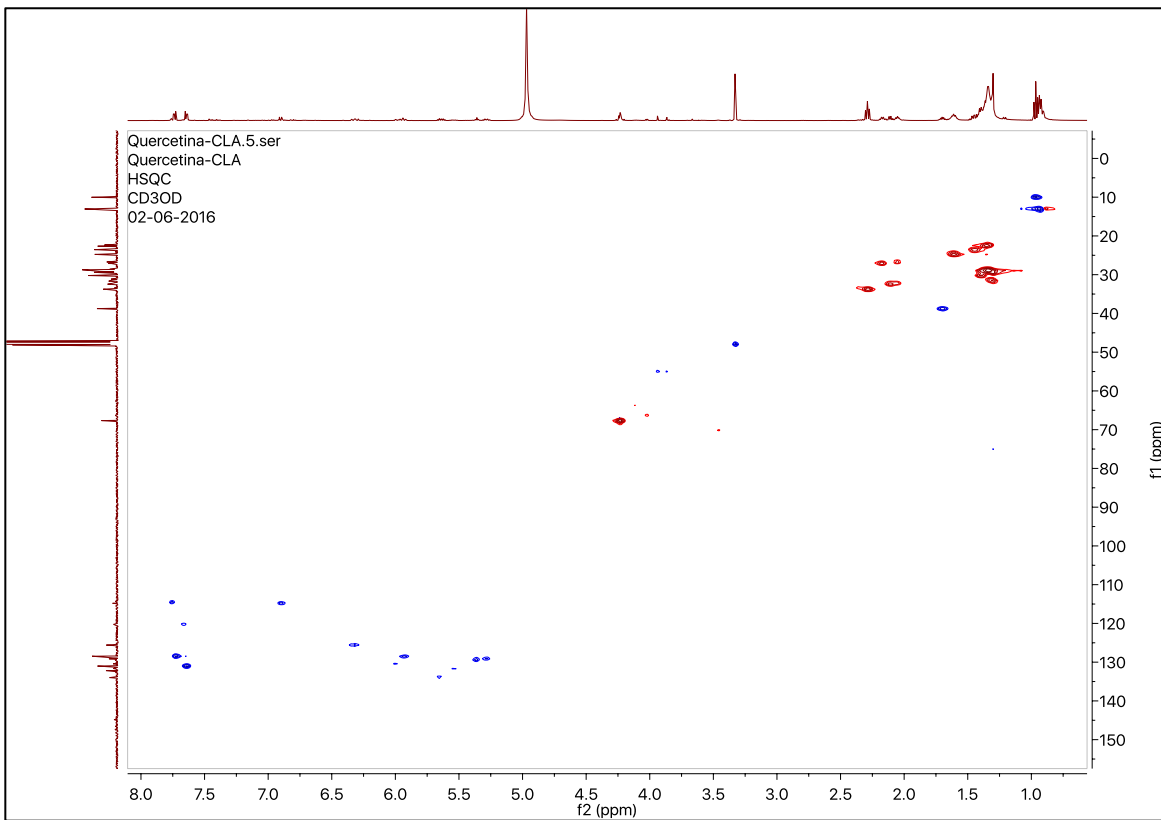


Espectro 14. Espectro de RMN de ^{13}C del sistema lipofilizado quercetina-CLA a 100 MHz.

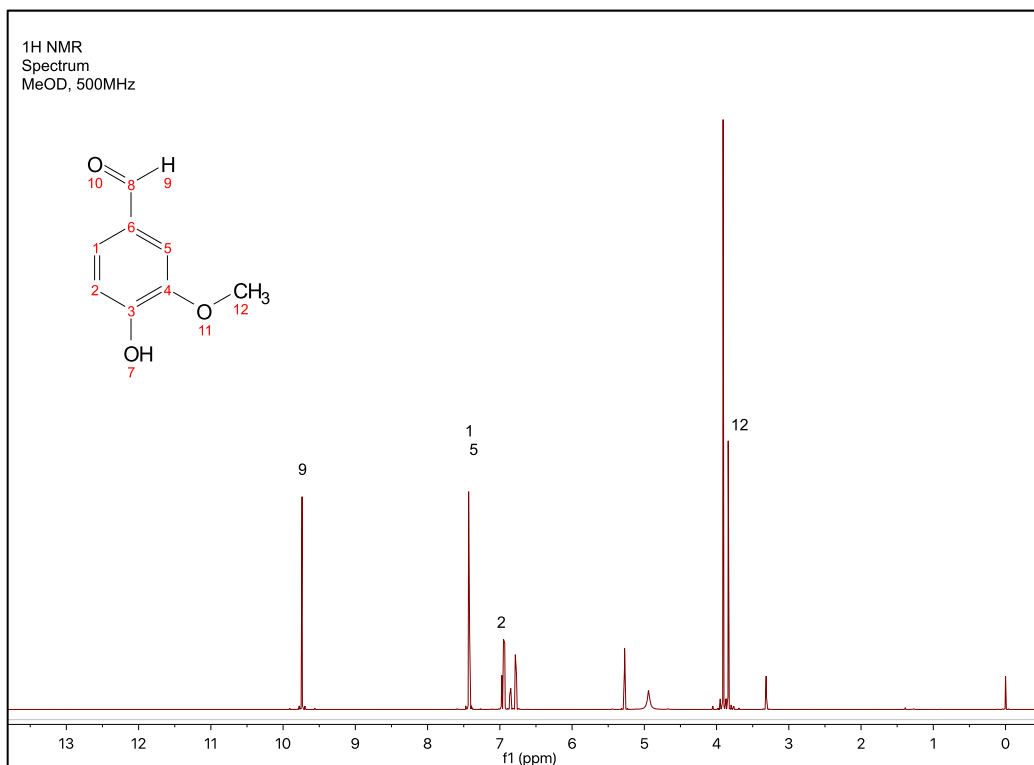


Espectro 15. Espectro de RMN ^{13}C (DEPT), COSY, HSQC y HMBC del sistema lipofilizado quercetina-CLA.

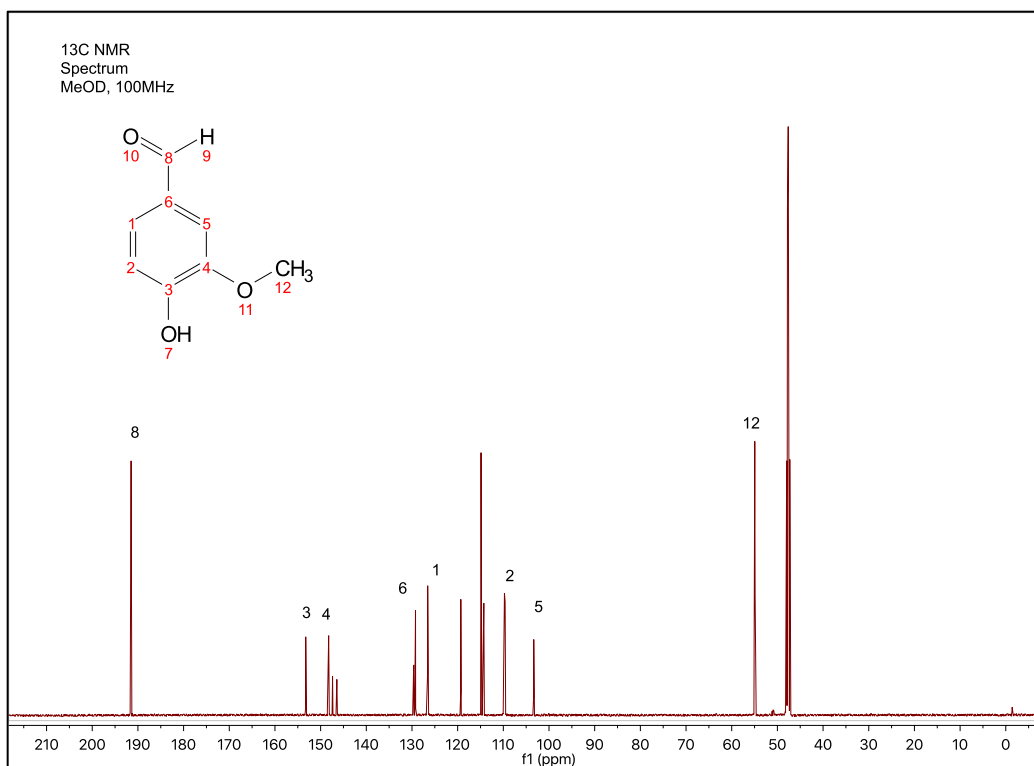




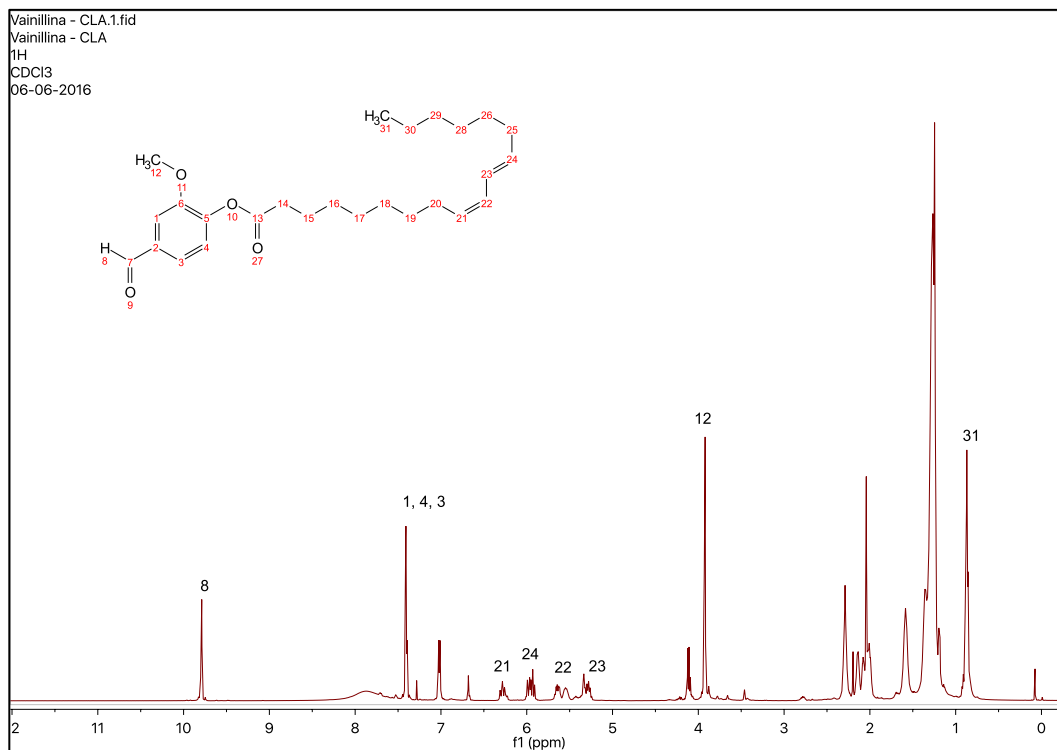
Espectro 16. Espectro de RMN ^1H de la vainillina a 500 MHz.



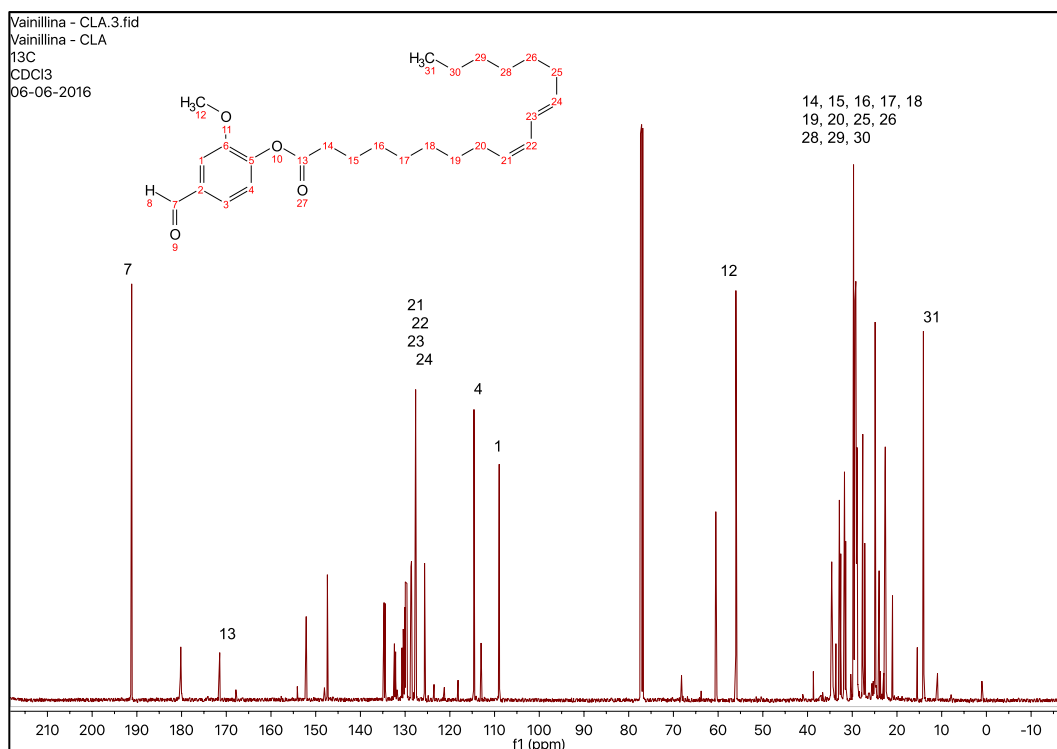
Espectro 17. Espectro de RMN ^{13}C de la vainillina a 100 MHz.



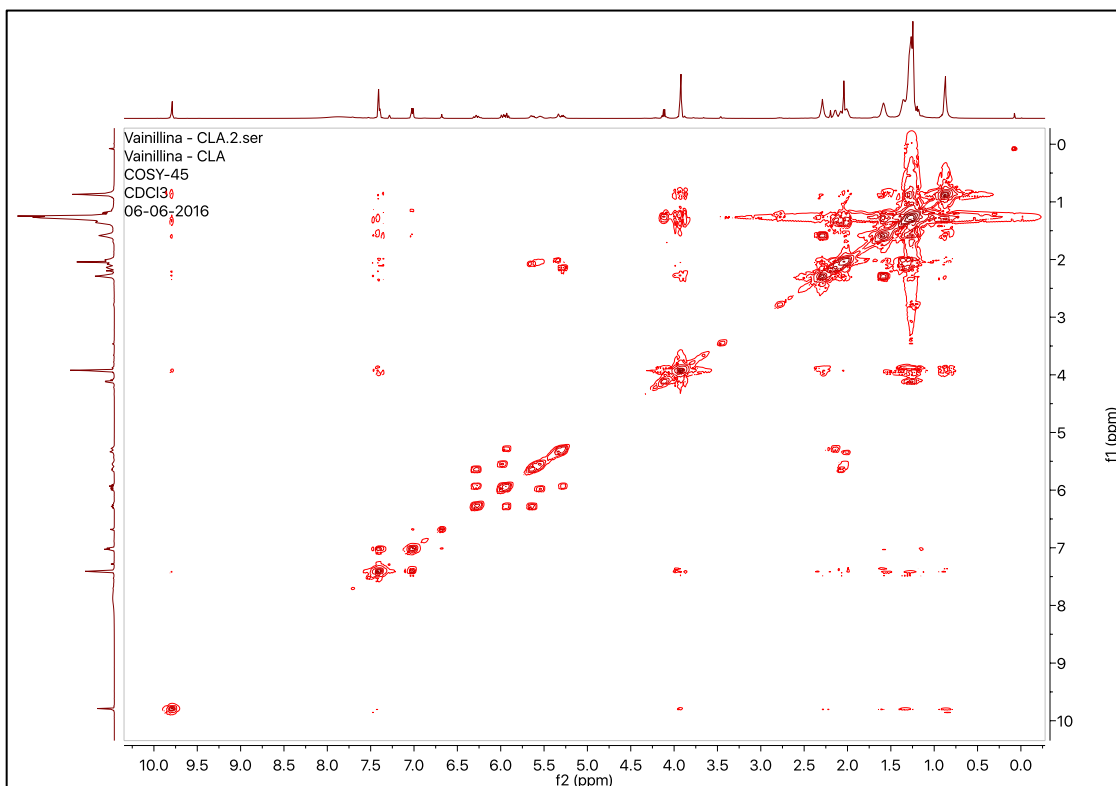
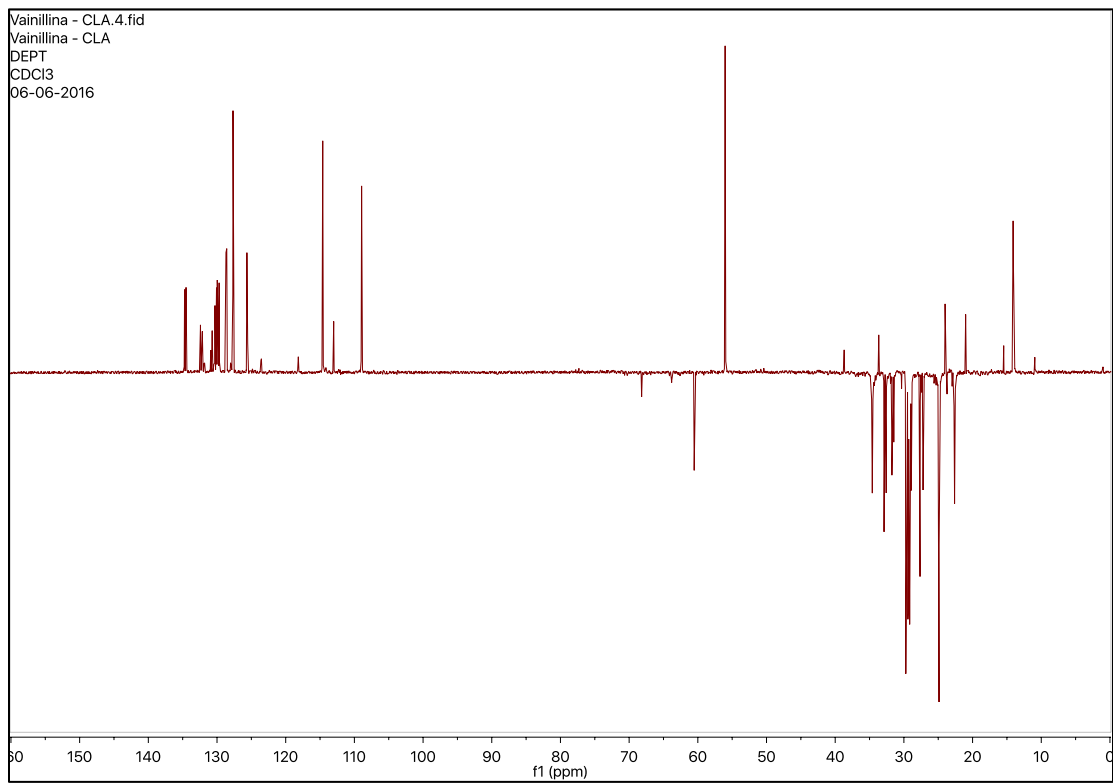
Espectro 18. Espectro de RMN ^1H del sistema lipofilizado vainillina-CLA a 500 MHz.

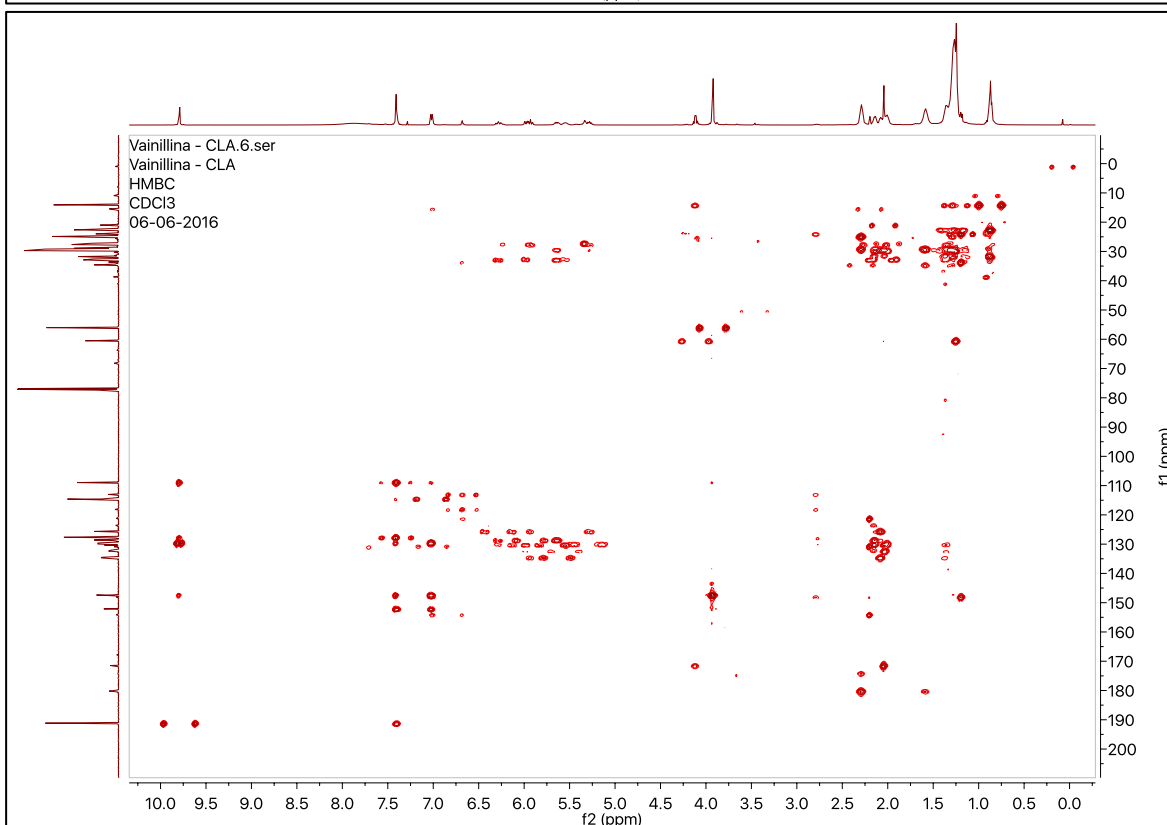
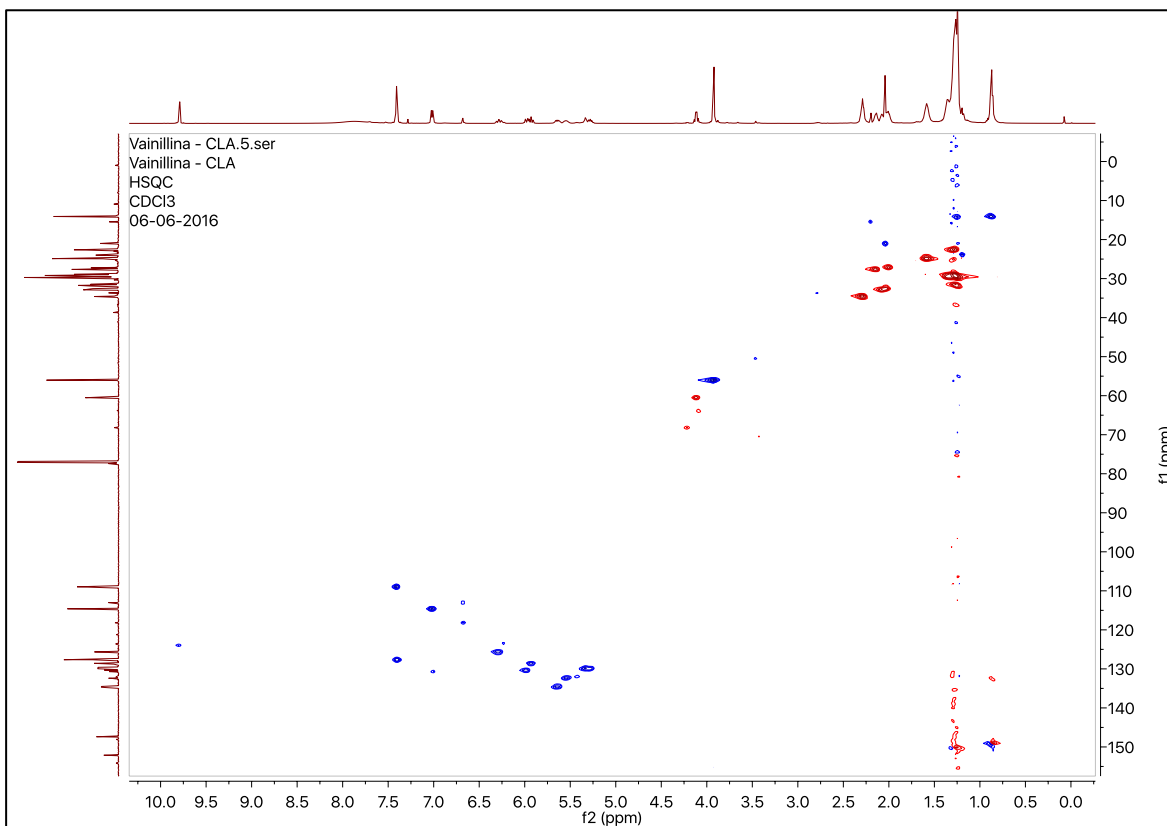


Espectro 19. Espectro de RMN de ^{13}C del sistema lipofilizado vainillina-CLA a 100 MHz.

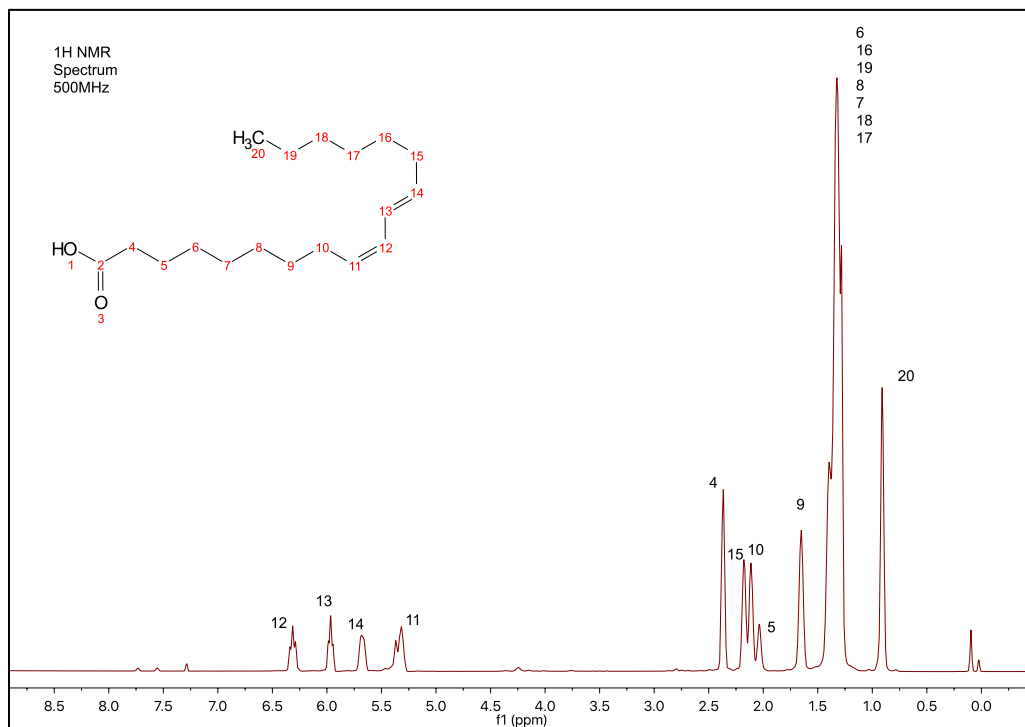


Espectro 20. Espectro de RMN ^{13}C (DEPT), COSY, HSQC y HMBC del sistema lipofilizado vainillina-CLA.

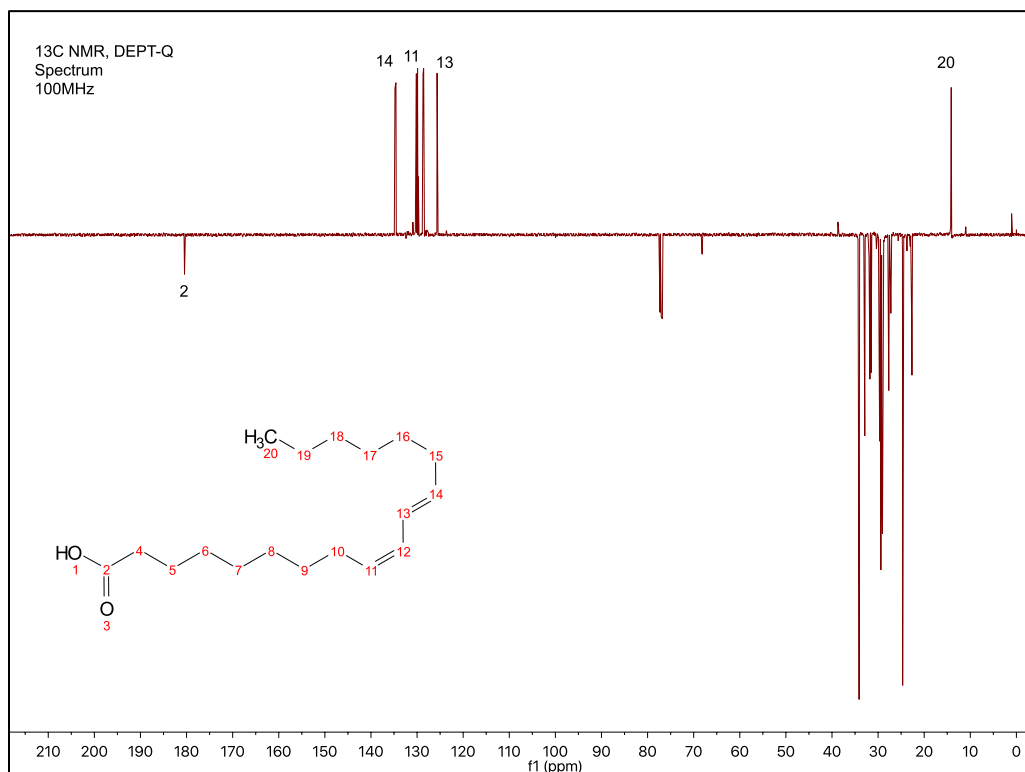




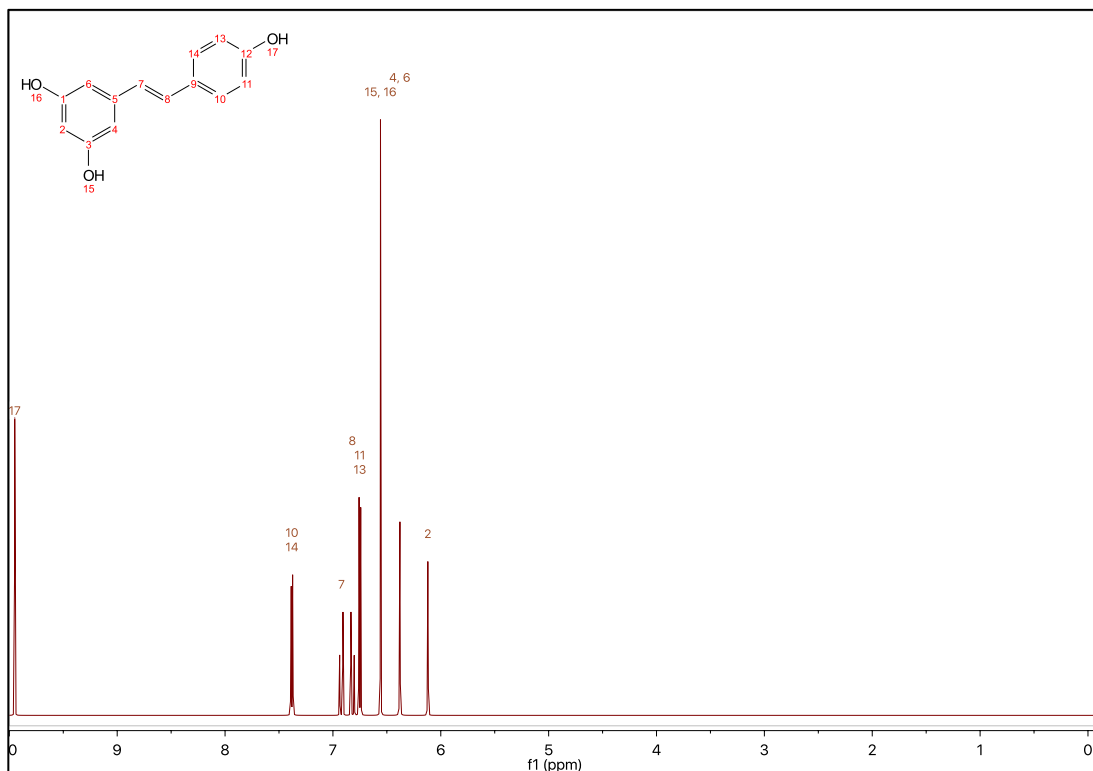
Espectro 21. Espectro de RMN ^1H del ácido linoleico conjugado a 500 MHz.



Espectro 22. Espectro de RMN ^{13}C (DEPT-Q) del ácido linoleico conjugado a 100 MHz.



Espectro 23. Espectro de RMN ^1H del resveratrol a 500 MHz.



Espectro 24. Espectro de RMN ^{13}C del resveratrol a 100 MHz.

